

М.А. Должикова, аспирант
 А.В. Пикунова: кандидат биологических наук
 А.А. Толпекина
 С.Д. Князев, доктор сельскохозяйственных наук, профессор
 А.Ю. Бахотская
 E-mail: pikunna84@mail.ru

УДК 634.7:577.21

DOI: 10.30850/vrsn/2020/3/26-29

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОРТОВ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ (*RIBES NIGRUM* L.) НА ОСНОВАНИИ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ*

В настоящее время Государственный реестр селекционных достижений РФ, допущенных к использованию, включает 198 сортов смородины черной. Учитывая достаточно большое количество сортов, актуальной является задача их идентификации. В данной работе представлены генотипы 28 сортов черной смородины в 11 микросателлитных локусах, полученные с применением наиболее современного метода детекции – фрагментного анализа путем капиллярного электрофореза. Для всех сортов были получены уникальные профили. Мы предлагаем использовать в качестве сортов-контролей возможного сдвига размеров аллелей достаточно востребованные в производстве сорта разных оригинаторов и различного происхождения – Ben Conan (оригинатор SCRI, UK), Искушение (оригинатор ВНИИСПК, РФ), Чародей (Кокинский опорный пункт, РФ). Результаты исследований могут быть использованы для идентификации задействованных в анализе сортообразцов.

Ключевые слова: смородина черная, *Ribes nigrum* L., полиморфизм, идентификация, ДНК-маркеры, генотипирование, генетические паспорта, микросателлитные локусы.

М.А. Dolzhikova, PhD student
 A.V. Pikunova, PhD in Biological sciences
 A.A. Tolpekina
 S.D. Knyazev, Grand PhD in Agricultural sciences, Professor
 A. Yu. Bakhotskaya
 E-mail: pikunna84@mail.ru

IDENTIFICATION OF BLACKCURRANT VARIETIES (*RIBES NIGRUM* L.) BASED ON MICROSATELLITE LOCUS POLYMORPHISM

Currently, the State Register of breeding achievements approved for use includes 198 blackcurrant varieties. The urgent task is their identification, given the large number of varieties. This paper presents the genotypes of 28 blackcurrant varieties at 11 microsatellite locus obtained by using the most advanced detection method is fragment analysis by capillary electrophoresis. For all varieties unique profiles are obtained. We propose to use, as controls, varieties of different originators and various origins Ben Conan (originator SCRI, UK), Iskushenie (originator VNIISP, RF), Charodey (Kokinsky base, Russia) that are quite popular in production. The research results can be used to identify the variety samples involved in the analysis.

Key words: black currant, *Ribes nigrum* L., polymorphism, identification, DNA markers, genotyping, genetic passportization, microsatellite loci.

На долю черной смородины в России приходится половина площадей, занятых под ягодниками. [2] По состоянию на 2019 год в Государственный реестр селекционных достижений РФ, допущенных к использованию, вошло 198 сортов этой важнейшей ягодной культуры. [1] При таком большом количестве сортов их идентификация – актуальная задача. Для этого используют классические методы апробации, которые в результате анализа фенотипа растений включают как количественные, так и качественные признаки. [6]

Наиболее перспективная система идентификации, не зависящая от условий выращивания и периода развития организма, основана на полиморфизме ДНК. В идентификации человека, животных, растений наиболее востребованы микросателлитные (SSR – Simple Sequence Repeats,

STR – Simple Tandem Repeats) ДНК-маркеры. Нельзя также не отметить всё большее развитие систем SNP маркирования и полногеномного секвенирования. [7]

Для изучения смородины первые микросателлитные маркеры разработаны шотландскими учеными [9] (<http://www.fruitbreeding.co.uk/RibesGenomicsSSRs.asp>), 49 микросателлитных локусов были локализованы на разных группах сцепления генетической карты смородины черной. [10, 15] SSR-маркеры применяли также для оценки разнообразия генетических коллекций *Ribes* в Италии и Северной Европе. [8, 11, 14]

Цель исследований – генотипирование сортообразцов смородины черной из коллекции ВНИИСПК по микросателлитным локусам для дальнейшей генетической паспортизации.

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе приведены результаты генотипирования 28 сортообразцов смородины черной из коллекции ВНИИСПК по 11 микросателлитным локусам.

ДНК выделяли из молодых листьев СТАВ-методом. [12] ПЦР – анализ проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 1 х ПЦР буферный раствор, 200 мкМ нуклеотидов по 2 мкМ прямого и обратного праймера, 0,3 ед. Taq ДНК-полимеразы и 10 нг ДНК.

Реакцию амплификации выполняли в следующем режиме: предварительная денатурация – 5 мин. при 95 °С; денатурация – 30 с при 95 °С; отжиг праймера – 30 с при температуре, подобранной для каждого маркера (табл. 1); синтез ДНК – 30 с при 72 °С (всего 30 циклов); завершающий этап (элонгация) – 10 мин. при 72 °С.

Фрагменты разделяли на приборе ABI prism Genetic Analyzer 3010. ПЦР-продукты нескольких локусов, отличающиеся по размерам и флуоресцентной метке собирали в один мультиплекс (анализировали на ABI prism Genetic Analyzer одновременно). Для учета первичных данных использовали программу Peak Scanner Software_v01 (Peak Scanner™ Software Version 1.0. Part Number 4382253 Rev. A 12/2006).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В большинстве случаев на ДНК каждого сортообразца в конкретном локусе амплифицировалось не более двух фрагментов, но в некоторых локусах и три (табл. 2).

Амплификация более чем двух аллелей в некоторых микросателлитных локусах у диплоидных форм связана с дубликацией этих локусов на одной и той же или на разных хромосомах. [13]

Для всех проанализированных сортообразцов получены уникальные микросателлитные профили, которые могут быть использованы для генетической паспортизации.

При разработке систем идентификации генотипов важное значение имеет воспроизводимость результатов анализа, на которую существенно влияет методика детекции. В детекции полиморфизма микросателлитных локусов наиболее точной, по сравнению с ПААГ считают детекцию путем капиллярного электрофореза, которая также позволяет автоматизировать и наиболее точно оцифровать результаты исследований.

Ранее впервые в России мы использовали микросателлитные маркеры для оценки межсортового полиморфизма, определения генетического сходства и проверки родословных между сортообразцами черной смородины. [5] В данной работе, нацеленной на генотипирование сортов для дальнейшей паспортизации, существенно изменился набор проанализированных сортов, перечень задействованных в анализе микросателлитных локусов и, самое главное, применен наиболее точный метод детекции полиморфизма микросателлитных локусов – фрагментный анализ путем капиллярного электрофореза.

Таблица 1. Микросателлитные локусы, задействованные в анализе

Локус	Группа сцепления	Прямой праймер	Обратный праймер	Температура отжига, °С
g1-k04	1	TGT TCC CTG TTT CCT TCA AAA	GGA CGT GGA CGA TGA GAG TT	52
g1-M07	1	TCC CGT TAC TGG AGT GGT GT	CCA TGG TTT TCC GAT TTG TT	52
e1-001	6	CCT TTC CAG AGA AAA CTC AAA CA	AAG TAT GGG AAC AAC GGC AG	54
g2-H21	4	TGC CCT TTT TGG TCA TTT TC	CAA TCG TCG ATG AAG GTC TG	50
g2-g12	7	GTG ACC CAC CTA AAC CGT CC	GGA GTG GAG GGT TGG AAA AT	54
g2-L17	4	TTT GGA AAA CCT CCC CTT TT	GAG CTG TTG CTG TTG CCA TA	50
e1-021	4	TCT CTC CAA CTG AGA AGG AAA A	GAT TTG TTC TTG TGC AGC GA	50
g1-L12	5	CGAAGGTTGAATCGGTGAGT	TTGTGAGCCGTAACACGTA	52
e3-b02	5	AAG ACG AAG ACG ACG ACG AT	CTG ATC TTT GCC GAA TGG TT	52
g1-a01	5	CGA AGG TTG AAT CGG TGA GT	CGT AGC CAC GTA GTT CCA CA	52
gr2-j05	1	CAA AAC TGA TTA GGG GAT CA	TTT GAA GAA GAG ATG GCG AAA	52

Ученые Белоруссии [3] на основании полиморфизма 8 микросателлитных локусов разработали методы ДНК-идентификации сортов смородины черной и красной, крыжовника обыкновенного, возделываемых в республике, применимые для практического использования и обладающие достаточной степенью информативности для определения сортовой принадлежности, а также установления родословных сортов. [3]

В рамках проекта RIBESCO более 800 сортообразцов генотипированы с помощью микросателлитных маркеров, на основании полученных данных вместе с фенотипическими отобраны образцы для дальнейшей криоконсервации. [8]

В качестве важного элемента системы идентификации стоит отметить использование сортов контролей. Несмотря на хорошую воспроизводимость результатов микросателлитного анализа, небольшие изменения в методике проведения (разные флуоресцентные метки, приборы – анализаторы, наборы реактивов и др.) могут привести к сдвигу размеров аллелей. Например, в зависимости от цвета флуоресцентной метки ведущего праймера, полученные фрагменты могут оказаться больше или меньше на несколько пар нуклеотидов.

В последнее время в практику проведения анализа входит использование сортов контролей с известными генотипами. Зная абсолютные размеры контрольного образца, легко вычислить фактор конверсии (сдвига) для всех исследуемых генотипов. Поэтому единый контроль необходим в каждой серии генотипируемых образцов. [4]

Таким образом, в результате генотипирования 28 сортов смородины черной по 11 микросателлитным локусам получены уникальные профили,

Таблица 2.

Генотипы сортов черной смородины по 11 микросателлитным локусам

№	Сорт	Локус										
		g1-K04	g1-M07	e1-001	g2-L17	g2-G12	g1-L12	gr2-j05	g1-a01	g2-H21	e1-021	e3-B02
1	<i>Веп Conan</i>	310	206/214	142	143/162	191/197	214/218	-	-	244	295	165/170
2	<i>Искушение</i>	310	217/222	142/155	162	173/187	214/218	-	207/211	246	295	165/170
3	<i>Чародей</i>	310/312	200/214	144/146	146	187/193	213/216	169/196/198	207/210	247/251	295	165/170
4	<i>Блакестон</i>	310	206/214	142/144	146	189/193	217	-	211/222	247/251	295	165/168
5	<i>Буряя сладкая</i>	302/310	202/210/216	142/144	142/156	187/191	217	198/200	211	247	295	165/170
6	<i>Гамаюн</i>	310/316	202/214	142	156	191/197	217	196/198	207	247	295/298	165/170
7	<i>Десертная Огольцовая</i>	310	216/222	142/155	162	173/187	213	-	207/211	247	295	165/170
8	<i>Загляденье</i>	310	206/214	142/144	156	189/195	213/217	169/173/196	207	247	295	165/168
9	<i>Изюмная</i>	312/316	210/214	142/146	162	187/197	213	192	207	247	292/295	165/170
10	<i>Кипиана</i>	310/316	214	142/155	156	179/195	213	169/196/198	207/211	247	295	165/170
11	<i>Купалиний</i>	310/316	202/210/229	142/146	143/166	179/197	213/218	169/192	211	245/247	295	165/170
12	<i>Лентяй</i>	302/312	202/206/216	142/144	130/151	195/197	217	192	207/211	247	295/298	165/170
13	<i>Мария Киевская</i>	310/312	214/223	137/142	156	187/191	213/217	169/192	207	245/247	295	165/170
14	<i>Мока</i>	302/310	206/225	144/146	151	-	213	191/192	207/210	-	-	165/170
15	<i>Монисто</i>	310	206/214/	142/144	147/156	179/195	213	198	207/210	247/252	295	165/170
16	<i>Нарианна</i>	310/314	202/206	142/144	156/166	193/197	201/203/213	169/192	207/210	247	295	165/170
17	<i>Ника</i>	310	206/214	146/155	156	173/193	213/216	192	207	247	295	165/168
18	<i>Нимфа</i>	310	202/214/233	142/148	156	191/197	213	169	207/211	245/247	295	165/170
19	<i>Орловская серенада</i>	310/312	210/222	142/155	146/156	191/197	213/217	192/198	211	245/247	298	165/170
20	<i>Ртищевская</i>	310/312	210/216/	144/146	144	195/197	217	169	207	247	295	168/170
21	<i>Смоляниновская</i>	310/317	202/214	142	156	191/197	214	-	207/211	247	295/298	165/170
22	<i>Сокровище</i>	310/312	216/233	138/144	144/146	191/197	214/217	192	210	245/247/251	295	165/170
23	<i>Стрелец</i>	310/312	202/217/233	138/144	144/146	191/197	216	192	210	245/247/251	295	165/170
24	<i>Тсема</i>	310	206/210	140/142	156	179/197	216	173/192	207/210	247	295	165/168
25	<i>Фортуна</i>	310	202/216	146/155	156/162	187/191	213/216	169/192/196	207	247	295	165/170
26	<i>Черешнева</i>	302/310	202/214/216	144	144/162	187	213	192	207	247	292/295	165/170
27	<i>Черноокая</i>	310/312	210/214/223	142/155	146/156	191/197	213	192/198	211	245/247	298	165/170
28	<i>Ядрёная</i>	310	201/214/233	148/155	156	187/197	217	169/198	207/211	245/247	295	165/170

Примечание. Выделены уникальные сочетания аллелей в пределах большой выборки сортообразцов – 73 сорта красной смородины (*Ribes rubrum*), 54 черной (*Ribes nigrum*).

которые могут быть использованы в генетической паспортизации. Мы предлагаем применять в качестве сортов-контролей востребованные в производстве сорта разных оригинаторов и различного происхождения – *Веп Conan* (оригинатор SCRI, UK), *Искушение* (оригинатор ВНИИСПК, РФ), *Чародей* (Кокинский опорный пункт, РФ).

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорта растений. М. – 2020.
2. Князев, С.Д. Селекция смородины черной на современном этапе / С.Д. Князев, Т.П. Огольцова – Орел: Изд-во Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур. – 2004. – 238 с.
3. Межнина, О.А. Оценка генетического разнообразия и разработка методов ДНК-идентификации сортов и пред-

- ставителей видов ягодных культур *Fragaria L.* и *Ribes L.*: автореф. ... канд. биол. наук / О.А. Межнина – 2017. – 25 с.
4. Омашева, М.Е. Молекулярно-генетическая паспортизация сортов яблони / М.Е. Омашева, А.С. Пожарский, Б.Б. Смайллов, Н.Н. Галиакпаров // Алматы. – Научно-методические рекомендации института биологии и биотехнологии растений. – 2017. – 50 с.
5. Пикунова, А.В. Полиморфизм микросателлитных локусов у сортов черной смородины (*Ribes nigrum L.*) из коллекции ВНИИСПК / А.В. Пикунова, С.Д. Князев, А.Ю. Бахотская, А.А. Кочумова // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50. – № 1. – С. 46–54.
6. Помология. Том IV. Смородина. Крыжовник / под ред. Е.Н. Седова. – Орел: ВНИИСПК. – 2009. – 468 с.
7. Хлесткина, Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Е.К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 17. – № 4/2. – С. 1044–1054.

8. Antonius, K. Development of the Northern European *Ribes* core collection based on a microsatellite (SSR) marker diversity analysis / K. Antonius, S. Karhu, H. Kaldm et al // Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization. – 2012. – P. 70–3.
9. Brennan, R. Development and characterization of SSR markers in *Ribes* species / R. Brennan, L. Jorgensen, M. Woodhead, J. Russell // Molecular Ecology Notes. – 2002. – V. 2. – №. 3. – P. 327–330.
10. Brennan, R. 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 / R. Brennan, L. Jorgensen, C. Hackett et al. // Euphytica. – 2008. – V. 161 (1-2). – P. – 19–34.
11. Cavanna, M. Microsatellite-based evaluation of *Ribes* spp. Germplasm / M. Cavanna, D.T. Marinoni, G.L. Beccaro et al. // Genome. – 2009. – V. 52. – №. 10. – P. 839–848.
12. Doyle, J.J. Isolation of plant DNA from fresh tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // Focus. – 1990. – V. 12. – P. 13–15.
13. Galli, Z. Molecular identification of commercial apple cultivars with microsatellite markers / Z. Galli, G. Halász, E. Kiss, L. Heszky, J. Dobránszki // HortScience. – 2005. – T. 40. – №. 7. – C. 1974–1977.
14. Palmieri, L. Establishment of molecular markers for germplasm management in a worldwide provenance *Ribes* spp. Collection / L. Palmieri, M.S. Grando, M. Sordo et al // Plant Omics. – 2013. – № 6 (3). – P. 165–174.
15. Russell, J. The use of genotyping by sequencing in blackcurrant (*Ribes nigrum*): developing high-resolution linkage maps in species without reference genome sequences / J. Russell, C. Hackett, P. Hedley et al. // Molecular breeding. – 2014. – № 33 (4). – P. 835–849.
- B.B. Smajlov, N.N. Galiakparov // Almaty. Nauchno-metodicheskie rekomendacii instituta biologii i biotekhnologii rastenij. – 2017. – 50 s.
5. Pikunova, A.V. Polimorfizm mikrosatelitnyh lokusov u sortov chernoj smorodiny (*Ribes nigrum* L.) iz kolekcii VNIISPK / A.V. Pikunova, S.D. Knyazev, A.Yu. Bahotskaya i dr. // Sel'skohozyajstvennaya biologiya. – 2015. – T. 50. – № 1. – S. 46–54.
6. Pomologiya. Tom IV. Smorodina. Kryzhovnik / pod red. E.N. Sedova. – Orel: VNIISPK. – 2009. – 468 s.
7. Hlestkina, E.K. Molekulyarnye markery v geneticheskikh issledovaniyah i v selekcii / E.K. Hlestkina // Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii. – 2015. – T. 17. – № 4/2. – S. 1044–1054.
8. Antonius, K. Development of the Northern European *Ribes* core collection based on a microsatellite (SSR) marker diversity analysis / K. Antonius, S. Karhu, H. Kaldm et al // Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization. – 2012. – P. 70–73.
9. Brennan, R. Development and characterization of SSR markers in *Ribes* species / R. Brennan, L. Jorgensen, M. Woodhead, J. Russell // Molecular Ecology Notes. – 2002. – V. 2. – №. 3. – P. 327–330.
10. Brennan, R. 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 / R. Brennan, L. Jorgensen, C. Hackett et al. // Euphytica. – 2008. – V. 161 (1-2). – P. 19–34.
11. Cavanna, M. Microsatellite-based evaluation of *Ribes* spp. Germplasm / M. Cavanna, D.T. Marinoni, G.L. Beccaro et al. // Genome. – 2009. – V. 52. – №. 10. – P. 839–848.
12. Doyle, J.J. Isolation of plant DNA from fresh tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // Focus. – 1990. – V. 12. – P. 13–15.
13. Galli, Z. Molecular identification of commercial apple cultivars with microsatellite markers / Z. Galli, G. Halász, E. Kiss, L. Heszky, J. Dobránszki // HortScience. – 2005. – T. 40. – №. 7. – C. 1974–1977.
14. Palmieri, L. Establishment of molecular markers for germplasm management in a worldwide provenance *Ribes* spp. Collection / L. Palmieri, M.S. Grando, M. Sordo et al // Plant Omics. – 2013. – № 6 (3). – P. 165–174.
15. Russell, J. The use of genotyping by sequencing in blackcurrant (*Ribes nigrum*): developing high-resolution linkage maps in species without reference genome sequences / J. Russell, C. Hackett, P. Hedley et al. // Molecular breeding. – 2014. – № 33 (4). – P. 835–849.

LIST OF SOURCES

1. Gosudarstvennyj reestr selekcionnyh dostizhenij, dopushchennyh k ispol'zovaniyu. T. 1. Sorta rastenij. M. – 2020.
2. Knyazev, S.D., Selekcija smorodiny chernoj na sovremenom etape / S.D. Knyazev, T.P. Ogol'cova. – Orel: Izd-vo Vserossijskogo nauchno issledovatel'skogo instituta selekcii plodovyh kul'tur. – 2004. – 238 s.
3. Mezhnina, O.A. Ocenka geneticheskogo raznoobrazija i razrabotka metodov DNK-identifikacii sortov i predstavitelej vidov yagodnyh kul'tur *Fragaria* L. i *Ribes* L., avtoref. ... kand. biology. nauk / O.A. Mezhnina – 2017. – 25 s.
4. Omasheva, M.E. Molekulyarno-geneticheskaya pasportizacija sortov yabloni / M.E. Omasheva, A.S. Pozharskij,