

УДК 577.2

DOI 10.30679/2587-9847-2023-37-64-67

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНА trnH-PSBA В ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ДИКОРАСТУЩЕГО ВИНОГРАДА РЕСПУБЛИКИ АДЫГЕЯ\*

Савенкова Д.С.<sup>1</sup>, Елисютикова А.В.<sup>1</sup>, Милованов А.В.<sup>1</sup>, канд. биол. наук,  
Астапчук И.Л.<sup>2</sup>, канд. биол. наук

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина» (Краснодар)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия» (Краснодар)

**Реферат.** Представлены результаты идентификации видовой принадлежности дикорастущего винограда Республики Адыгея. Всего было проанализировано 6 образцов. Секвенирование их хлоропластных геномов позволило получить trnH-psbA последовательности для дальнейшего изучения. Также, установлена таксономическая принадлежность образцов в соответствии с этими последовательностями.

**Ключевые слова:** хлоропластная ДНК, виноград, *Vitis sylvestris* Gmel., trnH-psbA, Республика Адыгея

**Summary.** The results of species identification of wild grapes of the Republic of Adygea are presented. A total of 6 samples were analyzed. Sequencing of their chloroplast genomes allowed to obtain the trnH-psbA sequences for subsequent study. Taxonomic loss of specimens has also been established according to these sequences.

**Key words:** chloroplast DNA, grapevine, *Vitis sylvestris* Gmel., trnH-psbA, Republic of Adygea

**Введение.** Происхождение культурного винограда и его доместификация является одним из важнейших вопросов современной ампелографии. Точное время и место события доместификации до сих пор находятся под вопросом, в то время как известно, что сам культурный виноград (*Vitis vinifera* L.) произошел от дикого лесного винограда *Vitis sylvestris* Gmel. [1, 2].

Как известно, процесс одомашнивания виноградной лозы происходил на Ближнем Востоке на территории между Черным морем и Средней Азией [3, 4]. Этот район отвечает характеристикам первичного центра одомашнивания культуры, включающие в себя агроклиматическую предрасположенность к выращиванию винограда, пересечение торговых потоков и наличие социокультурных тенденций [5]. В целом, археоботанические данные свидетельствуют о зарождении виноградарства около 6000–5800 гг. до н.э. С перемещениями древних поселенцев распространялся и виноград [6].

Отслеживание селекционного процесса возможно при помощи хлоропластной и митохондриальной ДНК, которая передается от материнского растения к потомству. Так, например, было показано, что и дикий лесной виноград, который широко распространен в Евразии, и *Vitis sylvestris* Gmel. произрастающий в разнообразных регионах Кавказа имеют пять хлоротипов среди представителей [7].

В связи с выше сказанным, изучение хлоропластных геномов культурных и диких популяций винограда является актуальным для Северного Кавказа. **Целью** данного исследования являлось сравнительное изучение последовательностей генов trnH-psbA

\* Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых ученых кандидатов наук № МК-2070.2022.5.

хлоропластных геномов у дикорастущего винограда Майкопской популяции Республики Адыгея для уточнения филогенетического положения.

**Объекты и методы исследований.** Материал был собран в Республике Адыгея в рамках ранее проведенных исследований [8]. В качестве биоматериала были использованы взрослые листья винограда, из которых далее были выделены хлоропласты в соответствии с протоколом [9]. ДНК было выделено при помощи DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Количество и качество выделенной ДНК определяли при помощи прибора Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific). Набор Nextera DNA Flex Library Prep Kit (Illumina) был использован для приготовления ДНК-библиотек. Секвенирование было выполнено на приборе MiSeq (Illumina).

FastQC был использован для контроля качества прочтений [10]. Последовательности адаптеров были убраны при помощи Trimmomatic v.0.39 [11]. Первичная сборка выполнялась в UGENE [12] со встроенным алгоритмом SPAdes v.3.15.3 [13]. После чего, прочтения были выравнены на референсный хлоропластный геном в программе BWA [14]. Пластом *V. vinifera* PN40024 (номер GenBank NC\_007957.1) был использован как референс при сборке. Алгоритмы NCBI BLAST были использованы для сравнения полученных последовательностей с базой данных NCBI. Поиск кодирующих ДНК-последовательностей был выполнен с использованием GeneMark.hmm [15]. Аннотация геномов была выполнена в GeSeq [16]. Выравнивание ДНК-последовательностей между собой производилось в Clustal Omega [17].

**Обсуждение результатов.** В результате исследований были получены парноконцевые прочтения ДНК хлоропластных геномов шести образцов Майкопской популяции дикорастущего винограда. Аннотация этих геномов в GeSeq позволила выявить кодирующие последовательности ДНК, отвечающие за информацию о различных генах, в том числе trnH-psbA. В виду того, что выравнивание было произведено на геном *V. vinifera* PN40024, расположение последовательностей в первичных сборках пластов было примерно одинаковым с разницей в 1-3 нуклеотида.

Как можно видеть из таблицы, сравнение ДНК-последовательностей генотипов с базой данных NCBI показало, что все шесть пластов принадлежат к одному виду. При этом у всех было 100 % совпадение с одним из образцов в базе данных: *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* (номер GenBank: LC510289.1).

Таблица – Сравнение ДНК-последовательностей генотипов с базой данных NCBI

| Название образца | Наилучшее совпадение                           | Процент совпадения | Номер GenBank |
|------------------|--|--------------------|---------------|
| Майкоп 1         | <i>Vitis vinifera</i> subsp. <i>sylvestris</i> | 100 %              | LC510289.1    |
| Майкоп 2         | <i>Vitis vinifera</i> subsp. <i>sylvestris</i> | 100 %              | LC510289.1    |
| Майкоп 3         | <i>Vitis vinifera</i> subsp. <i>sylvestris</i> | 100 %              | LC510289.1    |
| Майкоп 4         | <i>Vitis vinifera</i> subsp. <i>sylvestris</i> | 100 %              | LC510289.1    |
| Майкоп 5         | <i>Vitis vinifera</i> subsp. <i>sylvestris</i> | 100 %              | LC510289.1    |
| Майкоп 6         | <i>Vitis vinifera</i> subsp. <i>sylvestris</i> | 100 %              | LC510289.1    |

Это подтверждает предположение о том, что данная популяция состоит из представителей одного вида. В связи с тем, что листья популяции различаются между собой по морфологическому строению, невозможно определить количество материнских форм. Присутствие варибельности в морфотипах может говорить о том, что популяция состоит только из представителей *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*, которые могли попасть сюда из разных мест; или же популяция произошла из гибридных форм, но именно материнская

форма у каждого из генотипов была подвидом *sylvestris*. Как известно, виноградоцветные хорошо скрещиваются друг с другом, поэтому нельзя исключать и такую возможность. Но, несмотря на это, стоит отметить, что в целом строение листовых пластинок и морфометрия самих лоз указывает на отсутствие гибридов и схожесть именно с видом *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* [18].

С целью сравнения образцов между собой было проведено сравнение последовательностей генов *trnH-psbA*. Как показано на рисунке, полученные ДНК-последовательности являются идентичными за исключением стартовых и последних нуклеотидов (данные по последним нуклеотидам не отображены).

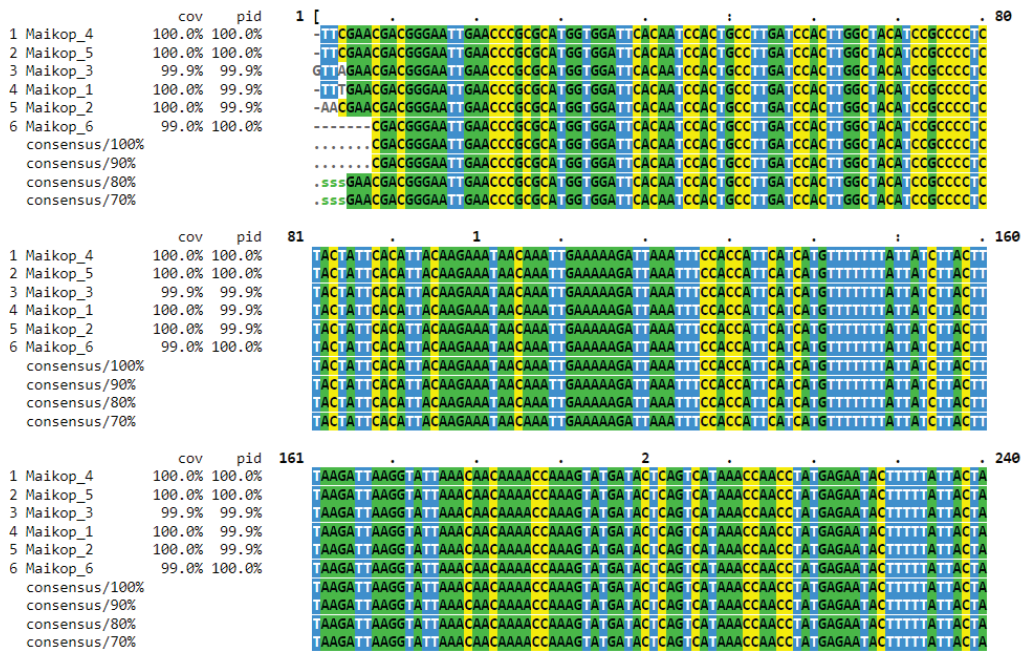


Рис. Сравнение последовательностей генов *trnH-psbA* между собой

Это говорит о том, что секвенирование не покрыло эти участки, в виду чего и имеются данные пробелы. Тем не менее, строение ДНК-последовательностей указывает на то, что они являются абсолютно идентичными. Таким образом, можно сделать вывод, что изученная популяция является моно-видовой и, соответственно, представлена только кладой *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*.

**Выводы.** Секвенирование и сборка пластомов шести представителей Майкопской популяции позволила идентифицировать кодирующие последовательности в результате их аннотации. Хлоропластные геномы были депонированы в базу данных NCBI под номерами SRR23815019, SRR23815018, SRR23815010, SRR23815009, SRR23815008, SRR23815007. Результаты видовой идентификации после депонирования указывают на принадлежность к виду *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*. Использование GeneMark.hmm позволило выявить последовательности *trnH-psbA*. Поиск схожих ДНК-последовательностей в NCBI выявил, что все образцы показывают 100 % сходство с пластомом *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* INRA:8500Mtp232 chloroplast DNA, complete genome (номер GenBank: LC510289.1). Это также подтверждается и сравнением в программе Clustal Omega. Было выявлено абсолютное сходство *trnH-psbA* последовательностей между собой, за исключением отсутствия информации о началах и концах у некоторых образцов, что, скорее говорит о недостаточном покрытии при секвенировании, нежели чем о действительных различиях

между пластами. По полученным данным можно сделать вывод, что отобранные представители Майкопской популяции принадлежат кладе *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*.

### Литература.

1. Olmo H.P. Origin and Distribution of Grapes // Evolution of Crop Plants, NW Simmonds, Ed. Longman, London and New York. 1976. P. 294-298.
2. McGovern P.E. The search for the origins of Viniculture // Princeton University Press. Ancient Wine, 2003. P. 96-122.
3. Arroyo-García R., Ruiz-García L., Bolling L., Ocete R., López M.A., Arnold C., Martínez-Zapater J.M. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms // Molecular ecology. 2006. Vol. 15(12). P. 3707-3714.
4. García R.A.A., Revilla E. The current status of wild grapevine populations (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) in the Mediterranean basin // The Mediterranean Genetic Code – Grapevine and Olive. InTech. 2013. P. 51-72.
5. Grassi F., Labra M., Imazio S., Ocete Rubio R., Failla O., Scienza A., Sala F. Phylogeographical structure and conservation genetics of wild grapevine. // Conservation Genetics. 2006. Vol. 7. P. 837-845.
6. Zohary D., Hopf M. Domestication of plants in the Old World: The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley // Oxford university press. 2000. Vol 3. 316 p.
7. McGovern P., Jalabadze M., Batiuk S., Callahan M. P., Smith K. E., Hall G. R., Lordkipanidze D. Early neolithic wine of Georgia in the South Caucasus // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2017. Vol. 114(48). P. E10309-E10318
8. Трошин, Л. П. Морфометрия листьев кубанских дикорастущих лиан винограда // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2011. № 72. С. 312-330.
9. Triboush S., Danilenko N., Davydenko O.A Method for Isolation of Chloroplast DNA and Mitochondrial DNA from Sunflower // Plant Molecular Biology Reporter. 1998. Vol. 16. 183.
10. Andrews S. FastQC // A quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Vol. 370.
11. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. 2014. Vol. 30(15). P. 2114-2120.
12. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Ugene Team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012. Vol. 28 (8). P. 1166-1167.
13. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Pevzner P.A. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // J. Comp. Biol. 2012. Vol. 19 (5). P. 455-477.
14. Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform // Bioinformatics. 2009. Vol. 25(14). P. 1754-1760.
15. Lukashin A.V., Borodovsky M. GeneMark. hmm: new solutions for gene finding // Nucleic acids research. 1998. Vol. 26(4). P. 1107-1115.
16. Tillich M., Lehwarck P., Pellizzer T., Ulbricht-Jones E. S., Fischer A., Bock R., Greiner S., GeSeq-versatile and accurate annotation of organelle genomes // Nucleic acids research. 2017. Vol. 45. P. 6-11.
17. Sievers F., Higgins D. G. Clustal omega // Current protocols in bioinformatics. 2014. Vol. 48, Issue 1. P. 3-13.
18. Трошин Л.П. Морфометрия листьев кубанских дикорастущих лиан винограда // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2011. № 71. С. 524-542.