

УДК 634.84

DOI 10.30679/2219-5335-2021-4-70-48-58

**ГЕНОТИПИРОВАНИЕ
ПЕРСПЕКТИВНЫХ АБОРИГЕННЫХ
СОРТОВ ВИНОГРАДА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ***

Милованов Александр Валериевич
канд. биол. наук
научный сотрудник
кафедры биотехнологии,
биохимии и биофизики
e-mail: milovanov1991@mail.ru

Савенкова Дарья Сергеевна
студентка
e-mail: dasha_19.99s@mail.ru

Трошин Леонид Петрович
д-р биол. наук, профессор
профессор кафедры виноградарства
e-mail: lptroshin@mail.ru

*Федеральное государственное
бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Кубанский государственный
аграрный университет
имени И.Т. Трубилина»,
Краснодар, Россия*

В статье представлены результаты изучения биологического разнообразия некоторых аборигенных сортов, имеющих в Анапской ампелографической коллекции с использованием ретротранспозонных маркеров. Всего для исследования было выбрано 10 аборигенных сортов винограда. Данные сорта принадлежат к генотипам, происходящим из эколого-географических групп Дона и Кавказа и, соответственно, являются отдаленными по происхождению. Таким образом, впервые было исследовано генетическое разнообразие и их взаимосвязь, полученная в результате описания

UDC 634.84

DOI 10.30679/2219-5335-2021-4-70-48-58

**GENOTYPING
OF PERSPECTIVE INDIGENOUS
GRAPEVINE VARIETIES
OF RUSSIAN FEDERATION***

Milovanov Alexander Valerievich
Cand. Biol. Scie.
Research Associate
of Biotechnology, Biochemistry
and Biophysics Department
e-mail: milovanov1991@mail.ru

Savenkova Daria Sergeevna
student
e-mail: dasha_19.99s@mail.ru

Troshin Leonid Petrovich
Dr. Sci. Biol., Professor
Professor of Viticulture Department
e-mail: lptroshin@mail.ru

*Federal State Budgetary
Educational Institution
of Higher Education
«Kuban State
Agrarian University
named after I.T. Trubilina»,
Krasnodar, Russia*

In the article are presented the results of studying the biological diversity of some indigenous grapevine varieties available in the Russian ampelographic collection using retrotransposon markers. In total, 10 indigenous grapevine varieties were selected for the study. These varieties belong to genotypes originating from the ecological-geographical groups of the Don and the Caucasus and, accordingly, are distant in origin. Thus, for the first time, genetic diversity and their relationship, obtained as a result of their description using retrotransposon

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

* The study was carried out with financially supported of the Russian Fund of Thorough Research and the Administration of the Krasnodar Territory within the framework of the scientific project No. 19-44-233003

их с использованием ретротранспозонных маркеров. В результате, всего было получено 1518 ДНК-полос, из которых 67,69 % были полиморфными. При этом, различное количество ПЦР-фрагментов генотипов было получено в результате амплификации со всеми маркерами. Минимальное количество (128) показал сорт Будай шули, в то время как максимальное (173) было выявлено у сорта Кульджинский. Маркеры, использованные в работе, сгенерировали также различное число ДНК-полос. В частности, минимальное количество было для Tvv-1 (79), в то время как максимальное (171) продемонстрировал маркер 2373. Не смотря на относительно небольшое общее количество полиморфных полос, Индекс Шеннона (0,342) и критерий разнообразия (0,224) продемонстрировали достаточно высокие показатели. Данные факты могут объясняться тем, что выбранные для исследования сорта имеют отдаленное происхождение. Тем не менее, показатель полиморфности может указывать и на то, что между генотипами имеется определенная связь в виду географического расположения их мест происхождения. По результатам анализа была проведена кластеризация генотипов методами PCoA и Maximum Likelihood method. При этом, неожиданным оказалось близкое расположение сортов Кульджинский и Сибирьковский.

Ключевые слова: ВИНОГРАД, АБОРИГЕННЫЕ СОРТА, АМПЕЛОГРАФИЯ, ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ, СЕЛЕКЦИЯ, БИОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ

markers, were investigated. As a result, a total of 1518 DNA bands were obtained, of which 67,69 % were polymorphic. At the same time, a different number of DNA bands per genotype was obtained as a result of amplification with all markers. The minimum amount (128) was shown by the Budai shuli variety, while the maximum (173) was found in the Kuldzhinskiy variety. The markers used in the work also generated a different number of DNA bands. In particular, the minimum amount was for Tvv-1 (79), while the maximum (171) was demonstrated by the marker 2373. Despite the relatively small total number of polymorphic bands, the Shannon Index (0.342) and the Diversity criterion (0.224) showed high indicators. These facts can be explained by the fact that the varieties selected for research have a distant origin. Nevertheless, the level of polymorphism may indicate that there is a certain relationship between genotypes due to the geographical location of their places of origin. Based on the results of the analysis, clustering of genotypes was carried out using the PCoA and Maximum Likelihood methods. At the same time, the close location in PCoA analysis and cluster tree of the Kuldzhinsky and Sibirskovy varieties was unexpected.

Key words: GRAPEVINE, INDIGENOUS VARIETIES, AMPELOGRAPHY, GENETIC MARKERS, BREEDING, BIOLOGICAL DIVERSITY

Введение. Виноград – одно и наиболее древних сельскохозяйственных растений, выращиваемых человеком с незапамятных времен. С тех пор людьми было создано потрясающее генетическое и биологическое разнообразие, которое на данный момент насчитывает более двадцати трех тысяч сортов винограда, зарегистрированных в международном каталоге

VIVC [1, 2]. В процессе исследований стало известно, что культурный виноград имеет не одну, а несколько точек происхождения и отбора лоз, интересных человеку для производства [3-5]. Поэтому сейчас мы и можем наблюдать такое огромное разнообразие сортов и форм [6-8].

Конечно же, изначально человеком описывались только внешние признаки растения и, по данным международной организации винограда и вина OIV, в методику описания виноградной лозы входит около пятисот признаков, включающих в себя описание внешнего вида растений, его листьев, коры, ягод и гроздей в целом. Тем не менее, наука не стоит на месте и ее развитие привело к появлению молекулярно-генетических маркеров, способных различать не только отдельные сорта, но и формы. На данный момент существуют различные виды молекулярных маркеров, такие как SSR [2, 9], ISSR, IRAP, REMAP [4] и другие. Сейчас одними из наиболее «молодых» мультилокусных маркерных систем является iPBS маркирование, основанное на присутствии в геноме растений мобильных ДНК-элементов ретро-транспозонов [10-12]. Данная маркерная система является достаточно удобной в использовании в виду простоты реализации методики и способности давать представление о нескольких точках в геноме, а также способности различать близкородственные генотипы или даже клоны [13-15]. Таким образом, сейчас применяются различные маркерные системы для изучения генетического разнообразия культурных и дикорастущих растений.

На данный момент было создано большое количество коллекций, в которых содержатся различные растения, полезные как для практической, так и для научной деятельности человека. И, в частности, такими коллекциями являются ампелографические, включающие в себя различные сорта и генотипы винограда как культурного, так и дикие виды. Изучение таких коллекций – одно из важнейших направлений, ставящих перед собой сразу несколько целей, таких как подбор перспективных пар для скрещивания и селекция, изучение генетического разнообразия и анализ имеющихся ресурсов, а также проблемы происхождения видов и строения геномов [16].

В частности, огромный интерес представляет собой изучение аборигенных сортов винограда, представляющих различные агроклиматические и географические зоны. Таким образом, нами была поставлена цель – изучение генетического разнообразия аборигенных сортов винограда, содержащихся в Анапской ампелографической коллекции.

Объекты и методы исследований. В качестве растительного материала были выбраны генотипы аборигенных сортов (табл. 1). Растительный материал собран в Анапской ампелографической коллекции.

Таблица 1 – Список сортов, использованных в работе

Название образца	Цвет ягоды	Происхождение
Гок изюм	Белый	Дагестан
Гюляби дагестанский	Розовый	Дагестан
Аг изюм	Белый	Дагестан
Агадаи	Белый	Дагестан
Гок ала	Черный	Дагестан
Яй изюм розовый	Розовый	Дагестан
Яй изюм белый	Белый	Дагестан
Будай шули	Белый	Дагестан
Сибирьковский	Белый	Дон
Кульджинский	Розовый	Казахстан/Китай

Выделение ДНК проводилось двумя способами: при помощи коммерческого набора DNeasy Plant Mini Kit фирмы QIAGEN. Перед выделением ДНК отобранные растительные ткани высушивались в лиофильной сушке Martin Christ BETA 2-8 LDplus в течении 24 часов. После этого, производилось их дробление при помощи металлических шариков в пробирках с пробами в вибрационной мельнице GT200.

Полимеразная цепная реакция проводилась в амплификаторах ДТ-322, компании «ДНК-Технология», Applied Biosystems и Bio-Rad. Для проведения ПЦР были выбраны праймеры, идентифицирующие присутствие аллелей ретротранспозонов в генотипах. Они, как и параметры ПЦР, ранее опубликованы [4, 10, 17].

Таблица 2 – Нуклеотидные последовательности праймеров

Name	Sequence (5'-3')	Source
2374	CCCAGCAAACCA	Kalendar et. al 2010
2375	TCGCATCAACCA	Kalendar et. al 2010
2376	TAGATGGCACCA	Kalendar et. al 2010
2075	CTCATGATGCCA	Kalendar et. al 2010
2078	GCGGAGTCGCCA	Kalendar et. al 2010
2095	GCTCGGATACCA	Kalendar et. al 2010
2230	TCTAGGCGTCTGATACCA	Kalendar et. al 2010
2373	GAAC TTGCTCCGATGCCA	Kalendar et. al 2010
2415	CATCGTAGGTGGGCGCCA	Kalendar et. al 2010
2074	GCTCTGATACCA	Kalendar et. al 2010
Tvv-1	TCCA(AG)CTTCAGGGGGAGTGT	D'Onofrio C. et. al 2010
Vine-1	TATATTTTTGGGCTGCTGGA	D'Onofrio C. et. al 2010

С целью разделения продуктов амплификации генотипов с использованными ДНК маркерами, мы использовали ДНК-электрофорез в полиакриламидном геле. Таким образом, как уже было сказано, результаты амплификации проверялись изначально в 2 % агарозном геле на наличие ПЦР-фрагментов и, в целом, амплификации. После чего электрофоретическое разделение продуктов амплификации маркеров проводилось в 6 % ПААГ, при силе тока 70А и мощности 70В, 7 часов. Далее гель-пластины погружались на 10 минут в раствор бромистого этидия для окрашивания ДНК. В итоге пластины просвечивались в ультрафиолетовом свете и фотографировались для последующего изучения.

Оценка и статистика диапазонов iPBS и IRAP. Программа GenAlEx 6.3 [18] использовалась для проведения анализа AMOVA [19] с 999 пермутациями. Для статистики частотных диапазонов (информационный индекс Шеннона, разнообразие, несмещенное разнообразие, процент полиморфных локусов, количество диапазонов и количество частных диапазонов) использовались GenAlEx 6.3 и таблица Excel. Затем было рассчитано генетическое расстояние (GD) и проведен анализ главных компонентов (PCoA) с использованием метода стандартизированной ковариации.

Кластеризация и построение древ. Для построения древа использовались MEGA X [20] и DARWin 6.0. Для MEGA X 0-1 список полос ДНК был перенесен в список А-С (где А – наличие и С – отсутствие полосы), а

затем с Maximum Likelihood method [21] было построено дерево кластеров. Для DARWin 6.0 был выбран метод Weighted Neighbor-Joining [22] (по умолчанию из стандартного набора методов программы).

Обсуждение результатов. В результате работы были получены ДНК профили сортов с использованием 10 iPBS маркеров (рис. 1, 2). Данные профили были описаны с использованием программы GelPro 3.1, а результаты были записаны в виде 0 и 1 в таблице Excel.

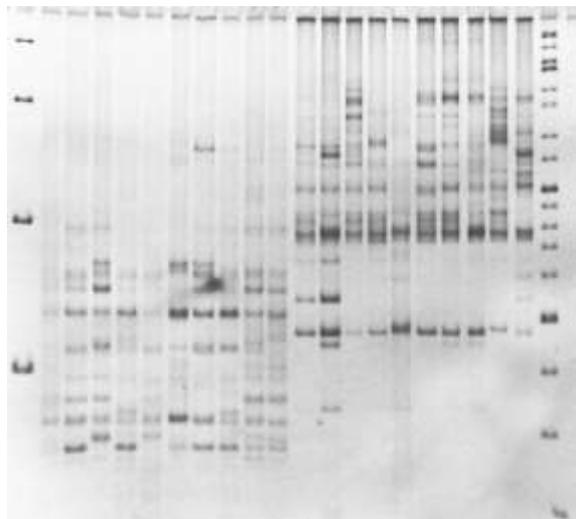


Рис. 1. Результаты разделения продуктов амплификации маркеров 2075 и 2078

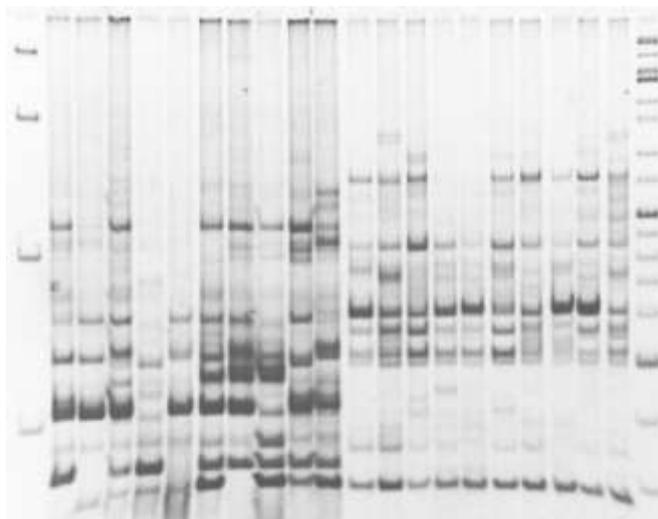


Рис. 2. Результаты разделения продуктов амплификации маркеров 2095 и 2374

Полученные данные были проанализированы с использованием программы-макроса GenAlEx 6.3 и отображены в таблице 3. Как мы можем видеть, всего было сгенерировано 1518 ПЦР-фрагментов, из которых 67,69 % (или же 1027 штук) были полиморфными.

В свою очередь, индекс Шеннона (0,342) и показатель разнообразия (0,224) говорят о наличии высокого уровня разнообразия внутри выборки. Тем не менее, более подробное исследование выборки требует включение в список исследуемых генотипов разных образцов, принадлежащих к разным эколого-географическим группам. Поэтому результаты являются интересными в виду того, что данные показатели достаточ-

но высоки для сравнительно небольшой выборки, включающей, предположительно, только один вид, что говорит о возможной сложности происхождения генотипов [4, 23].

Таблица 3 – Статистические показатели по ПЦР-фрагментам

Название генотипа	Количество ПЦР-фрагментов на генотип	Количество полиморфных ПЦР-фрагментов	% полиморфных ПЦР-фрагментов	Индекс Шеннона	Разнообразие
Будай шули	128	–	–	–	–
Гок изюм	142	–	–	–	–
Гюляби дагестанский	172	–	–	–	–
Аг изюм	131	–	–	–	–
Агадаи	141	–	–	–	–
Гок ала	154	–	–	–	–
Яй изюм розовый	165	–	–	–	–
Яй изюм белый	140	–	–	–	–
Сибирьковский	172	–	–	–	–
Кульджинский	173	–	–	–	–
Всего	1518	1027	67,69 %	0,342	0,224

В частности, было выявлено, что каждый ДНК маркер сгенерировал разное число ПЦР-фрагментов. Общее полученное количество варьировало от 79 (TvV-1) до 133 (Vine-1). При этом, минимальное количество (4) ДНК-полос на генотип было выявлено у маркера TvV-1, в то время как максимальное (19) было получено при разделении продуктов амплификации праймера 2373 (табл. 4).

Таблица 4 – Показатели количества ПЦР-фрагментов, сгенерированных каждым маркером

Маркер	Количество ПЦР-фрагментов	Минимальное количество ПЦР-фрагментов	Максимальное количество ПЦР-фрагментов
1	2	3	4
2374	131	9	17
2375	131	10	16
2376	135	9	18
2075	97	7	13
2078	122	9	15
2095	121	6	16
2230	90	6	14

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4
Tvv-1	79	4	12
2373	171	15	19
Vine-1	133	10	17
2415	106	7	15
2074	112	8	16
2228	90	7	18

Далее, было проведено сравнение генотипов между собой, с целью установить связи в выборке с использованием методов РСоА и кластерного анализа (рис. 3 и 4).

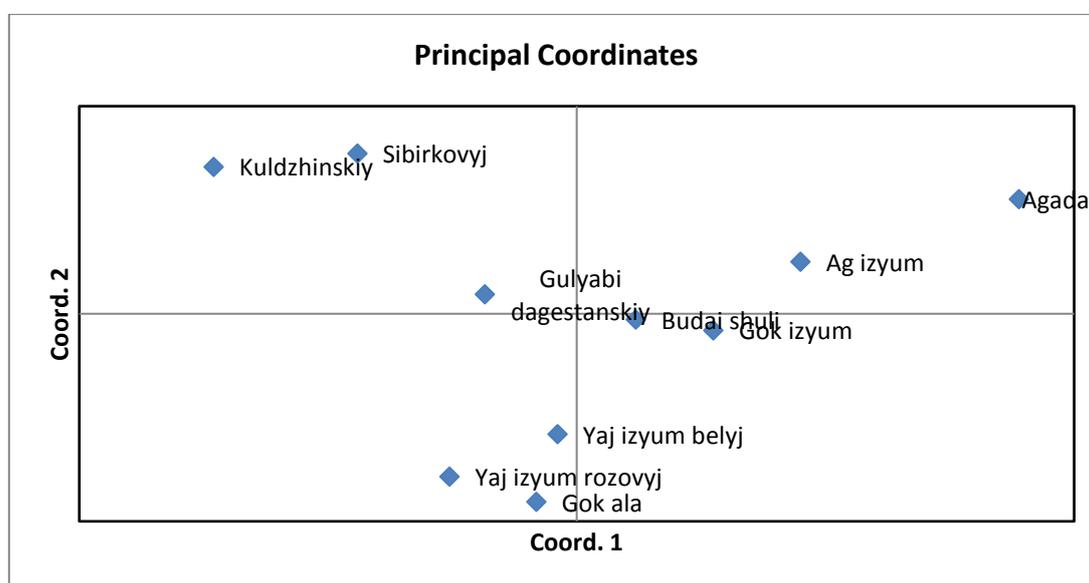


Рис. 3. Расположение исследованных генотипов после распределения на координатной плоскости методом РСоА

Дерево, построенное с использованием данных об аллелях ретро-транспозонов (см. рис. 4), было разделено на три кластера. Интересно, что сорта Аг изюм и Агадаи были отделены от остального древа, что говорит об уникальности строения их геномов и является значимым по бутстреп-показателю. Как мы видим, некоторые известные разновидности (Яй изюм белый и Яй изюм розовый) были помещены вместе, что предполагает их действительно близкое родство.

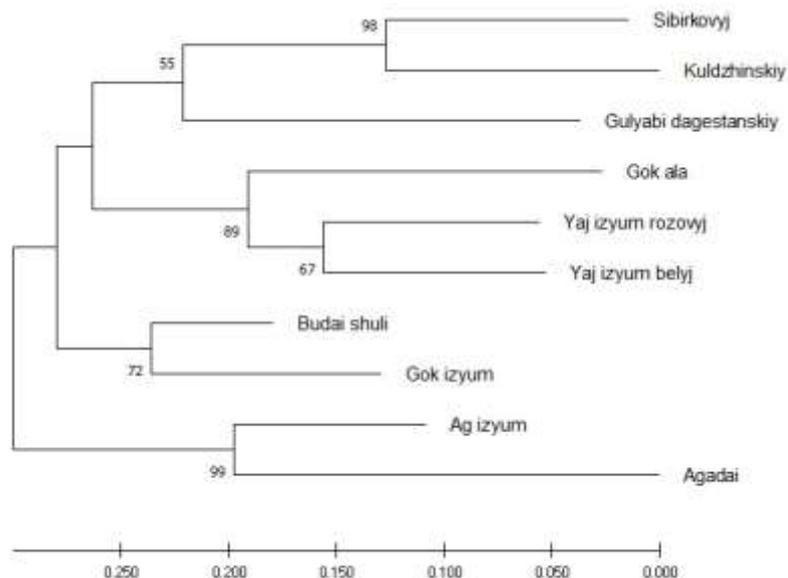


Рис. 4. Кластеризация генотипов методом Maximum Likelihood method

Анализ главных компонент, построенный на основе набора ретро-транспозонных маркеров, выявил так же три основных кластера изучаемых генотипов. В основном они были разделены так же, и результаты, в целом, согласуются с данными кластеризации. Таким же образом программа расположила Яй изюм белый и Яй изюм розовый вместе с Гок ала. Помимо этого, как и на координатной плоскости сорта, Гок изюм и Будай шули находились не только рядом, но даже были выделены в отдельную ветвь, расположенную между двумя основными кластерами. Такие результаты могут говорить о том, что данные сорта имеют особенности строения их генома, отличающие их от остального набора генотипов. Между тем они, очевидно, имеют и схожее разделение продуктов амплификации, что может указывать на близкородственность.

Выводы. Впервые выполнено изучение аборигенных сортов винограда, содержащихся в Анапской ампелографической коллекции Российской Федерации с использованием маркеров, основанных на ретротранспозонных последовательностях мобильных ДНК элементов. Впервые прове-

дено изучение филогенетических связей между исследуемыми редкими образцами ампелографической коллекции по данным анализа наличия ретротранспозонных последовательностей мобильных ДНК элементов, выполнены анализ главных компонент и кластеризация изученных генотипов внутри сравниваемых популяций.

Выявлено большое число ПЦР-фрагментов, более половины из которых полиморфны, что привело к достаточно высокому показателю разнообразия, несмотря на присутствие в выборке только одного вида и отсутствие межвидовых гибридов. В свою очередь, это говорит о том, что данные генотипы имеют сложное происхождение.

В результате работы подтверждены предполагаемые взаимоотношения между исследованными генотипами. В частности, выявлено близкое родство генотипов Яй изюм розовый и Яй изюм белый, Агадаи и Гок изюм. Помимо этого, по результатам анализа с использованием ретро-транспозонных маркеров, установлены и неожиданные связи между образцами – сортами Сибирьковый и Кульджинский.

Литература

1. Bacilieri R., Lacombe T., Le Cunff L., Di Vecchi-Staraz M., Laucou V., Genna B., Péros J.-P., This P., Boursiquot J.M. Genetic structure in cultivated grapevines is linked to geography and human selection //BMC plant biology. 2013. V. 13. №. 1. P. 1-14.
2. Silvia V., Michela T., Giuseppina C. A reference integrated map for cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.) from three crosses, based on 283 SSR and 501 SNP-based markers //Theoretical and Applied Genetics. 2008. V. 117. №. 4. P. 499-511.
3. 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. V. 15. №. 12. P. 3707-3714.
4. 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. V. 6. №. 3. P. 451-466.
5. This P., Lacombe T., Thomas M. R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes //TRENDS in Genetics. 2006. V. 22. №. 9. P. 511-519.
6. Thrupp L. A. The importance of biodiversity in agroecosystems //Journal of Crop Improvement. 2004. V. 12. №. 1-2. P. 315-337.
7. Trakhtenbrot A., Nathan R., Perry G., Richardson D. M. The importance of long- distance dispersal in biodiversity conservation //Diversity and Distributions. 2005. V. 11. №. 2. P. 173-181.

8. Zdunić G., Preece J. E., Aradhya M., Velasco D., Koehmstedt A., Dangl G. S. Genetic diversity and differentiation within and between cultivated (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) and wild (*Vitis vinifera* L. ssp. *sylvestris*) grapes // *Vitis*. 2013. V. 52. №. 1. P. 29-32.
9. Singh N., Choudhury D. R., Singh A. K., Kumar S., Srinivasan K., Tyagi R. K., Singh R. Comparison of SSR and SNP markers in estimation of genetic diversity and population structure of Indian rice varieties // *PloS one*. 2013. V. 8. №. 12. P. e84136.
10. Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A.H. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation // *Theoretical and Applied Genetics*. 2010. V. 121. №. 8. P. 1419-1430.
11. Monden Y., Yamaguchi K., Tahara M. Application of iPBS in high-throughput sequencing for the development of retrotransposon-based molecular markers // *Current Plant Biology*. 2014. №. 1. P. 40-44.
12. Žiarovská J., Padilla-González G.F., Viehmannová I., Fernández E. Genetic and chemical diversity among yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] accessions based on iPBS markers and metabolomic fingerprinting // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019. V. 141. P. 183-192.
13. Baránek M., Meszáros M., Sochorová J., Čechová J., Raddová J. Utility of retrotransposon-derived marker systems for differentiation of presumed clones of the apricot cultivar Velkopavlovická // *Scientia Horticulturae*. 2012. №. 143. P. 1-6.
14. Milovanov A., Zvyagin A., Daniyarov A., Kalendar R., Troshin L. Genetic analysis of the grapevine genotypes of the Russian *Vitis* ampelographic collection using iPBS markers // *Genetica*. 2019. V. 147. №. 1. P. 91-101.
15. Zhang X., Guo D., Guo M., Zhang G., Hou X. Optimization of iPBS-PCR system in grapevine // *Journal of Fruit Science*. 2014. V. 31. №. 3. P. 508-513.
16. Benjak A., Ercisli S., Vokurka A., Maletic E., Pejic I. Genetic relationships among grapevine cultivars native to Croatia, Greece and Turkey // *Vitis*. 2005. V. 44. №. 2. P. 73-77.
17. Labra M., Imazio S., Grassi F., Rossoni M., Sala F. Vine- 1 retrotransposon-based sequence- specific amplified polymorphism for *Vitis vinifera* L. genotyping // *Plant Breeding*. 2004. V. 123. №. 2. P. 180-185.
18. Peakall, R. O. D., Smouse, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Molecular ecology notes*. 2006. V. 6. №. 1. P. 288-295.
19. Excoffier, L., Smouse, P. E., Quattro, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data // *Genetics*. 1992. V. 131. №. 2. P. 479-491.
20. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Molecular biology and evolution*. 2018. V. 35. №. 6. P. 1547-1549.
21. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 1997. V. 53. №. 3. P. 240-255.
22. Bruno, W. J., Socci, N. D., Halpern, A. L. Weighted neighbor joining: a likelihood-based approach to distance-based phylogeny reconstruction // *Molecular biology and evolution*. 2000. V. 17. №. 1. P. 189-197.
23. Arrigo N., Arnold C. Naturalised *Vitis* rootstocks in Europe and consequences to native wild grapevine // *Plos one*. 2007. V. 2. №. 6. P. e521.