

УДК 634.8

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДИКОГО ВИНОГРАДА
VITIS SILVESTRIS GMEL. НА СЕВЕРНОМ
КАВКАЗЕ**

Звягин Андрей Сергеевич
к. б. н., старший научный сотрудник

Трошин Леонид Петрович
д. б. н., профессор
Кубанский государственный аграрный
университет, Краснодар, Россия

Vitis vinifera subsp. *silvestris* Gmel., субвид *Vitis vinifera* L., является важным источником генетических ресурсов для селекции винограда. В настоящее время представители данного подвида очень редко встречаются в мире. В работе представлено первое исследование дикорастущего винограда, найденного на Северном Кавказе с использованием двух микросателлитных маркеров. В ходе исследования выявлен высокий уровень генетического разнообразия: внутривидовая изменчивость составляет 75,2%, на долю межвидовой изменчивости приходится 24,8%. Все популяции характеризуются определенной уникальностью генетической структуры и могут являться донорами генов устойчивости, которые прошли длительный эволюционный отбор

Ключевые слова: ВИНОГРАД, ВИД, ПОДВИД, МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ МАРКЕРЫ, ИЗМЕНЧИВОСТЬ, ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ

UDC 634.8

**THE RESEARCH OF VITIS SILVESTRIS
GMEL. IN THE NOTHERN CAUCASUS**

Zvyagin Andrey Sergeevich
Cand. Biol. Sci., senior researcher scientists

Troshin Leonid Petrovich
Dr. Sci. Biol., professor
Kuban State Agrarian University,
Krasnodar, Russia

Vitis vinifera subsp. *silvestris* Gmel. is the wild subspecies of *Vitis vinifera* L. and an important source of genetic resources for grapes breeding. Currently, this form is very rare in the world. In this paper, conducted the first study of wild grapes which was found in the North Caucasus with the use of two microsatellite markers. The study have shown a high level of genetic diversity: intrapopulation variability was 75,2%, the interpopulation variability accounts was 24,8%. All populations are characterized by certain unique genetic structure and may be as donor of resistance genes which have a long-term evolutionary selection

Keywords: GRAPE, SPECIES, SUBSPECIES, MICROSATELLITE MARKERS, VARIABILITY, GENETIC DIVERSITY

Введение

Виноград является важной мировой культурой, объем производства которой определяется возможностью получения высокого качественного продукта. Задачи производителей варьируют от регионов и сортов винограда, многие программы по изучению и созданию новых генотипов включают комбинирование высокого качества ягод с повышением устойчивости к болезням, вредителям и адаптации к окружающей среде.

К сожалению, не достаточно много известно о генетическом контроле большинства характеристик у винограда, действительно многие из них контролируются количественными генами. Выявление данных генов требует использование дорогостоящих технологий, а самое главное -

длительного времени. Существенные сдвиги в данном направлении, а именно, международные усилия многих лабораторий помогли изменить ситуации в развитии молекулярной генетики, а, следовательно, анализе генетических ресурсов винограда, идентификации главных генов, контролируемых важные характеристики, и понимании аллельного разнообразия, которое характеризует генотип [9].

Поэтому использование доступных для исследования генетических ресурсов является оправданным и перспективным.

В последнее время биоразнообразие семейства *Vitaceae Juss.* заметно возрастает, появляются новые данные о расширяющемся генофонде культурного и дикорастущего винограда *Vitis vinifera L.*, одновременно возникают новые методы анализа полиморфизма такого фиксированного разнообразия. Но вопрос о происхождении культурного винограда остается пока еще не решенным.

Исследования проблемы происхождения винограда ведутся уже достаточно давно, большое количество работ было сделано в мире на эту тему, при этом единой концепции происхождения винограда нет. Считается, что культурный виноград произошел от *Vitis vinifera ssp. silvestris Gmel.*, который является спонтанным субвидом *V. vinifera L.*, поэтому является предком настоящего винограда и остальных культурных сортов [15].

Исходя из этого, первая теория происхождения дикого винограда основывается на данных, полученных из исторических источников, в которых достаточно хорошо описаны процессы доместификации виноградной лозы, с использованием архео-ботанических, культурных и исторических доказательств. К сожалению, она не дает ясной картины происхождения винограда, поэтому считается, что является недостаточной для представления убедительных доказательств в отношении происхождения культурного винограда [5, 8].

В настоящее время, согласно второй теории о происхождении культурного винограда, считается, что распространение евразийского винограда началось из нескольких центров, которые внесли разный генетический вклад от разных популяций *silvestris Gmel.* или путем множественной селекции и доместификации генотипов *Vitis vinifera ssp. silvestris Gmel.* Данная гипотеза основана на исследовании морфологических характеристик между сортами из восточной и западной частей планеты. Доказательством этого утверждения послужил анализ вариации хлоротипов 1201 образца диких и культурных растений, собранных на всей территории распространения вида в Европе и путем изучения их генетических взаимосвязей. Результаты этого исследования показали появления двух центров происхождения возделываемой гермоплазмы, один - Ближний Восток, а другой - западная часть Средиземного моря. При этом второй дал начало многим существующим западноевропейским сортам [4].

Существование различных теоретически и практически обоснованных центров происхождения форм растительного мира предполагает, что и в настоящее время возможно сохранение в этих центрах эндемичных реликтовых форм растений.

Из всех зон, с точки зрения изучения биологического разнообразия виноградных лоз, наиболее перспективной считается территория Северного Кавказа и Причерноморья (северные регионы Черного моря). Она широко исследуется разнообразными лабораториями мира из-за огромного значения как предполагаемого центра происхождения культурного винограда.

Его исследование и устойчивое использование вызваны рядом причин, в том числе:

- наличием большого разнообразия традиционных местных сортов (порядка 1500 наименований), существующих в регионе, часть

из которых представляет ботаническую и биолого-хозяйственную ценность;

- предполагаемой необходимостью привлечения этих сортов для улучшения современных европейских сортов;
- существованием предка культурного винограда *V. vinifera ssp. silvestris Gmel.* внутри региона [2, 3].

Поэтому, исходя из соображений о происхождении мирового сортового состава, было проведено исследование и отбор образцов из нескольких локаций в местах прямого приручения дикого винограда (*Vitis vinifera ssp. silvestris Gmel.*) на Северном Кавказе.

Целью работы было исследование внутри- и межпопуляционного генетического разнообразия собранного дикого винограда (*V. vinifera ssp. silvestris Gmel.*) на Северном Кавказе.

Материалы и методы

Образцы дикого винограда были собраны в пределах Северного Кавказа и Причерноморья (северные регионы Черного моря) – 24 экземпляра, в ходе экспедиций, проводимых кафедрой виноградарства Кубанского государственного аграрного университета в течение 8 лет.

ДНК из собранных образцов выделяли СТАВ-методом, модифицированный для виноградной культуры – методика была модифицирована за счет использования NaCl для удаления полисахаридов и PVP (Polyvinylpyrrolidone) - для удаления полифенолов [1, 7].

Концентрацию экстрагированной ДНК определяли в агарозном геле (0,8%), затем делали разбавление до концентрации 10 нг. μL^{-1} для каждого образца в лаборатории Департамента по изучению сельскохозяйственных культур и окружающей среды, г. Удина, Италия.

Для анализа генетического разнообразия были использованы 2 нейтральных микросателлитных маркера: VRZAG79 [12] и VVMD7 [6]. В ходе исследования для всех маркеров были использованы одинаковые условия ПЦР, позволяющие получить максимальное количество продукта реакции.

Один из праймеров имел флуоресцентную метку с Dye Phosphoramidites (6-FAM, HEX). Амплификация была выполнена на приборе 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). Определение фрагментов и анализ данных был выполнен на секвенаторе MegaBASE (Amersham Biosciences, Великобритания), используя ETROX в качестве молекулярного маркера веса (стандарта). Для определения размеров фрагментов использовалось стандартное программное обеспечение, которое поставляется вместе с секвенатором MegaBASE (Amersham Biosciences, Великобритания).

Для оценки генетического разнообразия использовали следующие показатели: среднее число разных аллелей на локус (N_a), эффективное число аллелей (N_e), N_a – количество аллелей с частотой аллелей более 5%, информационный индекс Шеннона (I), коэффициент инбридинга (F), количество уникальных аллелей (N_{PA}), количество общих аллелей, найденных у 25% и 50% образцов в популяциях, средняя наблюдаемая (H_o) и ожидаемая гетерозиготности (H_e). Все расчеты были проведены в программе GenAlEx [10] и PopGene 1,32 [14].

Результаты исследований

Теоретико-практическое использование генетического разнообразия требует предварительных знаний о структуре и количестве вариаций произрастающих популяций. Данная публикация отражает результаты

первого генетического исследования и дифференциации образцов *V. vinifera L. ssp. sylvestris Gmel.* на Северном Кавказе.

В ходе исследований генетического полиморфизма четырех популяций *V. vinifera L. ssp. sylvestris Gmel.* выявлено 15 микросателлитных вариантов, кодируемых 17 аллелями двух локусов. Параметры генетической изменчивости, включенные в анализ *V. vinifera L. ssp. sylvestris Gmel.* и рассчитанные по двум локусам, представлены в табл. 1.

Таблица 1. - Частота встречаемости 17 аллелей двух микросателлитных локусов в популяциях *V. vinifera L. ssp. sylvestris Gmel.*, собранных на Северном Кавказе

Локус	Аллель	Популяции			
		Крымская (Pop1)	Абинская (Pop2)	Майкопская (Pop3)	Горячий Ключ (Pop4)
VRZAG 79	235	-*	0,071	0,125	0,250
	243	-	-	-	0,250
	247	-	0,107	-	-
	249	0,500	0,071	0,875	0,250
	253	-	0,214	-	-
	255	0,500	-	-	-
	257	-	0,393	-	-
	259	-	0,107	-	-
	271	-	0,036	-	-
	VVMD 7	232	-	-	0,250
234		-	-	-	0,500
238		0,250	0,143	0,500	0,500
244		-	0,571	-	-
248		0,250	0,000	0,250	-
250		-	0,179	-	-

	259	0,250	0,107	-	-
	261	0,250	-	-	-

Примечание: - отсутствие аллелей в популяции.

Все локусы проявили высокий уровень полиморфизма в исследуемых популяциях. Наиболее часто встречающиеся аллели полиморфных локусов являются общими во всех субпопуляциях. Между субпопуляциями наблюдались отличия в содержании высокочастотных аллелей - VRZAG 79²⁴⁹, VRZAG 79²³⁵, VVMD 7²³⁸ и VVMD 7²⁴⁸ (табл. 1 и рис.). Также был выявлен диагностический признак - различия между субпопуляциями, которые определяются наличием в основном более редких аллелей. Например, аллели локусов VRZAG 79²⁴⁷, VRZAG 79²⁵³, VRZAG 79²⁵⁵, VRZAG 79²⁵⁷, VRZAG 79²⁵⁹, VRZAG 79²⁷¹ и четыре аллеля локуса VVMD 7^(232, 234, 244, 250), которые были обнаружены в исследуемых субпопуляциях один раз.

Таблица 2. - Значение основных показателей генетической изменчивости дикого винограда *V. vinifera L. ssp. sylvestris Gmel.*, собранных на Северном Кавказе

Популяции	Na	Ne	H _o	H _e	F
Крымская - Pop1	3,000	3,000	1,000	0,625	-0,667
Абинская - Pop2	5,500	3,411	0,643	0,688	0,089
Майкопская - Pop3	2,500	1,973	0,625	0,422	-0,371
Горячий Ключ - Pop4	3,000	3,000	0,500	0,625	0,333
Среднее для вида в целом	3,500 (0,598)	2,846 (0,393)	0,692 (0,143)	0,590 (0,065)	-0,154

Параметры генетической изменчивости (полиморфизм P, среднее число разных аллелей на локус (Na), эффективное число аллелей (Ne), Na – количество аллелей с частотой аллелей более 5%, информационный индекс Шеннона-Вивера (I), количество уникальных аллелей (NPA), количество общих аллелей, найденных у 25% и 50% (No of private Alleles<=25-50%) образцов в популяциях, средняя наблюдаемая (H_o) и (H_e) ожидаемая гетерозиготности) у популяций были примерно одинаковыми.

Уровень генетического полиморфизма в субпопуляциях дикого винограда довольно высокий: в среднем каждое растение гетерозиготно по 69,2% аллелям. Это согласуется с данными, полученными в других работах, так как виноград является высоко гетерозиготным растением, поэтому обладает большим внутри- и межвидовым полиморфизмом [13, 16]. Выявленная гетерозиготность варьировала H_o от 0,500 до 1,000, со значением меньшим, чем для ожидаемого случайного взаимодействия гамет (H_e) во всех локусах, за исключением Крымской и Майкопской субпопуляций (рис.). Для этих популяций существует возможность смешивания с другими популяциями, однако, это не является достоверным, так как высока возможность присутствия нулевых аллелей. Предполагается, что большинство очевидных гомозигот могут быть гетерозиготами, один аллель будет видим, другой - нет. Эти типы нулевых аллелей могут появляться, когда мутации не позволяют связывать праймеры на нацеленный регион [11].

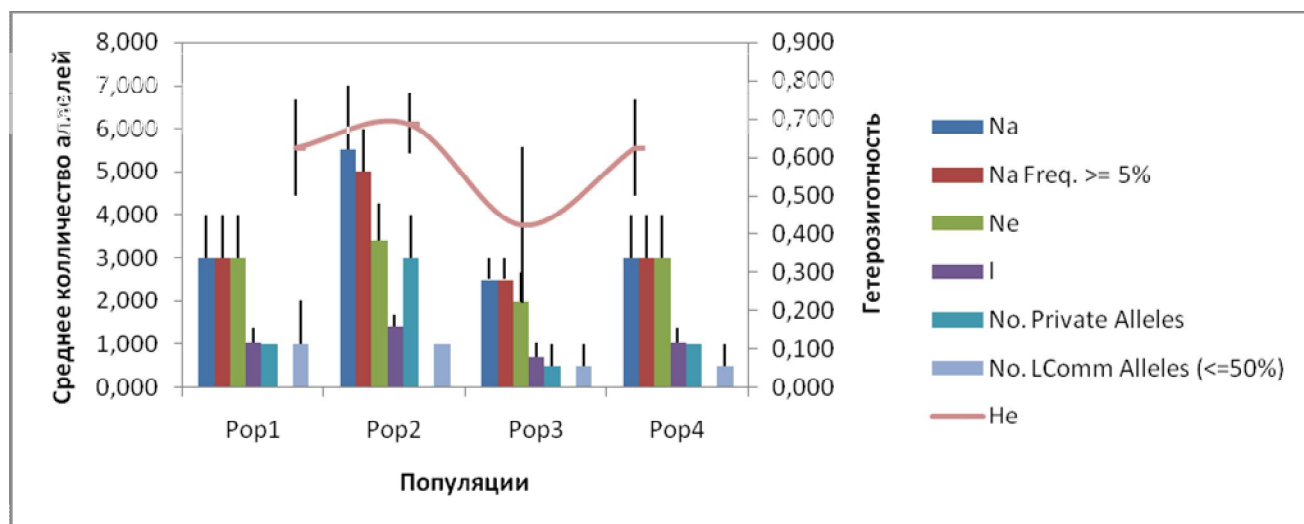


Рисунок. – Средние значения аллельных вариантов, встречающихся у исследуемых популяций.

Для исследования дифференциации также важным является выяснение процесса близкородственного скрещивания, который ведет к гомозиготизации, а, следовательно, к потере генетической изменчивости, поэтому для количественной оценки этого процесса был рассчитан

коэффициент инбридинга (F). Он определяется как вероятность того, что при образовании зиготы очередного поколения в одном из ее локусов окажутся аллели, идентичные по происхождению, т.е. появившаяся особь будет по данному локусу аутозиготной. Идентичность по происхождению означает, что данные аллели являются копиями одной и той же аллели, находящиеся в генотипе одного из предков данной особи. Расчет показателей инбридинга Райта [14], которые отражают степень близкородственного скрещивания в популяциях, показали, что в субпопуляциях дикого винограда наблюдается избыток гетерозигот: индекс фиксации Райта (F) имеет довольно низкие положительные значения, за исключением популяции, произрастающей в Горячем Ключе ($F = 0,333$). Среднее значение индекса фиксации Райта (F) по всем популяциям равен $-0,154$. Ощутимый дефицит гетерозигот ($F = +0,333$, минимум $F = +0,089$) отмечен в популяциях Горячего Ключа и Крымской. Это говорит о том, что в данных популяциях возможен инбридинг, что также видно при исследовании показателей H_o и H_e , которые практически совпадают, то есть находятся в состоянии генетического равновесия.

Внутрипопуляционная изменчивость у *V. vinifera L. ssp. sylvestris Gmel.* составляет 75,2%, тогда как на долю межпопуляционной изменчивости приходится 24,8% ($F_{ST} = 0,248$).

Таблица 3. - Значение коэффициента F-статистики Райта для реликтовых популяций дикого винограда *V. vinifera L. ssp. sylvestris Gmel.*, собранных на Северном Кавказе

Локус	F_{is}	F_{it}	F_{st}	Nm^*
VRZAG79a	-0,391	-0,025	0,263	0,700
VVMD7a	0,023	0,250	0,232	0,825
Среднее	-0,184 (0,207)	0,112 (0,137)	0,248 (0,015)	0,763 (0,063)

Примечание: * Nm = Уровень генных потоков (N_m) $F_{st} = 0.25 (1 - F_{st})/F_{st}$.

Таким образом, проведенный сравнительный анализ показывает, что реликтовые популяции *V. vinifera L. ssp. sylvestris Gmel.*, собранные на Северном Кавказе, отличаются высоким уровнем изменчивости.

Это говорит о том, что в данных популяциях возможен инбридинг, что также видно при исследовании показателей H_o и H_e , которые практически совпадают то есть находятся в состоянии генетического равновесия. Очевидно, такая особенность характерна для популяций и можно объяснить диффузностью их ареала. Это приводило к усилению интенсивности миграции, изменению потока генов, повышению частоты их комбинаций. Ощутимый дефицит гетерозигот, отмеченный в популяциях, собранных в Горячем Ключе и Крымске, связан со слабым притоком генов извне, большинство скрещиваний в изолированных небольших реликтовых популяциях, длительно в ходе смен поколений, происходило внутри них. Естественный отбор способствовал повышению частот комбинаций генов, обеспечивающих лучшую приспособленность популяций к занимаемой территории. Такие комбинации генов могут определяться большей степенью неслучайности кроссинговера у растений реликтовых популяций, по сравнению с несколько генетически модифицированными, за счет более интенсивного обмена генами, растениями.

Очевидно, что реликтовые популяции, собранные в Горячем Ключе и Крымске, характеризуются определенной уникальностью генетической структуры и могут быть донорами генов устойчивости, которые прошли длительный эволюционный отбор.

Выводы

В ходе исследования можно сделать вывод, что микросателлитные маркеры позволяют разделить найденные генотипы дикого винограда на

отдельные субпопуляции, однако вопрос, что данные субпопуляции являются действительно диким предком культурного винограда, а не одичавшими, остается открытым и требует дальнейшего детального исследования путем увеличения числа выборок и включением дикорастущих образцов из других ареалов.

Поэтому необходимо дальнейшее проведение генетического мониторинга популяции *V. vinifera L. ssp. sylvestris Gmel.* с увеличением ареала исследований и создание банка данных по их популяционно-генетической структуре. Это будет способствовать углублению познаний и усовершенствованию вопросов сохранения ценного генофонда подвида *V. vinifera L. ssp. sylvestris Gmel.* Северного Кавказа.

Список литературы

1. Звягин А.С., Трошин Л.П., Мухина Ж.М., Супрун И.И. Адаптация методики микросателлитного анализа для изучения генетического разнообразия сортов винограда Пино белый, Рислинг и их клонов // Новации и эффективность производственных процессов в виноградарстве и виноделии. – 2005. - Т. 2. – С. 113-117.
2. Трошин Л.П., Серпуховитина К.А., Носульчак В.А., Смурыгин А.С., Ильяшенко О.М., Панкин М.И. Мировой генофонд винограда на Кубани // Новации и эффективность производственных процессов в виноградарстве и виноделии. - 2005. - Т. II. - С. 124-131.
3. Трошин Л., Маградзе Д., Турок Й. Международное сотрудничество по сохранению генофонда винограда // Виноделие и виноградарство. - 2006. - № 2. - С. 24-25.
4. Arroyo-García R., Lefort F., de Andrés M.T., Ibañez J., Borrego J., Jouve N., Cabello F., Martínez Zapater J.M. Chloroplast microsatellite polymorphisms in *Vitis* species // Genome. - 2002. - V. 45. - № 6. - P. 1142-1149.
5. Bisson J. Essai de classement des cépages français en écogéogroupes phénotypiques. // J. Int. Sci. Vigne. Vin. - 1999. - 33: 105–110.
6. Bowers J.E., Dangi G.S., Meredith C.P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape // Am. J. Enol. Vitic. - 1999. - V. 50 (3): 243– 246.
7. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. - 1990. - V. 12. - P. 13-15.
8. Fossati T., Labra M., Castiglione S., Failla O., Scienza A., Sala F. The use of AFLP and SSR molecular markers to decipher homonyms and synonyms in grapevine cultivars: the case of the varietal group known as “Schiave” // Theor. Appl. Genet. - 2001. - V. 102. - P. 200–205.
9. Hancock J.F. Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics. - Springer Netherlands, 2008. - P. 197-231.

10. Peakall, R. and Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Molecular Ecology Notes*. - 2006. - V. 6: 288-295.
11. Pollefeys P., Bousquet, J. Molecular genetic diversity of the French-American grapevine hybrids cultivated in North America // *Genome*. - 2003. - V. 46. - P.1037-1048.
12. Sefc K.M., Regner F., Turetschek E., Glössl J., Steinkellner H. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species // *Genome*. - 1999. - V. 42. - P. 367-373.
13. Velasco R. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety / R. Velasco, A. Zharkikh, M. Troglio, D.A. Cartwright, A. Cestaro, D. Pruss, M. Pindo, L.M. FitzGerald, S. Vezzulli, J. Reid, G. Malacarne, D. Iliev, G. Coppola, B. Wardell, D. Micheletti, T. Macalma, M. Facci, J.T. Mitchell, M. Perazzolli, G. Eldredge, P. Gatto, R. Oyzerski, M. Moretto, N. Gutin, M. Stefanini, Y. Chen, C. Segala, C. Davenport, L. Dematte, A. Mraz, J. Battilana, K. Stormo, F. Costa, Q. Tao, A. Si-Ammour, T. Harkins, A. Lackey, C. Perbost, B. Taillon, A. Stella, V. Solovyev, J.A. Fawcett, L. Sterck, K. Vandepoele, S.M. Grando, S. Toppo, C. Moser, J. Lanchbury, R. Bogden, M. Skolnick, V. Sgaramella, S.K. Bhatnagar, P. Fontana, A. Gutin, Y. Van de Peer, F. Salamini and R. Viola. // *PLoS ONE*. - 2007. - 2. - P. 1326.
14. Wright S. *Evolution and the Genetics of Populations. Variability within and among natural populations.* – Chicago: The University of Chicago Press, 1978. - V. 4. – P. 242-322.
15. Yeh, F.C. and Boyle, T.J.B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. // *Belgian Journal of Botany*. - 1997. - P. 129-157.
16. Zecca G., F. De Mattia, Lovicu G., Labra M., Sala F., Grassi F. Wild grapevine: silvestris, hybrids or cultivars that escaped from vineyards? Molecular evidence in Sardinia // *Plant Biology*. German Botanical Society and The Royal Botanical Society of the Netherlands. - 2009. <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/122474518/htmlstart>

11 02 2010