

## ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ АБОРИГЕННЫХ СОРТОВ ВИНОГРАДА\*

Савенкова Д.С., Милованов А.В., канд. биол. наук

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина»  
(Краснодар, Россия)  
[milovanov1991@mail.ru](mailto:milovanov1991@mail.ru)

**Реферат.** Показаны результаты описания биологического и генетического разнообразия аборигенных сортов винограда, сохраненных в Анапской зональной опытной станции. В результате работы была проведена амплификация ДНК с IRAP праймерами. Общее количество полученных ДНК полос составило 836, из которых 98,26 % были полиморфными, что обусловлено большим разнообразием сортов в выборке.

**Ключевые слова:** виноград, биоразнообразие, селекция, IRAP, аборигенные сорта, полиморфизм

**Summary.** The results of the description of the biological and genetic diversity of indigenous grapevine varieties preserved in the Anapa zonal experimental station are shown. As a result of the work, DNA amplification with IRAP primers was carried out. The total number of obtained DNA bands was 836, of which 98.26 % were polymorphic due to the large diversity of varieties.

**Key words:** grapevine, biodiversity, breeding, IRAP, native varieties, polymorphism

**Введение.** Широкое распространение такой культуры как виноград обусловлено не только его популярностью своими вкусовыми качествами, но также и появлением его, как минимум сразу из двух мест доместификации [1]. Такие условия происхождения создали уникальное биологическое разнообразие, которое имеется только у этой культуры. В дополнение к этому, важной особенностью является и легкая скрещиваемость между формами и видами этого растения, что, в свою очередь, также сильно повлияло на увеличение уровня генетического разнообразия [2]. И, как мы можем видеть, сейчас имеется огромное количество различных сортов и форм, которые обладают различными уникальными агробιологическими признаками [3]. Тем не менее, основой для этого отбора, конечно, не считая дикого лесного винограда [4], служили аборигенные сорта, произошедшие из отдельных регионов [5, 6].

Конечно же, современная селекция сельскохозяйственных растений не стоит на месте и, поэтому, требует введение в нее новых сортов, имеющих ценные признаки. Как показывает практика, уже сейчас некоторые культуры сталкиваются с проблемой эрозии генетических ресурсов, которых катастрофически, порой, не хватает [7, 8]. Очевидно, что одним из способов решения данной проблемы является создание коллекций редких образцов и распространенных сортов как сельскохозяйственных, так и диких растений. Такие коллекции смогут давать генетический материал для селекционных мероприятий, но их использование «вслепую» является малоэффективным. Поэтому, изучение морфо-физиологических и генетических особенностей образцов коллекции является необходимым фактором, обеспечивающим ее наиболее рациональное использование.

Одним из типов коллекций, включающих в себя достаточно большое количество разнообразных сортов и форм, являются ампелографические. В Российской Федерации

---

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края в рамках научного проекта № 19-44-233003

расположены несколько коллекций, и, в частности, Анапская ампелографическая коллекция, являющаяся одной из самых больших в мире. Изучение биологического разнообразия виноградной лозы является одним из основных направлений, целью которого является интенсификация и управления продукционными процессами производства. Таким образом, в нашем исследовании мы представляем описание генетического разнообразия более 60 сортов винограда, сохраненных на Анапской ампелографической коллекции, с использованием мультислокусных маркеров.

**Объекты и методы исследований.** В качестве растительного материала, нами были использованы 63 сорта винограда, разделенных на пять условных популяций (табл. 1).

Таблица 1 – Список сортов, использованных в работе

№	Название	Популяция	№	Название	Популяция
1	Варюшкин	Дон	33	Траминер	Европа
2	Цимлянский белый	Дон	34	Совиньон белый	Европа
3	Сибирьковский	Дон	35	Уни белый	Европа
4	Бургундский	Дон	36	Гамэ черный	Европа
5	Плечистик	Дон	37	Плавай	Европа
6	Буланый	Дон	38	Шардоне	Европа
7	Шабаш	Дон	39	Вердаль	Европа
8	Достойный	Дон	40	Гарс Левелю	Европа
9	Шампанчик Цимлянский	Дон	41	Серсиаль	Европа
10	Кумшацкий белый	Дон	42	Сильванер	Европа
11	Белобуланый	Дон	43	Солярис	Европа
12	Венгерский синий	Дон	44	Пино черный	Европа
13	Махроватчик	Дон	45	Слитной	Европа
14	Шаани	Каспий	46	Франкенталь	Европа
15	Алый терский	Каспий	47	Августин	Европа
16	Кульджинский	Каспий	48	Буковинка	Европа
17	Нимранг	Каспий	49	Чинури	Грузия/Армения
18	Чиляки	Каспий	50	Чауш	Грузия/Армения
19	Тербаш	Каспий	51	Воскеат	Грузия/Армения
20	Баян Ширей	Каспий	52	Цоликаури	Грузия/Армения
21	Катта-Курган	Каспий	53	Коринка белая	Грузия/Армения
22	Андижанский черный	Каспий	54	Сиргула	Грузия/Армения
23	Босса	Каспий	55	Горула	Грузия/Армения
24	Хатми	Каспий	56	Мехвилтвала Тетри	Грузия/Армения
25	Тавлинский поздний	Каспий	57	Тита рбили	Грузия/Армения
26	Будай шули	Каспий	58	Тавквери	Грузия/Армения
27	Гюляби дагестанский	Каспий	59	Мускат белый	Передняя Азия
28	Аг изюм	Каспий	60	Кишмиш белый овалный (Султанина)	Передняя Азия
29	Агадаи	Каспий	61	Ляли холдор туркани	Передняя Азия
30	Гок ала	Каспий	62	Ляли сурх казнаки	Передняя Азия
31	Яй изюм розовый	Каспий	63	Ляли сурх таджикский	Передняя Азия
32	Яй изюм белый	Каспий	–	–	–

Отобранные верхушечные листья были высушены с использованием лиофильной сушилки Martin Christ Alpha 1-4 LDplus и раздроблены с использованием Grinder GT200. Выделение ДНК проводилось с использованием набора QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit.

Количество выделенной ДНК измерялось на приборе Implen NanoPhotometer NP80 и доводилось до концентрации 15 нг/мкл.

Параметры ПЦР реакции были выбраны в соответствии с Kalendar and Shulman [9]. Для амплификации были использованы молекулярные маркеры Vine-1 RaR и Tvv-1 FaF [10]. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации маркеров проводили в 6 % ПААГ, в течение 3 часов, при силе тока 150А и мощности 150В. Подсчет количества бендов провели в программе GelPro 3.1 (Media Cybernetics). Обработка результатов (подсчет количества, число частных и полиморфных бендов, а также РСoA анализ) проводилась в программе GenAlEx 6.3 [11]. Построение кластерного древа методом UPGMA проводилось в программе MEGA X [12].

**Обсуждение результатов.** Информация по наличию аллелей полученная в результате обработки первичных результатов (фотографий ДНК гель-электрофореза, рис. 1), была перенесена в Эксель таблицы в виде 0 и 1, для отсутствия и присутствия ДНК-полос, соответственно.

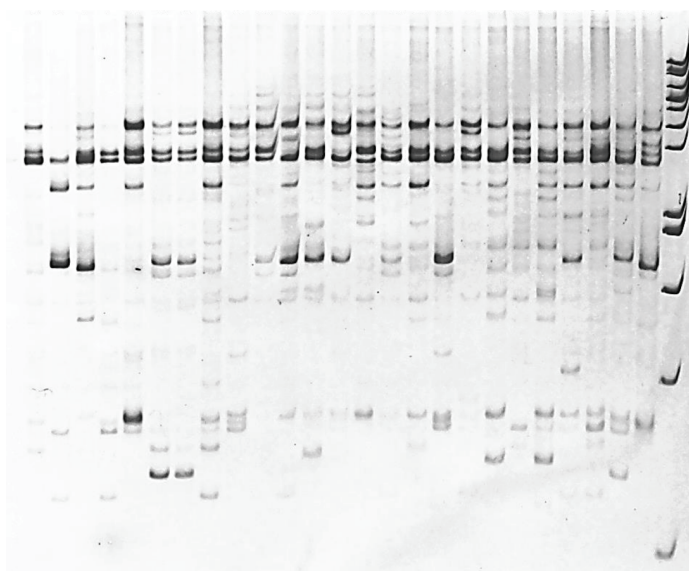


Рис. 1. Разделение продуктов амплификации праймера Tvv-1 FaF

В процессе анализа, нами была составлена таблица, отражающая статистическую обработку полученных данных (табл. 2).

Таблица 2 – Результаты статистической обработки полученных данных

№	Название	Pop	N	NP	NP %	I	H
1	Варюшкин	1					
2	Цимлянский белый	1					
3	Сибирьковский	1					
4	Бургундский	1					
5	Плечистик	1					
6	Буланый	1					
7	Шабаш	1					
8	Достойный	1					
9	Шампанчик Цимлянский	1					
10	Кумшацкий белый	1					
11	Белобуланый	1					
12	Венгерский синий	1					
13	Махроватчик	1	165	63.79 %	105	0.272	0.171

14	Шаани	2					
15	Алый терский	2					
16	Кульджинский	2					
17	Нимранг	2					
18	Чиляки	2					
19	Тербаш	2					
20	Баян Ширей	2					
21	Катта-Курган	2					
22	Андижанский черный	2					
23	Босса	2					
24	Хатми	2					
25	Тавлинский поздний	2					
26	Будай шули	2					
27	Гюляби дагестанский	2					
28	Аг изюм	2					
29	Агадаи	2					
30	Гок ала	2					
31	Яй изюм розовый	2					
32	Яй изюм белый	2	274	75.86 %	208	0.328	0.208
33	Траминер	3					
34	Совиньон белый	3					
35	Уни белый	3					
36	Гамэ черный	3					
37	Плавай	3					
38	Шардоне	3					
39	Вердаль	3					
40	Гарс Левелю	3					
41	Серсиаль	3					
42	Сильванер	3					
43	Солярис	3					
44	Пино черный	3					
45	Слитной	3					
46	Франкенталь	3					
47	Августин	3					
48	Буковинка	3	202	81.03 %	164	0.320	0.197
49	Чинури	4					
50	Чауш	4					
51	Воскеат	4					
52	Цоликаури	4					
53	Коринка белая	4					
54	Сиргула	4					
55	Горула	4					
56	Мсхвилтвала Тетри	4					
57	Тита рбили	4					
58	Тавквери	4	131	67.24 %	88	0.344	0.227
59	Мускат белый	5					
60	Кишмиш белый овальный (Султанина)	5					
61	Ляли холдор туркани	5					
62	Ляли сурх казнаки	5					
63	Ляли сурх таджикский	5	64	37.93 %	24	0.217	0.146
–	Всего	–	836	98.26 %	821	0.351	0.215

\* № – порядковый номер образца; Pop – Популяция (1 – Дон; 2 – Каспий; 3 – Европа; 4 – Грузия/Армения; 5 – Передняя Азия); N – Количество ДНК-бендов; NP – Количество полиморфных бендов; NP % –Процент полиморфных бендов; I – Индекс Шеннона; H – Разнообразие.

Как мы можем видеть, по результатам амплификации двух праймеров, всего, генотипами было сгенерировано 836 ДНК-бендов, из которых 821 (98.26 %) были полиморфными, что говорит о высоком уровне генетического разнообразия между сортами и не является удивительным в виду того, что в выборке использовались сорта из разных регионов мира. Также, эти данные подтверждаются и Индексом Шеннона (0.351) и показателем Разнообразия (0.215). В более пристальном рассмотрении, нами обнаружено, что наиболее высокий показатель по Индексу Шеннона у Популяции 4, в то время как самый низкий был у Популяции 5. Полученные данные интересны тем, что, не смотря на то, что по числу генотипов четвертая популяция не является самой большой, ее Индекс Шеннона практически равен общему показателю по всей выборке (0.344 и 0.351, соответственно). Более того, показатель по разнообразию (0.227) был даже немного выше, чем у всей выборке (0.215). Полученные данные могут быть объяснены тем, что в первом случае сравнивались популяции между собой, в то время как во втором – вся популяция в целом, что могло выровнять показатели в виду менее резкого изменения состава общей популяции и выровненности выборки, в целом.

Что касается полиморфности ДНК-полос в популяции, то, оказалось, что наибольшее количество полиморфных полос имеется в Популяции 3 (81.03 %), в то время как Популяция 5 показала всего 37.93 %. Полученные результаты были неожиданными в виду того, что третья популяция не показала наиболее высокие индексы Шеннона и разнообразия (0.320 и 0.197, соответственно). Тем не менее, это ненамного ниже, чем у Популяции 4, показавшей наиболее высокие результаты. Таким образом, можно заключить, что у Популяции 4 было наименее выравненное разнообразие, в то время как у Популяции 5 – наоборот. В целом же, стоит отметить, что полная выборка показала высокую генетическую полиморфность, что говорит о широком биоразнообразии в выборке. После чего, нами были построены координатная плоскость и кластерное древо с распределением генотипов, на основании полученных данных (рис. 2 и 3).

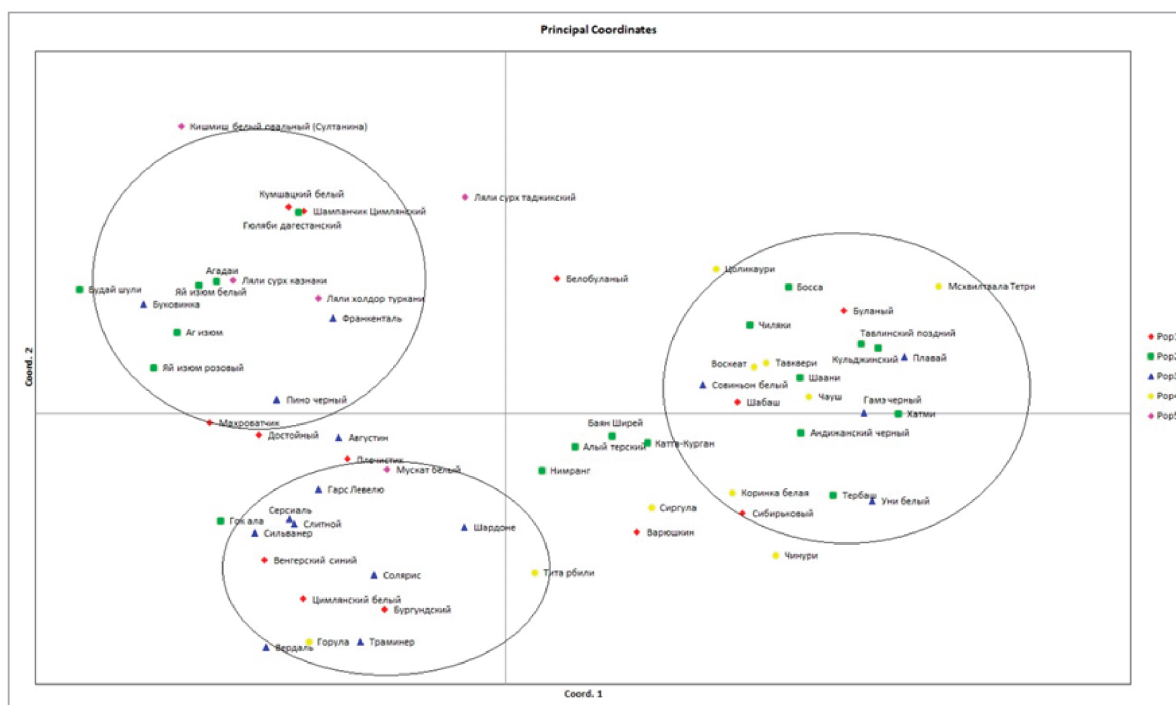


Рис. 2. Распределение генотипов на координатной плоскости методом главных компонент по результатам анализа мультилокусных последовательностей в исследуемых геномах

Как мы можем видеть из рисунка 2, по предварительным данным, основной пул генотипов разделился на три части, которые включили в себя представителей от 4 до 5 популяций. Такое распределение генотипов сложно объяснить по нескольким причинам: во-первых, это недостаточность данных для того, чтобы делать какие-то глубокие выводы и, второе, сильное смешение внутри популяций и внутри вида. Действительно, анализ AMOVA показал, что генетическое расстояние между популяциями является достаточно небольшим (3 %), в то время как разнообразие внутри выборки было 97 %. Это говорит нам о том, что, скорее всего, особи должны принадлежать к одному виду и, действительно, ранее имелось даже некоторое смешение генетического разнообразия между отдельными регионами. Конечно, это происходило в виду наличия в данных регионах широко спектра торгово-экономических путей, а также активному переселению народов, в прошедших эпохах.

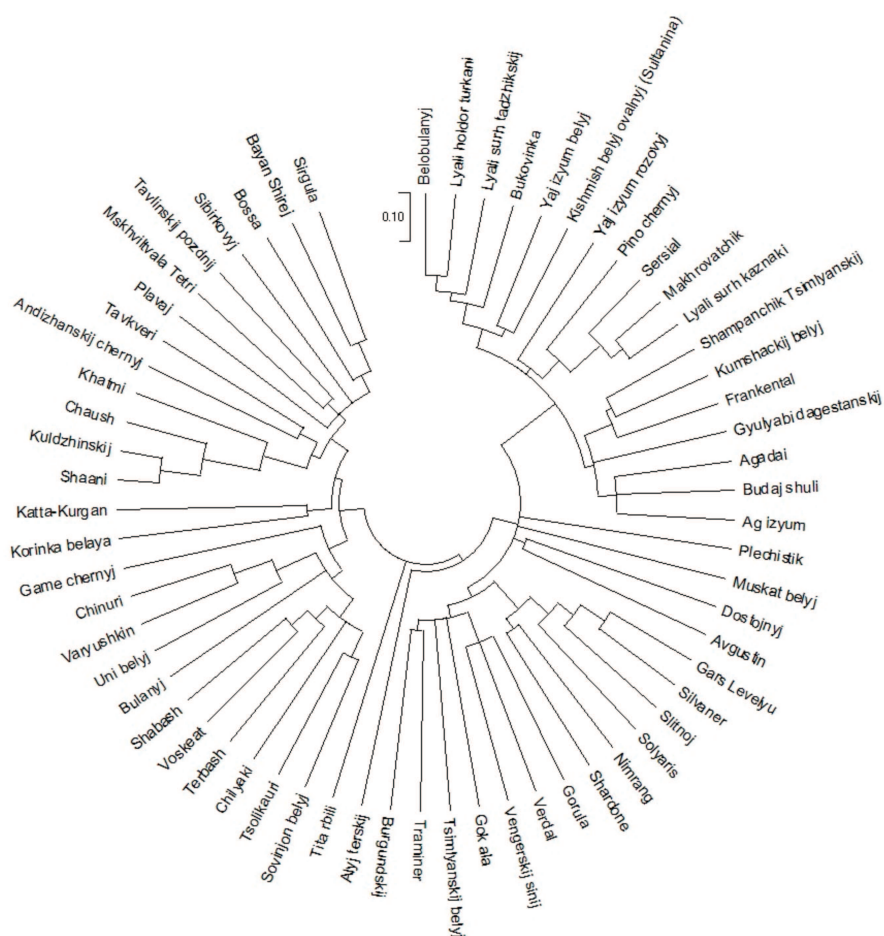


Рис. 3. Результаты кластеризации UPGMA методом исследуемых генотипов в программе MEGA X

Также, кластеризация генотипов методом невзвешенных пар, показала распределение их по шести кластерам, а также смешение между собой различных образцов, принадлежащих к разным популяциям. В частности, похожим образом были распределены рядом друг с другом такие сорта как Плечистик, Muskat белый и Августин, в то время как Махроватчик был помещен отдельно от Серсиаля, Пино черного и Ляли сурх казнаки. В целом, как и ожидалось, есть схожести и различия между распределением генотипов разными методами сравнения.

**Выводы.** Результаты амплификации маркеров Tvv-1 FaF и Vine-1 RaR показали различное количество ДНК-полос, выявленных у разных генотипов. Также, всего было идентифицировано 836 ДНК-бендов, из которых 98.26 % полиморфных. При этом, уровень разнообразия и индекс Шеннона были 0.215 и 0.351, соответственно, для всей популяции. Интересно, что уровень разнообразия у Популяции 4 был даже выше, чем у всей выборки (0.227). Это указывает на то, что большое количество генотипов во всем пуле генотипов выровняет уровень разнообразия, в то время как в Популяцию 4, очевидно, были включены контрастные генотипы. Распределение образцов на координатной плоскости по результатам анализа РСoA показало, что, условно, сорта были расположены в виде трех основных пулов. Данные группы генотипов включили в себя образцы сразу нескольких популяций, что говорит об их родстве. Кластеризация генотипов методом UPGMA в программе MEGA X также распределила генотипы по трем основным кластерам. Сравнение результатов показало как сходства, так и различия в распределении образцов двумя методами, что говорит о необходимости дальнейшего изучения связей между ними и расширения количество используемых ДНК-маркеров.

### Литература

1. Arroyo- García R., Ruiz- Garcia L., Bolling L., Ocete R., Lopez M.A., Arnold C., Ibanez J. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms //Molecular ecology. 2006. №. 12. С. 3707-3714.
2. Delame M., Prado E., Blanc S., Robert-Siegwald G., Schneider C., Mestre P., ... Rustenholz C., Merdinoglu D. Introgression reshapes recombination distribution in grapevine interspecific hybrids //Theoretical and applied genetics. 2019. №. 4. С. 1073-1087.
3. Salmon J. M., Ojeda H., Escudier J. L. Disease resistant grapevine varieties and quality: The case of Bouquet varieties //Oeno One. 2018. №. 3. С. 6 p.
4. Bouby L., Figueiral I., Bouchette A., Rovira N., Ivorra S., Lacombe T., Pastor T., Picq S., Marinva P., Terral J.F. Bioarchaeological insights into the process of domestication of grapevine (*Vitis vinifera* L.) during Roman times in Southern France //PLoS One. 2013. №. 5. С. e63195.
5. Sefc K.M., Steinkellner H., Lefort F., Botta R., da Câmara Machado A., Borrego J., Maletić E., Glössl J. Evaluation of the genetic contribution of local wild vines to European grapevine cultivars //American Journal of Enology and Viticulture. 2003. №. 1. С. 15-21.
6. Stavrakaki M., Bouza D., Biniari K. Differentiation of Greek grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) based on the combination of ampelographic description and microsatellite markers //Genetic Resources and Crop Evolution. 2020. №. 1. С. 21-40.
7. Gepts P. Plant genetic resources conservation and utilization: the accomplishments and future of a societal insurance policy //Crop science. 2006. №. 5. С. 2278-2292.
8. Preston J.M., Ford-Lloyd B.V., Smith L.M.J., Sherman R., Munro N., Maxted N. Genetic analysis of a heritage variety collection //Plant Genetic Resources. 2019. №. 3. С. 232-244.
9. Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A. H. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation //Theoretical and Applied Genetics. 2010. №. 8. С. 1419-1430.
10. D'Onofrio C., De Lorenzis G., Giordani T., Natali L., Cavallini A., Scalabrelli G. Retrotransposon-based molecular markers for grapevine species and cultivars identification //Tree Genetics & Genomes. 2010. №. 3. С. 451-466.
11. Peakall R. O. D., Smouse P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research //Molecular ecology notes. 2006. №. 6. С. 288-295.
12. Kumar S., Stecher G., Li, M., Knyaz C., Tamura K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms //Molecular biology and evolution. № 35. С. 1547-1549.