

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ СЕКВЕНИРОВАНИЯ (GBS) КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ РОССИЙСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО (*HUMULUS LUPULUS*)

Мартынова Е. У.¹, Замалутдинов А. В.¹, Баик А. С.¹, Черняева Е. А.², Иванова И. Ю.³, Бен С.¹, Гентцбиттель Л.¹

¹АНОВО "Сколковский институт науки и технологий"

²Российский Государственный аграрный университет

³Чувашский НИИСХ

e.martynova@skoltech.ru

Генотипирование с помощью секвенирования (GBS) — это метод, разработанный *Elshire et al.* (2011), который использует возможности NGS для выявления однонуклеотидных полиморфизмов в больших популяциях растений и животных. В основе концепции метода лежит фрагментация генома специфическими рестрикционными эндонуклеазами и отбор фрагментов, размеры которых сопоставимы с короткими чтениями платформы Illumina. Данный подход позволяет секвенировать до 3 % генома в виде фрагментов, равномерно покрывающих геном. После обработки результатов секвенирования и выравнивания коротких чтений можно получить несколько тысяч SNPs для дальнейшего изучения разнообразия и картирования признаков/проведения GWAS. Снижение сложности таким образом позволяет генотипировать несколько сотен образцов одновременно. Чтобы максимально использовать преимущества GBS в плане количества и качества полученных SNP, необходимо использование эффективного протокола. Эффективность протокола во многом зависит от выбора правильной рестриктазы.

Хмель (*Humulus lupulus* L.) — многолетнее двудомное растение семейства *Cannabaceae*. Несмотря на широкое использование и большую важность, этот вид растений крайне мало исследован на генетическом уровне, и большая часть его разнообразия, доступного селекционерам, мало изучена.

Нами был разработан эффективный GBS протокол для хмеля. На первом этапе был проведен *in silico* поиск наиболее эффективных рестриктаз. Далее ферменты рестрикции были протестированы *in vitro*, и были выбраны два наиболее эффективных варианта, а именно *ApeKI* и *HindIII*. Два протокола GBS, основанные на этих ферментах, были использованы для создания геномных библиотек хмеля. Протокол на основе *HindIII* позволил получить библиотеку лучшего качества. Результаты секвенирования также показали большее количество прочтений и SNPs для библиотеки на основе *HindIII*, хотя покрытие генома было выше для *ApeKI*. Качество SNP было сопоставимо для обеих библиотек. С помощью разработанных нами пайплайнов было рассчитано необходимое количество прочтений на основе протокола *HindIII* для получения достаточного количества SNP для дальнейших исследований.

На втором этапе мы использовали метод *HindIII* для изучения генетического разнообразия около 350 сортов хмеля из коллекции Чувашского сельскохозяйственного института (г. Чебоксары), включая мировые сорта хмеля, дикорастущие растения хмеля из России и мужские растения. Количество полученных данных по каждому сорту было сопоставимо с прогнозируемым.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (грант 24-26-00165, <https://rscf.ru/project/24-26-00165/>).

Ключевые слова: Хмель обыкновенный, *Humulus lupulus*, GBS, эндонуклеазы рестрикции, генетическое разнообразие

GENOTYPING-BY-SEQUENCING (GBS) AS AN INSTRUMENT TO STUDY THE GENETIC DIVERSITY OF THE RUSSIAN COLLECTION OF COMMON HOPS (*HUMULUS LUPULUS*)

Martynova E. U.¹, Zamalutdinov A. I.¹, Baik A.¹, Chernyaeva E.², Ivanova I.³, Ben C.¹, Gentzbittel L.¹

¹ Skolkovo Institute of Science and Technology

² Russian State Agrarian University

³ Chuvash Agricultural Research Institute

e.martynova@skoltech.ru

GBS, or genotyping-by-sequencing, is a technique first introduced for maize in 2011 by *Elshire et al.* which utilizes the power of new generation sequencing to reveal single nucleotide polymorphisms in large plant and animal populations. The method is based on genome complexity reduction by means of whole genome digest by specific restriction nuclease/nucleases and selection of fragments with the sizes comparable with short Illumina reads. This allows extracting up to 3% of the genome in fragments which would evenly cover the genome. After processing sequencing results and aligning the short reads, several thousands of SNPs can be obtained for further diversity and trait mapping/GWAS studies. Complexity reduction allows genotyping several hundreds of samples simultaneously. Introducing GBS in plants pushed forward the understanding of the genetic control of many important agricultural traits and enabled the practical use of genomic selection in plants.

To make the most of GBS for a new species in terms of the number and quality of SNPs obtained, an efficient protocol should be applied. The efficiency of the protocol depends, to a large extent, on the choice of the right restriction enzyme.

Hops (*Humulus lupulus* L.) is a perennial dioecious plant in the *Cannabaceae* family. Hops are an important agricultural crop with the cones produced by female plants being an indispensable material for the beer brewing industry. Despite its broad use, this plant species is highly understudied at the genetic level, with much of its diversity available to breeders poorly understood.

We have developed an efficient protocol for GBS in hop. At the first stage, an *in silico* search for best-performing restriction enzymes was carried out, which allowed choosing a number of restriction enzymes for empirical testing. Restriction enzymes were further tested through whole genome restriction, and two best-performing variants were selected, namely, classical *ApeKI* and *HindIII*. Two GBS protocols based on these enzymes were used to produce hop genome libraries for NGS. The *HindIII*-based protocol made it possible to obtain a better quality library based on first electrophoretic assessment and QC. NGS results also showed more generated reads, sequencing tags, and SNPs for the *HindIII* library, although the sequencing coverage was higher for *ApeKI*. SNP quality was comparable for both libraries.

In silico predictions using the own pipelines allowed calculating the required number of reads based on the *HindIII* protocol required to get the sufficient number of reads for further diversity studies.

At the second stage, we used the *HindIII* method to study the genetic diversity in about 350 hop accessions from the collection of the Chuvash Agricultural Institute (Cheboksary, Chuvash republic), including the worldwide hop cultivars, wild plants from Russia, and male plants. The amount of data obtained for each accession was comparable with the predicted.

The work was supported by the Russian Scientific Foundation (grant no. 24-26-00165, <https://rscf.ru/project/24-26-00165/>).

Keywords: Common hop, *Humulus lupulus*, GBS, restriction enzyme, diversity