

На правах рукописи

ДОЛЖИКОВА МАРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

Оценка генетического разнообразия, генетическое картирование с помощью SNP и SSR маркеров красной смородины (*Ribes rubrum* L.)

Специальность 1.5.7. – Генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2025

Диссертационная работа выполнена в группе лаборатории биохимической генетики отдела биотехнологии и молекулярной генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур» (ФГБНУ ВНИИСПК).

**Научный
руководитель:**

Пикунова Анна Викторовна

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией биохимической генетики отдела биотехнологии и молекулярной генетики ФГБНУ ВНИИСПК, г. Орел

**Официальные
оппоненты:**

Шнеер Виктория Семеновна

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук, г. Санкт-Петербург

Швачко Наталия Альбертовна

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией постгеномных исследований ВИР, г. Санкт-Петербург

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр имени И. В. Мичурина» (ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина»), г. Мичуринск

Защита состоится «__» _____ 2025 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 24.1.235.01, созданного на базе ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР), по адресу: 190031, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 44, телефон: 8(812) 312-51-61; факс: 8(812) 570-47-70.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова и на сайте института: www.vir.nw.ru в разделе «Образование – Диссертационный совет».

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Рогозина Елена Вячеславовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности проблемы. На современном экономическом этапе развития садоводства в Российской Федерации роль сорта значительно возросла. Однако, создание новых сортов – длительный, сложный и дорогостоящий процесс. Так, на выведение сорта красной смородины до передачи на государственное сортоиспытание необходимо минимум 14 лет. Поэтому традиционные методы селекции дополняются наиболее точными молекулярными методами.

Все виды, относящиеся к *Ribes*, обладают диплоидным геномом из восьми пар хромосом ($2n=16$). Размер генома, выявленный при использовании проточной цитометрии, для *R. petraeum* Wulf., *R. uva-crispa* L. в среднем равен $2C = 1,91$ пг, содержание GC-пар – 40,4 % (Chiche et al., 2003). Полиплоидия в эволюционном процессе красной смородины повлияла на процесс образования форм весьма незначительно.

Исследования сцепления генов – важный подход, который используется как для картирования генома, так и в генетико-селекционной деятельности. Разработка генетической карты красной смородины и исследования по генетической паспортизации отечественных сортов ограничены работами нашей исследовательской группы (Пикунова и др., 2019; Пикунова и др., 2020; Должикова и др., 2021; Должикова и Павленко, 2021; Пикунова и др., 2024).

Таким образом, ДНК-паспортизация сортов и разработка генетической карты красной смородины является актуальной задачей. На основании полученных знаний в дальнейшем могут быть разработаны инструменты для маркер-вспомогательной селекции, выявлены конкретные гены, влияющие на хозяйственно-полезные признаки для эффективной работы с генетическими ресурсами и целенаправленному вовлечению хозяйственно-важных генов в процесс селекции. Идентификация сортов, основанная на генетических паспортах, будет полезна как на стадии менеджмента коллекций генетических ресурсов, так и в защите прав селекционеров, сертификации посадочного материала, разрешении юридических споров.

В классическом селекционном подходе генетическое разнообразие рассматривается на основе фенотипических данных и родословных. Однако родословные часто неизвестны, имеют неполную информацию либо могут содержать ошибки. Также нестабильная таксономическая классификация внутри рода смородины ставит новые задачи по изучению генетического разнообразия рода. В данной работе впервые был применен метод генотипирования путем секвенирования (GBS) для изучения генетического разнообразия генофонда красной смородины.

Цель исследований: изучение генетического разнообразия и структурной организации генома красной смородины с помощью ДНК-маркеров для повышения эффективности селекционного процесса.

Задачи проведения исследований:

1. Изучить полиморфизм микросателлитных локусов сортообразцов красной смородины (*R. rubrum*) биоресурсной коллекции ВНИИСПК.
2. Сформировать базу данных (БД) микросателлитных локусов сортов красной смородины.
3. Составить генетические паспорта сортов красной смородины на основании полиморфизма микросателлитных локусов.
4. Построить дендрограмму генетического сходства сортов красной смородины в целях проверки родословных у родственных сортов на основании полиморфизма микросателлитных локусов.
5. Провести изучение генетического разнообразия генофонда красной смородины методом генотипирования путем секвенирования (GBS) на основе выявленных SNP-маркеров.

6. Составить генетическую карту красной смородины с применением SSR и SNP ДНК-маркеров.

Методология и методы исследования. Детальное описание генетического материала, методов генетического анализа и статистической обработки полученных данных приводится в Главе 2 диссертации и в автореферате.

Научная новизна. Впервые проведена работа по изучению генетического разнообразия красной смородины биоресурсной коллекции ВНИИСПК с использованием SSR и SNP маркеров методом высокопроизводительного генотипирования (GBS).

Впервые в мире построена генетическая карта красной смородины на основе подобранных ДНК-маркеров.

Практическая значимость. Созданные ДНК-паспорта могут использоваться для идентификации сортовой принадлежности. Генетическая карта, разработанная на основе SSR и SNP маркеров, послужит основой для локализации генов, детерминирующих хозяйственно-ценные признаки. Разработанная методическая база (набор микросателлитных локусов, условия их амплификации и детекции, возможность мультиплексирования, выявленные редкие и уникальные аллели) формализует процесс ДНК-идентификации сортов красной смородины, что очень важно для научно-селекционных учреждений.

Положения, выносимые на защиту

1. Высокий уровень аллельного разнообразия сортов красной смородины коллекции ВНИИСПК, выявленный при помощи микросателлитного анализа, позволил выявить уникальные и редкие аллели и уникальные сочетания аллелей, что свидетельствует о разнообразии изучаемой коллекции.
2. Разработанная база данных полиморфизма 14 микросателлитных локусов 74 сортообразцов красной смородины биоресурсной коллекции ВНИИСПК, основанная на подборе наиболее полиморфных и информативных локусов, может использоваться в селекции для оценки генетической подлинности, изучения генетического разнообразия исходных форм, менеджмента генетических коллекций.
3. Полученная первая в мире генетическая карта красной смородины с применением микросателлитных и SNP ДНК-маркеров в дальнейшем послужит основой для локализации генов, детерминирующих хозяйственно-ценные признаки.

Апробация результатов работы. Материалы диссертации представлены и доложены на международных и всероссийских конференциях: VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ (г. Санкт-Петербург, 2019); Региональной научно-практической конференции «Наука без границ и языковых барьеров» (ГАУ, г. Орел, 2020); Всероссийской научно-практической онлайн-конференции молодых учёных и специалистов «Молодые учёные и инновационная сельскохозяйственная наука» (ФГБНУ ВНИИСПК, г. Орёл, 2021); XXI-ой научной конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (ФГБНУ ВНИИСБ, г. Москва, 2021); Всероссийской конференции «Генетические ресурсы растений для генетических технологий: к 100-летию Пушкинских лабораторий ВИР» (г. Санкт-Петербург, 2022); Всероссийской научно-практической онлайн-конференции молодых учёных и специалистов «Достижения и перспективы молодых учёных в науке» (ФГБНУ ВНИИСПК, г. Орел, 2023); Всероссийской научной конференции, проходящей в рамках Второго научного Форума «Генетические ресурсы России» Генетические ресурсы растений для генетических технологий (г. Санкт-Петербург, 2023).

Публикации результатов исследований. Результаты исследования опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК, и входящих в международные системы цитирования Scopus и Web of Science.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю кандидату биологических наук Пикуновой Анне Викторовне за научные и методические рекомендации, за постоянное внимание к работе, просмотр и редакцию рукописи, ценные замечания.

Автор выражает благодарность Голяевой Ольге Дмитриевне, кандидату сельскохозяйственных наук, селекционеру за помощь в подборе объектов исследования, предоставление растительного материала, за ценные советы и помощь на протяжении всего периода выполнения и написания диссертационной работы.

Автор выражает благодарность биоинформатикам Денису Валерьевичу Горюнову (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова) и Светлане Валерьевне Горюновой (Федеральный исследовательский центр картофеля им. А.Г. Лорха) за помощь в проведении ряда биоинформатических расчетов, представленных в данной научной работе.

Личный вклад автора. Результаты исследований получены автором лично и совместно с сотрудниками лаборатории биохимической генетики отдела биотехнологии и молекулярной генетики и лаборатории селекции и сортоизучения смородины Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур (ФГБНУ ВНИИСПК).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 160 страницах. Состоит из введения, основной части, содержащей 9 таблиц и 10 рисунков, заключения, выводов, рекомендаций, списка литературы, приложений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В главе приведен структурированный анализ отечественной и зарубежной научной литературы, посвященной красной смородине как сельскохозяйственной культуре, изучению красной смородины молекулярно-генетическими методами. В частности, проанализировано изучение красной смородины с помощью различных типов ДНК-маркеров (SSR, SNP и других), рассмотрен вопрос проблематики изучения генетического разнообразия данной культуры. Проанализированы методы ДНК-идентификации сортов. Подробно рассмотрен вопрос генетического картирования и поиска локусов количественных и качественных признаков.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Материалы исследования. В работе использована коллекция из 74 сортов красной смородины биоресурсной коллекции ВНИИСПК, отборный сеянец (ос) 1426-21-80 и *R. multiflorum* и расщепляющаяся популяция: Белая Потапенко × ос 1426-21-80 (140 образцов, включая родительские формы).

Методы исследования. ДНК выделяли СТАВ методом по методике Doyle, Doyle с модификациями (1990). Анализ ПЦР продуктов был проведен в 1,7 % агарозном геле и 8 % полиакриламидном геле с последующим окрашиванием нитратом серебра. Окончательное разделение фрагментов проводили путем капиллярного электрофореза (ABI prism Genetic Analyzer 3010).

На первоначальном этапе осуществили подбор микросателлитных локусов для дальнейших исследований. Всего протестировано на небольшой выборке образцов около 70 пар праймеров микросателлитных локусов. Часть из них были ранее опубликованы и использовались для изучения представителей рода смородина зарубежными исследовательскими группами (Brennan et al., 2002; Russell et al., 2014 и др.), а науклеотидные последовательности остальных пар праймеров были разработаны на основе базы данных NCBI и предоставлены Nahla Bassil.

Основной прием оптимизации условий ПЦР, использованный в данной работе – повышение/снижение температуры отжига праймеров. Остальные параметры – концентрация хлорида магния, концентрация праймеров, концентрация ДНК, число циклов амплификации сохранялись достаточно жесткими, во избежание неспецифической амплификации. При наличии неспецифических профилей амплификации (в широком диапазоне размеров) температура отжига повышалась, если после повышения все фрагменты равномерно «блекли», но оставались, то профиль считали неспецифическим для микросателлитных локусов.

Таким образом, были подобраны 14 микросателлитных локусов для анализа сортов красной смородины (g1-K04, g1-M07, e1-O01, g2-H21, g2-G12, g2-L17, e1-O21, g1-L12, g2-J08, Cra-489, Cra-531, e3-B02, g1-A01, gr2-J05 и 16 микросателлитных локусов (gr2-J05, g1-M07, g1-K04, g2-J08, g2-B20, Cra-489, e1-O21, e3-B02, g1-A01, g1-L12, e1-O01, Cra-531, g2-G12, g2-J11, e1-O20, g1-PO1) для анализа расщепляющейся популяции.

Для выявления SNP маркеров использован подход секвенирования ДНК-библиотек с уменьшенной сложностью генома (GBS). Отсеквенированные прочтения обработаны в программе Tassel. Биоинформатическая обработка сиквенсов, SNP коллинг осуществлялись Д.В. Горюновым в рамках заказного НИР по гранту РНФ. Визуализация данных в формате fsa проводилась в бесплатной программе PeakScannerSoftware_v01.

Построение дендрограммы осуществлялось с помощью программы PAST. MDS-анализ генотипов был выполнен в програмном обеспечении Tassel 5 и визуализирован в ggplot2 и ggrepel R библиотеки. Admixture-анализ GBS данных был проведен в пакете LEA R. Генетическая карта построена с применением программы Join Map 3.

Для каждого микросателлитного маркера был рассчитан коэффициент информативности (PIC, Polymorphic Information Content) по формуле $PIC = 1 - \sum(P_j)^2$, где P_j это частота встречаемости j-той аллели, у всех проанализированных генотипов в выборке.

Показатели полиморфизма локусов в выборке определяли с использованием программы GenAlEx 6.2 (Peakall, Smouse, 2006). Показатели гетерозиготности были рассчитаны с использованием программы GeneCap.

Глава 3. Результаты и обсуждение

Полиморфизм микросателлитных локусов сортов красной смородины. На начальном этапе выполнения исследований была проведена работа по подбору оптимальных наборов SSR маркеров. Подобраны 14 локусов для масштабного тестирования на изучаемой выборке (76 сортообразцов). Локусы в целях оптимизации выполнения поставленных задач опытным путем были сгруппированы в несколько групп (мультиплексов) (Таблица 1).

Таблица 1 – Мультиплексные наборы микросателлитных локусов

Локус	ГС	Флуоресцентная метка	t отжига, °C
Мультиплекс 1			
g1-K04	1	FAM	52
g1-M07	1	R6G	52
e1-O01	6	FAM	54
Мультиплекс 2			
g2-H21	4	FAM	50
g2-G12	7	R6G	54
g2-L17	4	FAM	50
e1-O21	4	R6G	50
Мультиплекс 3			
g1-L12	5	FAM	52

g2-J08	2	R6G	54
Мультиплекс 4			
Cra-489	3	FAM	50
Cra-531	6	R6G	52
e3-B02	5	FAM	52
Мультиплекс 5			
g1-A01	5	FAM	52
gr2-J05	1	FAM	52

*ГС-группа сцепления

Практически для всех сортообразцов получены уникальные микросателлитные профили, основанные на: амплификации уникальных и редких; амплификации уникального сочетания аллелей в одном локусе и уникальном мультилокусном профиле. Исключение составили две пары сортообразцов: Caskad и Red Cross, Рубин и Алтайская рубиновая. Профили сортообразцов Caskad и Red Cross идентичны друг другу, хотя и отличаются от остальных. Сорты Red Cross (Вишневая × White Grape) и Caskad (свободное опыление сорта Диплом (Вишневая × White Grape) выведены в США и имеют общих предков. Сорт Алтайская рубиновая произошел от свободного опыления сорта Файя плодородная, а у сорта Рубин – происхождение неизвестно. Можно предположить, что в коллекции под разными именами присутствует один и тот же генотип или, что данные пары сортов настолько схожи, что полиморфизма проанализированных локусов недостаточно для их различия и идентификации.

Провести идентификацию по уникальному сочетанию аллелей в одном локусе удалось для 24 сортов. Выявлены сорта, для идентификации которых необходимо проанализировать одновременно от 2 до 4 локусов, так как они уникальны не сочетанием аллелей в конкретном локусе, но сочетанием нескольких локусов, что в совокупности дает идентификационную формулу. Мультилокусные профили идентифицированы у 44 сортов среди всей проанализированной выборки.

При разработке систем идентификации генотипов важное значение имеет воспроизводимость результатов анализа – возможность получать одинаковые результаты в разных лабораториях, на которую существенно влияет методика детекции. Несмотря на хорошую воспроизводимость результатов микросателлитного анализа, небольшие изменения в методике проведения 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. Поэтому в практику проведения анализа входит использование сортов контролей с известными генотипами.

Зная абсолютные («истинные») размеры контрольного образца, легко вычислить фактор конверсии (сдвига) для всех исследуемых генотипов. В связи с этим, единый контроль необходим в каждой серии генотипируемых образцов.

В ходе выполнения исследований были подобраны сорта-контроли для идентификации генотипов, использование которых позволит сопоставлять данные полученные с некоторыми вариациями методической части. В качестве контролей предложены достаточно востребованные в производстве сорта селекции ВНИИСПК: Газель (Чулковская × Maarses Prominent) и Валентиновка (Rote Spatlese × Jonkheer van Tets).

Основываясь на полученных микросателлитных профилях по 74 изучаемым сортам, проанализировано распределение аллелей и показатели полиморфизма по изучаемым микросателлитным локусам (Таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика полиморфизма микросателлитных локусов, идентифицированных у 74 сортов красной смородины

Локус	Перечень аллелей	Число аллелей	Ожидаемая гетерозиготность	Наблюдаемая гетерозиготность	Индекс полиморфизма	Число уникальных аллелей	Число редких аллелей *	Среднее число аллелей на сорт
g1-K04	298, 299, 306, 307, 308, 309, 312, 313, 315, 317, 318, 319, 320, 321	14	0,73	0,74	0,76	6	3	1,8
e1-O01	132, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 144, 145, 149, 158	11	0,81	0,68	0,81	2	2	1,7
Cra-489	233, 235, 236, 237, 238, 240, 241	7	0,76	0,82	0,75	0	3	1,5
g1-L12	210, 212, 213, 214, 216, 217, 220, 222, 224, 226, 228, 233, 234	13	0,82	0,86	0,82	3	2	1,8
g1-A01	204, 206, 207, 210, 214, 216, 218, 220, 222, 226, 228	11	0,82	0,85	0,81	2	3	1,8
g2-L17	125, 128, 135, 137, 144, 156, 159	7	0,77	0,64	0,72	2	1	1,3
gr2-J05	179, 185, 187	3	0,47	0,41	0,51	1	0	1,3
g2-H21	249, 251, 252, 253, 254, 256	6	0,68	0,67	0,71	0	1	1,7
e3-B02	154, 162, 165, 168, 170, 171	6	0,58	0,62	0,62	1	1	1,6
g2-J08	141, 149, 151, 153, 161, 165, 166, 167, 168, 169, 172, 176,	16	0,88	0,48	0,84	5	2	1,5

	177, 179, 180, 185							
g1- M07	202, 206 , 211, 216, 219	5	0,56	0,23	0,67	1	1	0,9
e1-O21	295, 302, 304 , 308, 309, 312, 317, 320	8	0,73	0,78	0,76	2	1	0,1
g2-G12	179, 181, 183, 185, 187, 189, 191	7	0,74	0,85	0,74	0	2	0,1
Cra- 531	162, 165, 168, 171, 174, 177	6	0,75	0,82	0,74	0	0	0,1

*частота аллеля в изученной выборке не превышает 5%; **полужирным** шрифтом указаны уникальные аллели; *курсивом* указаны редкие аллели

База данных микросателлитных локусов сортов красной смородины биоресурсной коллекции ВНИИСПК. По полученным данным была создана база данных по 14 микросателлитным локусам для 74 сортообразцов красной смородины (ПАТЕНТ № 2024620177).

База данных состоит из таблиц, в которых содержатся: перечень микросателлитных локусов, нуклеотидные последовательности пар праймеров, температура амплификации, наборы локусов для одновременной детекции, флуоресцентные метки; перечень аллелей, амплифицируемых во всех проанализированных микросателлитных локусах; информация о родословной анализируемых генотипов, оригинаторе сорта, идентификационная формула генотипа и сводная таблица.

Разработанная система микросателлитного анализа будет востребована в селекции для оценки генетической подлинности, однородности и гибридности селекционных форм; изучения генетического разнообразия исходных форм и менеджмента генетических коллекций. Полученные данные могут быть использованы в питомниководстве и садоводстве для различения сортов и форм, а также для составления генетических паспортов.

Генетическая паспортизация сортов красной смородины. На основании сформированной базы данных по полиморфизму микросателлитных локусов были составлены генетические паспорта сортов красной смородины. Генетический паспорт разрабатывается в целях проверки подлинности образцов конкретного сорта и для проверки идентичности сортового материала (Рыбаков и др., 2021; Gavrilenko, Chukhina, 2020).

В данной работе генетические паспорта сортов красной смородины содержат информацию о полиморфизме 14 SSR локусов, электрофореграммы с редкими/уникальными аллелями, редким/уникальным сочетанием аллелей и основную краткую информацию о сорте: информацию об учреждении, в котором сорт был создан; о годе внесения в Госреестр («Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию» (State Register for Selection Achievements Admitted for Usage. 2024. URL: <https://reestr.gossortrf.ru/>), информацию об авторах сорта и фотографию сорта.

Для 18 сортов красной смородины различного происхождения из биоресурсной коллекции ВНИИСПК были сформированы генетические паспорта: Ася, Баяна, Валентиновка, Вика, Газель, Дана, Мармеладница, Нива, Осиповская, Альфа, Константиновская, Коралл, Мечта, Надежда, Натали, Память Губенко, Ранняя сладкая,

Сахарная. Выявлены редкие и уникальные аллели, которые могут быть использованы для подтверждения сортовой принадлежности и охраны авторских прав.

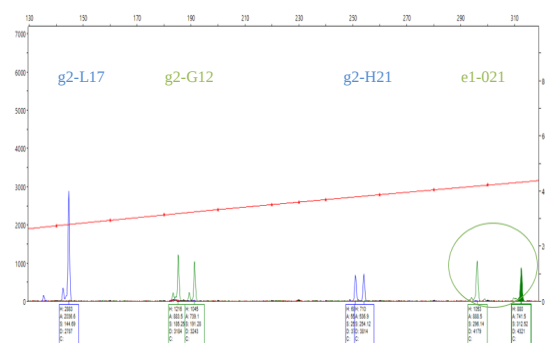
Ниже представлен генетический паспорт сорта красной смородины Валентиновка (Таблица 3). Генетический паспорт содержит основную информацию о сорте и электрофореграммы полиморфизма по всем изучаемым микросателлитным локусам. В таблице полужирным шрифтом выделено уникальное сочетание аллелей. Данное сочетание аллелей у других сортов проанализированной выборки не встречается. Поэтому для идентификации сорта Валентиновка, в пределах изученной выборки сортов, можно проанализировать всего один локус.

Таблица 3 – Генетический паспорт сорта Валентиновка

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ	
Сорт	Валентиновка
Оригинатор	ВНИИСПК, Орел Россия
Происхождение	Rote Spatlese × Jonkheer van Tets
Автор	Баянова Л.В.
Год внесения в Госреестр	2001
Местонахождение	Биоресурсная коллекция ВНИИСПК
SSR локус	Размер (п.н.)
g1-K04	306/313
g1-M07	219
e1-O01	138/144
Cra-489	237
Cra-531	165/168
e3-B02	162/165
g2-L17	144
g2-G12	185/191
g2-H21	251/254
e1-O21	295/312
gr2-J05	187
g1-A01	207/210
g2-J08	180
g1-L12	214/216

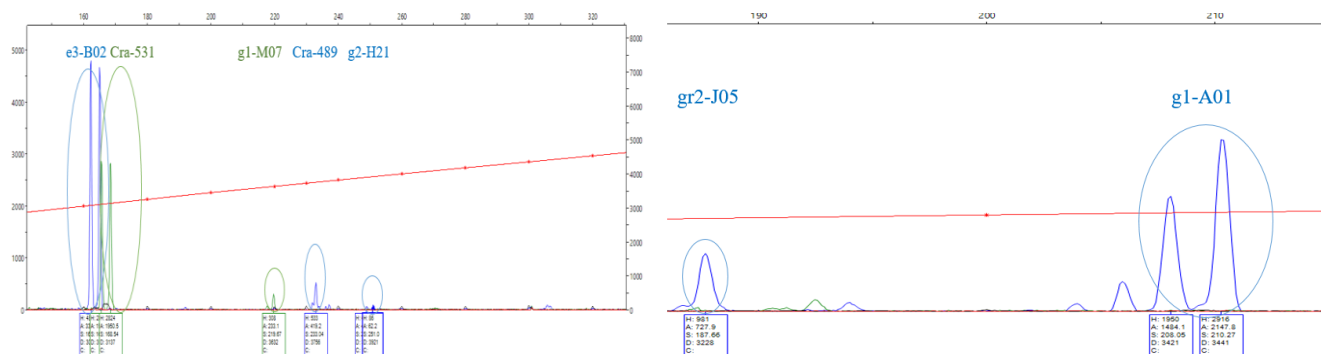


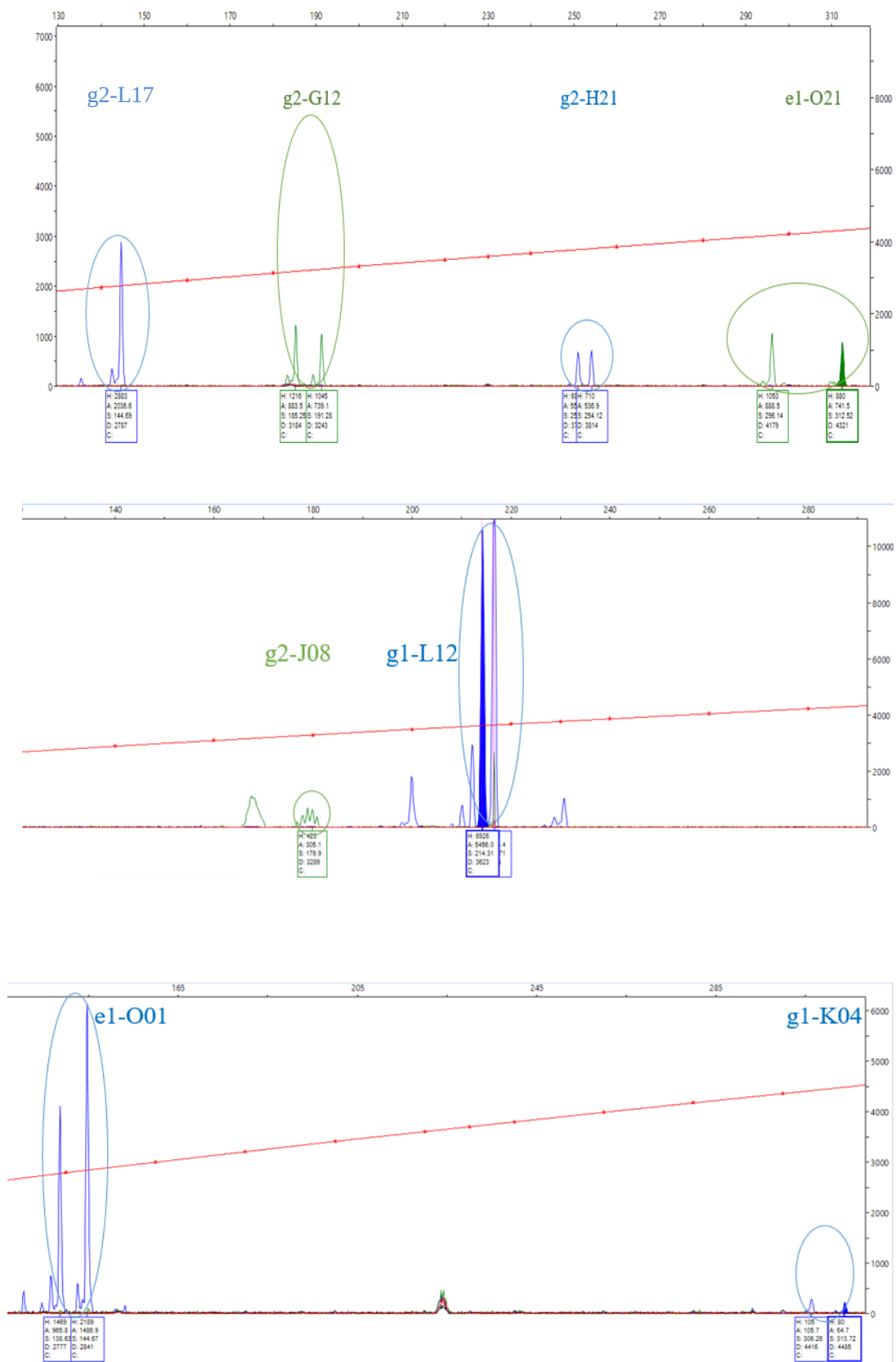
а) сорт Валентиновка



б) электрофореграмма (уникальное сочетание аллелей в локусе e1-O21)

с) электрофореграммы сорта Валентиновка (приложение к генетическому паспорту)





Изучение генетического разнообразия сортов красной смородины на основании кластерного анализа по данным микросателлитных локусов. На основе SSR-спектров методом кластерного анализа была построена дендрограмма сходства для 73 сортобразцов (сорт Rote Spatlese был исключен из-за большого количества выпадов) (Рисунок 1).

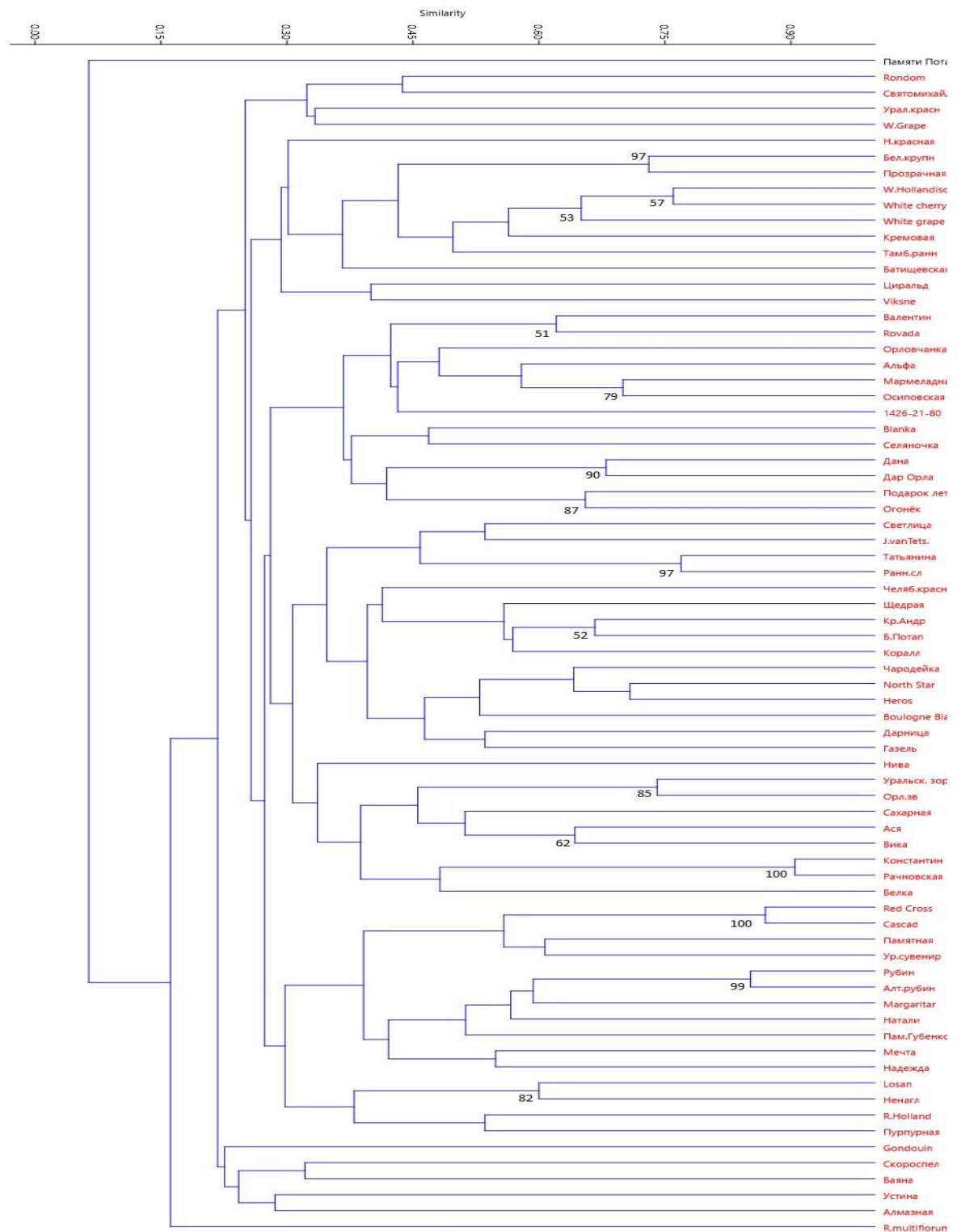


Рисунок 1 – Дендрограмма генетического сходства сортов красной смородины, построенная на основе результатов SSR-анализа

Полученные по всем сортам красной смородины значения коэффициентов попарного сходства варьировали от 0,15 до 0,91. Вид смородины красной *R. multiflorum* присоединился к кластеру красной смородины на расстоянии 0,16 – это говорит о его отличии от всех проанализированных сортов красной смородины. В кластере красной смородины из 15 групп с высокой бутстреп-поддержкой в 6 наблюдается явное родство генотипов по данным родословных (общие сорта в первом или втором поколении). При этом у ряда сгруппировавшихся вместе сортов родословные неизвестны (не известен хотя бы один или оба родителя). Филогенетические отношения красной смородины с использованием ДНК-маркеров изучались в основном совместно с другими представителями *Ribes*, такими как черная смородина, крыжовник и другими (de Mattia et al., 2008; Пикунова и др., 2015; Antonius et.al., 2012; Palmieri et.al., 2013 и др.).

Таким образом, проделанная нами работа является самой масштабной работой по изучению отечественного генофонда красной смородины с применением ДНК маркеров.

Исследование генетического разнообразия красной смородины с помощью GBS анализа. В данном разделе исследований было продолжено изучение генетического разнообразия генофонда красной смородины. Среди всех проанализированных образцов 26 являются потомками *R. rubrum*, 14 гибридов являются потомками *R. rubrum* × *R. petraeum*, 19 образцов, содержащих одновременно в родословной все три вида: *R. petraeum*, *R. multiflorum* Kit., *R. rubrum*, один потомок *R. spicatum* Robson, один потомок *Ribes warszewiczii* Jancz. и два потомка *R. multiflorum* от F₁ (Rondom) и от F₂ (Дарница). Родословная 10 образцов в настоящее время неизвестна.

На основе полученных данных GBS был проведен анализ многомерного масштабирования (MDS) (Рисунок 2).

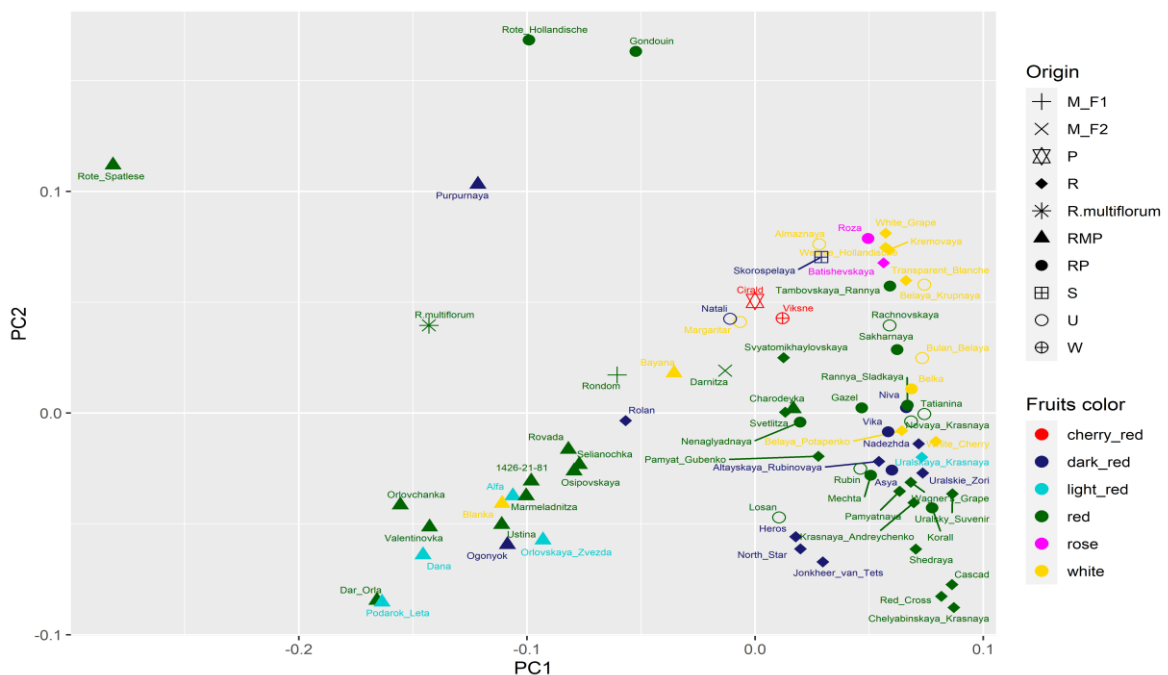


Рисунок 2 – График MDS основан на данных GBS о полиморфизме 75 генотипов красной смородины биоресурсной коллекции ВНИИСПК. M_F₁ – F₁ потомок *R. multiflorum*; M_F₂ – F₂ потомок *R. multiflorum*; P – F₁ потомок *R. altissimum* Turcz.; R – потомок *R. rubrum*; RMP – потомок *R. rubrum*, *R. multiflorum* и *R. petraeum*; RP – потомок *R. rubrum* и *R. petraeum*; S – потомок *R. palczewskii* (Jancz.) Pojark; U – происхождение неизвестно, W – потомок *R. warszewiczii*

Далее был проведен Admixture анализа GBS-данных на всей выборке изучаемых сортов красной смородины, содержащей 75 сортов различного происхождения. В результате проведения анализа было выявлено 6 кластеров (Рисунок 3).

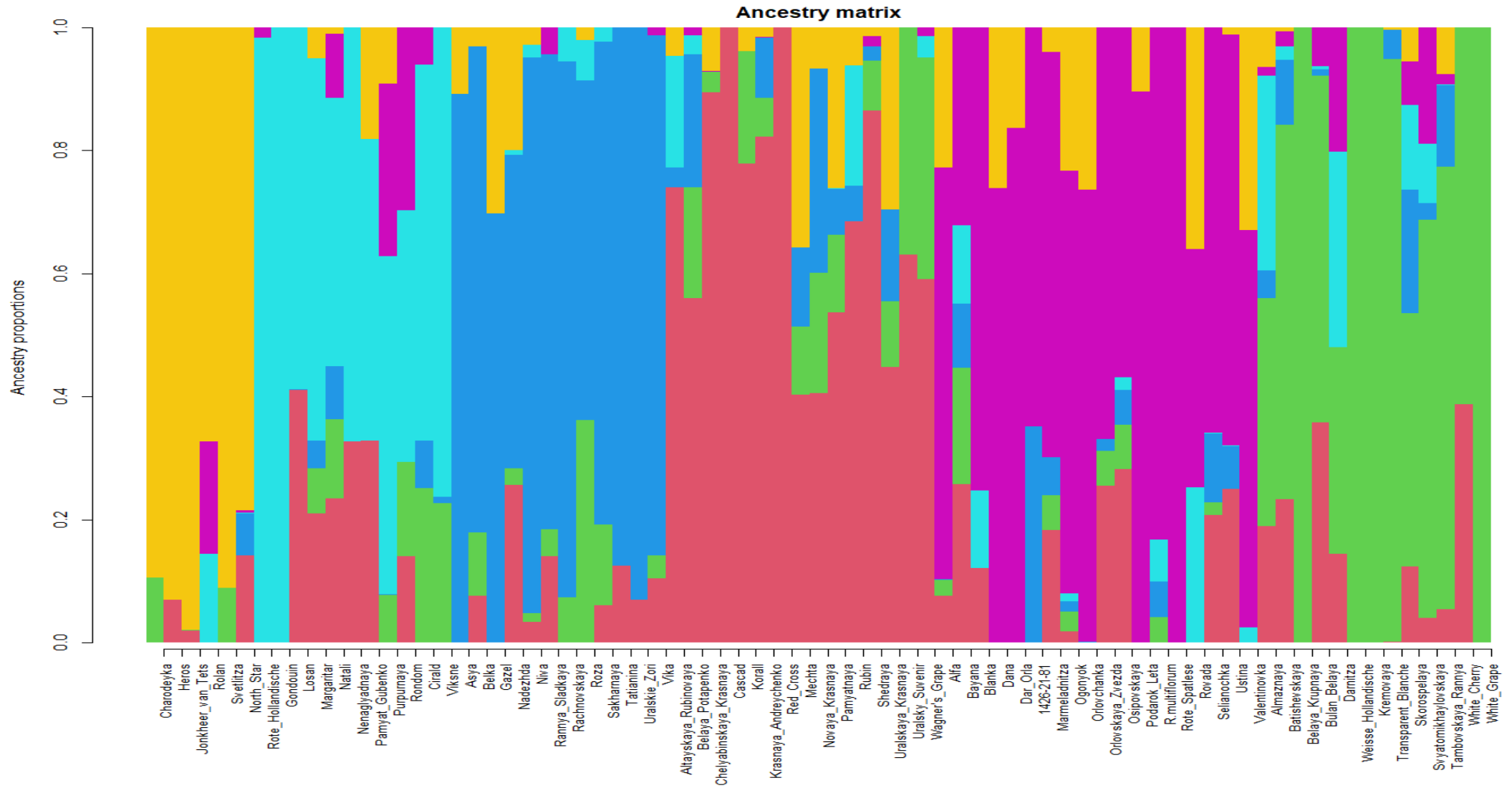


Рисунок 3 – Популяционная структура 75 генотипов красной смородины. Различными цветами указаны кластеры. По оси x указаны названия сортов анализируемой выборки. Ось y – указывает на вероятность того, что каждый генотип принадлежит к определенному кластеру

Admixture-анализ выявил присутствие примесей SNP из других кластеров во всех кластерах, что подчеркивает сложную родословную большинства проанализированных сортов. MDS график и Admixture-анализ дополняют друг друга. На графике MDS сорта красной смородины из одного кластера расположены в основном вместе.

Сравнивая данные микросателлитных локусов и GBS анализа можно отметить, что в целом данные совпадают и взаимоподтверждаются. Исключение составили сорта Орловская звезда и Уральские зори. Так как в происхождении данных сортов нет общих предков, можно предположить, что всё же данные сорта входят в разные кластеры и GBS анализ наиболее точно это подтверждает.

Таким образом, показано, что большинство сортов красной смородины имеют высокую степень генетического сходства, но одновременно было выявлено несколько генетически отличных сортов. Последние были результатом межвидовой гибридизации. Следовательно, наши исследования подтверждают, что межвидовые гибриды – важный источник для расширения генетического разнообразия красной смородины и применения межвидовых скрещиваний.

Анализ полиморфизма микросателлитных локусов в расщепляющейся популяции. В целях дальнейшего генетического картирования изучен полиморфизм микросателлитных локусов расщепляющейся популяции красной смородины от скрещивания сорта Белая Потапенко и ос 1426-21-80. Всего изучено 133 гибрида (ряд гибридов был исключен из анализа в связи с большим количеством выпадов). Данные 18 локусов (Cra-531, Cra-489, g1-A01, e3-B02, g2-B20, g1-K04, g1-M07, g2-J08, g2-G12, e1-O01, e1-O21, g1-L12, g2-J11, gr2-J05, e1-020, g1-po1, 37, 29) были протестированы и проанализированы на всей гибридной семье. Однако в дальнейшем локусы e1-020, g1-po1, 37, 29 были исключены из анализа в связи с неспецифической амплификацией.

В результате получены первичные данные полиморфизма расщепляющейся популяции по 14 микросателлитным локусам, которые были внесены в Excel и использованы для картирования.

Построение генетической карты красной смородины на основании SNP и SSR маркеров. Генетическая карта красной смородины включает как микросателлитные маркеры, так и SNP маркеры, для обнаружения которых использованы методы секвенирования нового поколения NGS (New Generation Sequencing) и генотипирования путем секвенирования (Genotyping by sequencing).

В работе была использована гибридная популяция (Белая Потапенко × ос 1426-21-80), в которую вошло 133 гибрида (ряд гибридов был исключен из анализа в связи с большим количеством выпадов).

Картируемая семья имеет сложное генетическое происхождение, в котором задействованы такие виды как смородина красная, смородина обыкновенная, смородина обыкновенная крупноплодная, смородина скалистая, смородина многоцветковая.

Типичный микросателлитный профиль и наличие полиморфных фрагментов наблюдались при амплификации следующих пар праймеров gr2-J05, g1-M07, g1-K04, g2-J08, g2-B20, e1-O21, e3-B02, g1-A01, g1-L12, e1-O01, g2-G12, Cra-531 и Cra-489. В локусе g2-J11 на картируемой популяции амплифицируются фрагменты в двух диапазонах (250–260 и 315–320 п.н.), что позволяет предположить дупликацию данного локуса в геноме исследуемых образцов.

В результате картирования построено восемь групп сцепления с уровнем LOD 10 (Рисунок 4), 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.

Число групп сцепления соответствует числу хромосом в гаплоидном наборе. У красной смородины 16 хромосом в диплоидном наборе, соответственно – 8 групп

сцепления. Группы сцепления пронумеровали сообразно группам сцепления генетической карты смородины черной (Brennan et al., 2008).

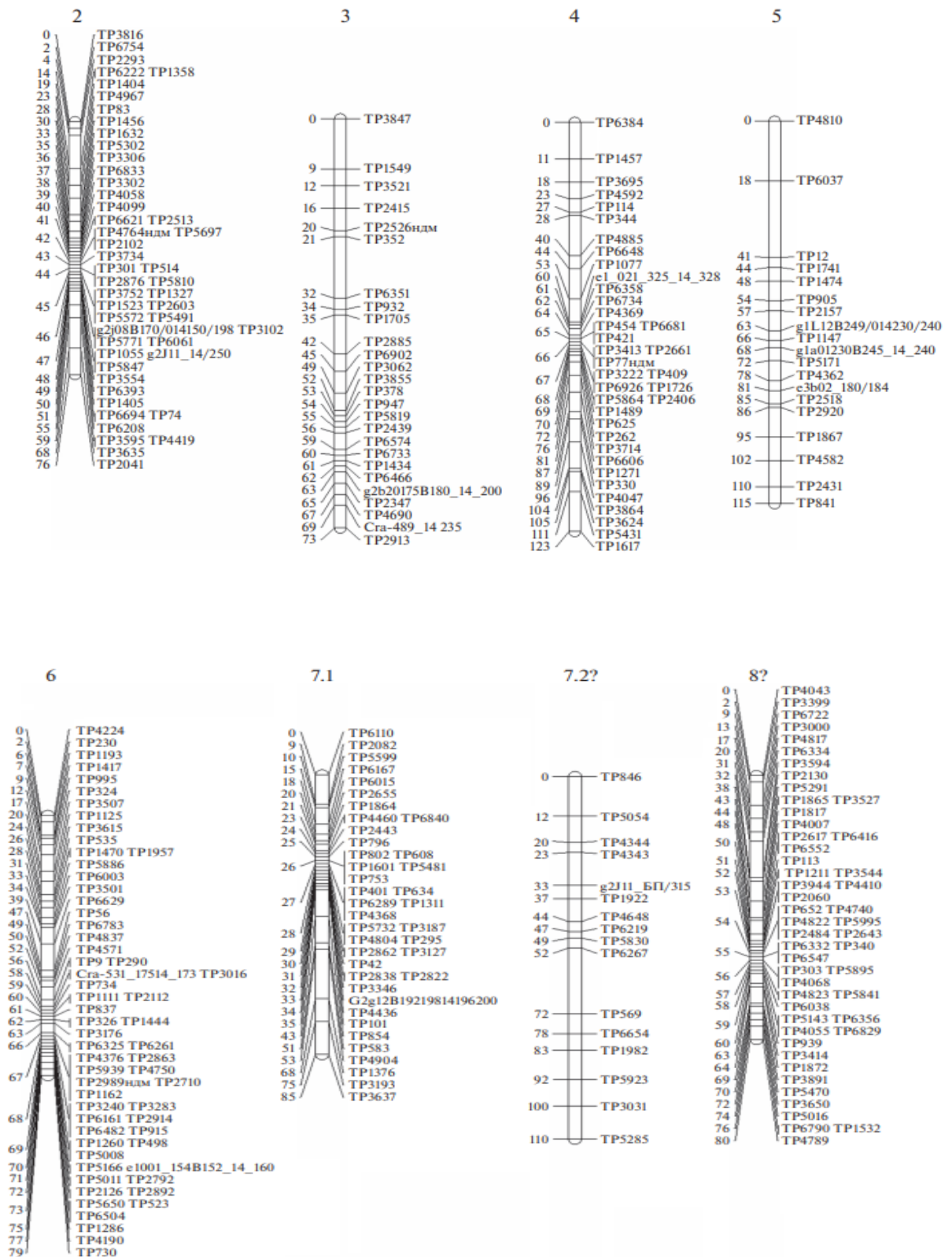


Рисунок 4 – Генетическая карта красной смородины

Три микросателлитных локуса не вошли ни в одну из групп сцепления (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. В семи из восьми групп сцепления картирован хотя бы один микросателлитный ДНК-маркер. 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, e1-O01 на карте черной смородины, размещенные соответственно в группах сцепления 2, 3, 4, 6, а на нашей карте также находятся каждый в отдельной группе сцепления. 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?). Одна из полученных групп сцепления составлена полностью из SNP-маркеров и, возможно, представляет восьмую группу сцепления.

Таким образом, большинство локализованных нами на карте красной смородины микросателлитных локусов корреспондируют с положением локусов на группах сцепления смородины черной. Локализовано также два новых, ранее не картированных и не опубликованных микросателлитных локуса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения диссертационной работы изучено генетическое разнообразие 76 сортообразцов красной смородины биоресурсной коллекции ВНИИСПК. Составлена первая в мире генетическая карта красной смородины в расщепляющейся популяции F₁ от скрещивания Белая Потапенко × ос 1426-2180 с помощью ДНК-маркеров для повышения эффективности селекционного процесса. Полученная генетическая карта будет служить основой для локализации хозяйственно-важных генов в геноме и в дальнейшем будет насыщаться новыми маркерами. В результате изучения генетического разнообразия сортов красной смородины с помощью SSR маркеров выявлены уникальные и редкие аллели, уникальные сочетания аллелей на основании которых составлены генетические паспорта для 18 сортов. Генетические паспорта имеют важное значение для установления сортовой принадлежности. По полученным данным создана база данных, на которую получено Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2024620177.

Проведена работа по изучению генетического разнообразия красной смородины как методом высокопроизводительного генотипирования (GBS) в сочетании с анализом родословных, на основе выявленных SNP маркеров, так и методом кластерного анализа по данным микросателлитных локусов. Сравнивая данные микросателлитных локусов и GBS анализа можно отметить, что в целом данные совпадают и взаимоподтверждаются – практически у всех групп сортов с высокой бутстреп-поддержкой так же объединились в кластеры при проведении GBS анализа. Большинство сортов имеют высокую степень генетического сходства, но одновременно было выявлено несколько генетически отличных сортов (результат межвидовой гибридизации). Следовательно, наши исследования подтверждают, что межвидовые гибриды – важный источник для расширения генетического разнообразия красной смородины и применения межвидовых скрещиваний.

Подводя итог проделанной научной работы, можно сделать вывод, что поставленные задачи были выполнены в полном объеме. Подчеркивая в очередной раз актуальность, хотелось бы отметить, что до получения результатов выполняемой работы, культура красной смородины была генетически изучена сравнительно мало. Полученные результаты послужат основой для развития дальнейших исследований данной культуры.

ВЫВОДЫ

1. В результате генотипирования сортов смородины красной по 14 микросателлитным локусам были выявлены уникальные и редкие аллели и уникальные сочетания аллелей, на основе которых удалось идентифицировать практически все генотипы.

2. Создана и выложена в открытом доступе база данных полиморфизма 14 микросателлитных локусов 74 сортообразцов красной смородины биоресурсной коллекции ВНИИСПК.
3. Составлены генетические паспорта 18 сортов красной смородины.
4. На основе SSR спектров построена дендрограмма сходства для 73 сортообразцов красной смородины. Не наблюдается крупных кластеров с хорошей бутстреп поддержкой. *R. multiflorum* формирует отдельную ветвь. Из 15 групп с высокой бутстреп-поддержкой в 6 наблюдается явное родство генотипов по данным родословных (общие сорта в первом или втором поколении). При этом у ряда сгруппировавшихся вместе сортов родословные неизвестны (не известен хотя бы один или оба родителя).
5. Проведена первая масштабная работа по изучению генетического разнообразия смородины красной методом высокопроизводительного генотипирования (GBS) в сочетании с анализом родословных на основе выявленных SNP-маркеров. Admixture анализ GBS-данных выборки сортов красной смородины выявил 6 кластеров. Внутри кластеров большинство образцов связаны родословной. Предположительно, кластеризация отражает родство с *R. petraeum* (2), *R. rubrum* (3), *R. vulgare* var *macrocarpum* (4), *R. multiflorum* (5), *R. vulgare* (6) и Jonkheer van Tets (1).
6. Анализ многомерного масштабирования (MDS) показал, что старые сорта, полученные от межвидовых скрещиваний Gondouin (*R. petraeum* × *R. vulgare*) и Rote Hollandische (*R. petraeum* × *R. rubrum*), Rote Spatlese (потомок *R. petraeum* F₂ и *R. multiflorum* F₁) генетически значительно отличаются от других генотипов. Следовательно, существует потенциал для расширения генетического разнообразия красной смородины за счёт применения межвидовых скрещиваний.
7. В результате исследований составлена первая в мире генетическая карта смородины красной с применением микросателлитных и SNP ДНК-маркеров

Список работ, опубликованных по теме диссертации

В журналах, рекомендованных ВАК, индексируемых в базах Scopus, Web of Science

1. Пикунова, А.В., Горюнова С.В., Горюнов Д.В., Должикова М.А., Голяева О.Д. Генетическая карта смородины красной (*Ribes rubrum* L.), построенная с применением SSR и SNP ДНК-маркеров // Генетика. – 2020. – Т. 56, № 11. – С. 1340-1344. <https://doi.org/10.31857/S0016675820100100>. – EDN FAGZVX
2. Пикунова А.В., Павленко А. А., Должикова М.А., Голяева О.Д., Князев С.Д. Тестирование микросателлитных локусов крыжовника на черной и красной смородине // Генетика. – 2024. – Т. 60, № 10. – С. 117-121. <https://doi.org/10.31857/S0016675824100114>. – EDN WEKCGY.

Другие издания

3. Pikunova A., Goryunova S., Golyaeva O., **Dolzhiyova, M.**, Pavlenko A., Kurashev O., Goryunov D. Plastome data of red currant and gooseberry reveal potential taxonomical issues within the *Ribes* genus (Grossulariaceae) // Horticulturae. – 2023. – Vol. 9, No. 9. – P. 972. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9090972>. – EDN OGJWUG
4. Должикова, М.А. ДНК-маркеры в изучении генома смородины красной / М.А. Должикова // Современное садоводство. – 2019. – № 4. – С. 1-15. <https://doi.org/10.24411/2312-6701-2019-10401>. – EDN GLDCCN
5. Должикова, М.А. Изучение полиморфизма микросателлитных локусов сортов смородины красной *Ribes Rubrum* / М.А. Должикова, А.А. Павленко, А.В.

- Пикунова, О.Д. Голяева // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2021. – №. 4. – С. 20-23.
6. **Должикова, М.А.** ДНК-паспортизация сортов смородины красной зарубежной селекции биоресурсной коллекции ВНИИСПК с применением SSR-маркеров / **М.А. Должикова, А.В. Пикунова, А.А. Павленко, О.Д. Голяева** // Современное садоводство. – 2023. – № 4. – С. 1-11. https://doi.org/10.52415/23126701_2023_0401. – EDN FOKHES
 7. **Pikunova, A., Goryunova, S., Goryunov, D., Golyaeva, O., Dolzhikova, M., Pavlenko, A.** Genetic diversity and pedigree analysis of red currant germplasm / **Dolzhikova, M.** // Plants. – 2022. – Vol. 11, No. 13. <https://doi.org/10.3390/plants11131623>. – EDN GSRVAO
 8. **Должикова, М.А.** Полиморфизм микросателлитных локусов семьи красной смородины (*Ribes rubrum* L.) Белая потапенко × 1426-21-80 / **М.А. Должикова, А.В. Пикунова, О.В. Калинина** // VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы: Сборник тезисов Международного Конгресса, Санкт-Петербург, 18–22 июня 2019 года. – Санкт-Петербург: ООО "Издательство ВВМ", 2019. – С. 850. – EDN XGTGLB
 9. **Пикунова, А.В., Должикова М.А., Голяева О.Д.** Полиморфизм микросателлитных локусов красной смородины (*Ribes rubrum* L.) генофонда ВНИИСПК, Орел / **М.А. Должикова** // VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы: Сборник тезисов Международного Конгресса, Санкт-Петербург, 18–22 июня 2019 года. – Санкт-Петербург: ООО "Издательство ВВМ", 2019. – С. 1111. – EDN BSMROG
 10. **Dolzhikova, M.A.** Study of polymorphism of microsatellite locuses of red currant (*Ribes rubrum* L.) of the RRIFCB gene pool / **M.A. Dolzhikova** // Наука без границ и языковых барьеров: Материалы региональной научно-практической конференции, Орёл, 29 сентября 2020 года. – Орёл: Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина, 2020. – Р. 52-54. – EDN PRYLDY
 11. **Должикова, М.А.** Генетическая паспортизация сортов смородины красной (*Ribes rubrum*) селекции ВНИИСПК / **М. А. Должикова, А. А. Павленко** // Селекция и сорторазведение садовых культур. – 2021. – Т. 8, № 1-2. – С. 26-30. <https://doi.org/10.24411/2500-0454-2021-10108>. – EDN CSADHW
 12. **Pavlenko A., Dolzhikova M., Pikunova A., Bakhotskaya A.** Use of SSR markers to study genetic polymorphism in members of the *Ribes* L. genus from the VNIISPK collection // E3S Web of Conferences. – 2021. – EDN HOMGIO <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202125402009>

Базы данных

13. База данных, содержащая перечень аллелей, амплифицируемых в 14 микросателлитных локусах на ДНК 128 генотипов представителей рода смородина / **Павленко А.А., Пикунова А.В., Должикова М.А., Голяева О.Д., Князев С.Д.** // Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2024620177 Российская Федерация– EDN TJXTPA.