УДК 634.8:582 https://www.doi.org/10,52415/23126701_2023_0412

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ДИКОРАСТУЩИХ ФОРМ ВИНОГРАДА ГОРНО-ЛЕСНОЙ ЗОНЫ КРЫМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

Г.В. Корнильев

ФГБУН «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН», 298600, ул. Кирова, 31, г. Ялта, Россия, priemnaya@magarach-institut.ru

Аннотация

Для оценки генетических ресурсов винограда Крыма актуальным является изучение дикорастущего винограда, представленного одичавшими представителями культурного винограда *Vitis vinifera* L. ssp. *sativa* (DC) Hegi. и собственно дикого винограда *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Gmelin) Hegi., который считается прародителем культурных сортов. Цель исследования – идентификация ДНК-профилей образцов дикорастущих форм винограда Крыма для оценки их генетического разнообразия с использованием ядерных (nSSR) и хлоропластных (cpSSR) микросателлитных локусов. Исследованы 50 образцов, отобранных в горно-лесной зоне Крыма. Генотипирование выполнено по 9 nSSR- (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79) и 3 cpSSR-маркерам (ccmp3, ccmp5, ccmp10). По nSSR-локусам выявлено 88 аллелей (в среднем 9 аллелей/локус). Наиболее часто встречались образцы, в nSSR-профилях которых присутствовали аллели: $VVS2_{133}$, $VVMD5_{234}$, $VVMD7_{249}$, $VVMD25_{249}$ и $VVMD25_{267}$, $VVMD27_{190}$, $VVMD28_{236}$, $VVMD32_{240}$, $VrZAG62_{194}$, $VrZAG79_{251}$. Среднее значение эффективного число аллелей (ne) составило 4,101. Среднее значение фактической гетерозиготности (Het_o) – 0,678, наблюдаемой гетерозиготности (Het_e) – 0,734. Среднее значение коэффициента Шеннона-Виннера (I) – 1.635. По cpSSR-локусам выявлены 6 аллелей: $ccmp3_{106}$, $ccmp3_{107}$, $ccmp5_{104}$, $ccmp5_{105}$, $ccmp10_{114}$, $ccmp10_{115}$. Установлено, что 38 образцов дикорастущего винограда имели хлоротип A, 2 образца – хлоротип C, 10 образцов – хлоротип D. Построенная на основании матрицы генетических дистанций дендрограмма показала наличие трёх кластеров, которые включали, соответственно, 25, 18 и 7 образцов. Образцы с хлоротипом A были представлены в трёх кластерах; с хлоротипом D – в двух; с хлоротипом C – в одном кластере. Выявлено, что образцы №7 и №37 имели идентичный генотип. Среди дикорастущих форм идентифицированы микросателлитные профили, соответствующие генотипам Молдова, Мускат а пти гран, Примитиво, Семильон, Чауш чёрный.

Ключевые слова: дикорастущие формы винограда, *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Gmel.) Hegi, *Vitis vinifera* ssp. *sativa* (DC.) Hegi, генотипирование, микросателлитные маркеры, полиморфизм аллелей, хлоротипы

THE STUDY OF GENETIC DIVERSITY OF WILD GROWING FORMS OF GRAPES IN THE MOUNTAIN-FOREST ZONE OF CRIMEA USING MICROSATELLITE MARKERS

H.V. Korniliev

All-Russian National Research Institute of Vinegrousing and Winemarking 'Magarach', Kirova st.,31, Yalta, Russia, priemnaya@magarach-institut.ru

Abstract

In order to assess the genetic resources of Crimean grapes, it is relevant to study wild grapes,

shown by feral representatives of cultivated grapes *Vitis vinifera* L. ssp. *sativa* (DC) Hegi., and actually wild grapes *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Gmelin) Hegi., considered to be the progenitor of cultivated varieties. The purpose of the study is to identify DNA profiles of samples of wild growing grapes in Crimea to assess their genetic diversity using nuclear (nSSR) and chloroplast (cpSSR) microsatellite loci. In total, 50 samples collected in the mountain-forest zone of Crimea were studied. Genotyping was performed using 9 nSSR (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79), and 3 cpSSR markers (ccmp3, ccmp5, ccmp10). For nSSR loci, 88 alleles were identified (on average by 9 alleles per locus). The most common samples were those with the following alleles in the nSSR profiles: VVS2133, VVMD5234, VVMD7249, VVMD25249 и VVMD25267, $VVMD27_{190}$, $VVMD28_{236}$, $VVMD32_{240}$, $VrZAG62_{194}$, $VrZAG79_{251}$. The average effective number of alleles (ne) was 4.101. The average value of actual heterozygosity (Het_o) was 0.678, the average value of observed heterozygosity (Het_e) - 0.734. The average Shannon-Winner coefficient (I) value was 1.635. Six alleles were identified for cpSSR loci: $ccmp3_{106}$, $ccmp3_{107}$, $ccmp5_{104}$, $ccmp5_{105}$, $ccmp10_{114}$, $ccmp10_{115}$. It was established that A chlorotype was confirmed for 38 samples of wild grapes, C chlorotype – for 2 samples and D chlorotype – for 10 samples. A dendrogram constructed on the basis of genetic distance matrix showed the presence of 3 clusters, which included 25, 18 and 7 samples, respectively. Samples with A chlorotype were represented in 3 clusters; with D chlorotype – in 2 clusters; with C chlorotype – in 1 cluster. It was revealed that samples No. 7 and No. 37 had an identical genotype. Among the wild forms, microsatellite profiles corresponding to the genotypes 'Moldova', 'Muscat a Petit Grains', 'Primitivo', 'Semillon' and 'Chaush Chernyi' were identified.

Key words: wild growing forms of grapes, *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Gmel.) Hegi, *Vitis vinifera* ssp. *sativa* (DC.) Hegi, genotyping, microsatellite markers, allele polymorphism, chlorotypes

Введение

Дикорастущие формы винограда на просторах Евразии представлены смесью одичавших представителей культурного винограда *Vitis vinifera* L. ssp. *sativa* (DC) Hegi. и собственно дикого винограда *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Gmel.) Hegi., который считается прародителем культурных, в т.ч. местных аборигенных, сортов (Звягин, Трошин, 2010; De Adres et al., 2012; Barth et al., 2009; Cunha et al., 2010). Только в ограниченном ареале в Восточной Азии встречаются иные виды дикого винограда, в частности *V. amurensis, V. bashinica, V. davidii, V. liubanensis, V. piazezkii, V. romanetii* и др. (Звягин, Трошин, 2010). Популяции дикорастущего винограда, в т.ч. *V. vinifera* ssp. *sylvestris*, в последние 200 лет значительно сократились из-за проникновения североамериканских патогенов винограда, вызывающих филлоксеру, оидиум и милдью, а также по причине исчезновения его прежней среды обитания (Grassi et al., 2010). Изучение генетических ресурсов представителей дикого вида винограда и аборигенных сортов является актуальным, поскольку позволяет принять меры по сохранению биоразнообразия и предотвращению генетической эрозии, а также пополнить базу данных генотипов для использования в селекционных программах. В качестве центров происхождению культурного винограда на территории Евразии рассматривают Ближний Восток и Западную часть Средиземного моря (Arroyo-Garcia et al., 2006). При этом с точки зрения биологического разнообразия виноградных лоз выделяют регион Северного Причерноморья, в частности Крым (Звягин, Трошин, 2010). Для оценки генетического разнообразия сортов и форм растений широко применяют ядерные (nSSR) и хлоропластные (cpSSR) микросателлитные локусы (маркеры), которые представляют собой тандемные повторы простых последовательностей из 2…6 нуклеотидов в структуре ДНК (Pei et al., 2023; This et al., 2004). Данные локусы характеризуются высоким полиморфизмом за

счёт сайт-специфичного варьирования длины повтора, кодоминантным типом наследования (ядерный геном) или наследованием по материнской линии (хлоропластный геном), а также высокой воспроизводимостью результатов. Это даёт возможность идентифицировать исследуемые образцы по ДНК-профилям и оценивать их генетические взаимосвязи (Рисованная, Гориславец, 2018). Наиболее широкой базой данных по микросателлитным профилям nSSR- и cpSSR-локусов сортов винограда является Vitis International Variety Catalogue (VIVC) (https://www.vivc.de). Тем не менее, информация по профилям для многих аборигенных сортов, а также форм *V. vinifera* ssp. *sylvestris* в данной базе не представлена. В связи с этим пополнение информации по генетическим профилям дикорастущих форм винограда является актуальной задачей.

Цель исследования – идентификация ДНК-профилей образцов дикорастущих форм винограда Крыма для оценки их генетического разнообразия с использованием nSSR- и cpSSR-маркеров.

Материалы и методика исследований

В исследование включены 50 образцов дикорастущих форм винограда Крыма, собранных в горно-лесной зоне вдоль юго-западной части Главной гряды Крымских гор в 2019…2021 гг. Образцы отбирались в местах, удалённых от насаждений культурного винограда. ДНК экстрагировали из молодых листьев и зелёной камбиальной ткани побегов с использованием ЦТАБ-буфера (Звягин и др., 2005). Отбор образцов дикорастущих форм винограда и выделение ДНК из растительного материала выполнены сотрудниками лаборатории молекулярно-генетических исследований ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН» под руководством ведущего научного сотрудника, к.б.н. С.М. Гориславец. Чистоту и количество ДНК оценивали методом спектрофотометрирования на приборе «Biophotometer plus». Генотипирование проводили по рекомендованным Международной организацией виноградарства и виноделия (OIV) 9 ядерным (VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79, VVS2) и 3 хлоропластным (ccmp3, ccmp5, ccmp10) SSR-маркерам (Arroyo-Garcia et al., 2006, This et al., 2004). Полимеразная цепная реакция (ПЦР) выполнена на амплификаторе «T100 Thermal Cycler» (BioRad) по ранее отработанному протоколу (Гориславец и др., 2019; Методика, 2010). Для проведения ПЦР использовали синтезированные компанией «Синтол» реакционную смесь 2.5х (в состав входят KCl, трисHCl (pH 8.8), $MgCl_2$, SynTaq ДНК-полимераза, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween 20) и праймеры с флуоресцентными метками FAM, TAMRA, R6G. Фрагментный анализ ПЦР-продуктов выполнен на генетическом анализаторе «ABI Prism 3130» с использованием программного обеспечения «GeneMapper 4.1». Идентификацию образцов проводили путём сравнения полученных nSSR- и cpSSR-профилей с результатами, приведёнными в базе данных Vitis International Variety Catalogue (VIVC). В качестве референсных использовались сорта с известным аллельным составом – Каберне Совиньон и Пино Нуар. Статистическую оценку аллельной вариабельности nSSR-локусов проводили с использованием программы «PopGen 32», расчёт матрицы генетических дистанций и построение дендрограммы генетического сходства по методу UPGMA – с применением программы «DARwin 6.0».

Результаты и их обсуждение

В процессе исследования были изучены 50 образцов дикорастущего винограда, собранных в горно-лесной зоне Крыма. Для оценки генетического разнообразия изученные образцы были генотипированы по ядерным микросателлитным маркерам (nSSR-локусам). При изучении полученных ДНК-профилей выявлено 88 аллелей, что в среднем составило 9 аллелей/локус (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика полиморфизма nSSR-локусов в генотипах дикорастущих форм винограда Крыма

Локус	na	ne	Het_o	Het_e	Ave Het	I
VVS2	11	5,0916	0,8600	0,8117	0,8036	1,8944
VVMD5	11	4,7125	0,6400	0,7958	0,7878	1,8514
VVMD7	10	4,6948	0,7800	0,7949	0,7870	1,7375
VVMD25	10	5,6948	0,6600	0,8327	0,8244	1,8887
VVMD27	9	2,0300	0,4400	0,5125	0,5074	1,2042
VVMD28	13	5,6117	0,7000	0,8301	0,8218	2,0003
VVMD32	9	3,3003	0,6600	0,7040	0,6970	1,5255
VrZAG62	7	2,9326	0,7200	0,6657	0,6590	1,3123
VrZAG79	8	2,8441	0,6400	0,6549	0,6484	1,3020
Среднее	9,7778	4,1014	0,6778	0,7336	0,7263	1,6352
Стандартное отклонение	1,7873	1,3419	0,1151	0,1081	0,1070	0,3031

Примечания: na – число вариантов аллелей; ne – эффективное число аллелей; Het_o – фактическая гетерозиготность; Het_e – ожидаемая гетерозиготность; Ave Het – средняя гетерозиготность; I – информационный индекс Шеннона-Виннера.

Диапазон числа аллелей на локус (na), полученных в нашем исследовании, находился в пределах от 7 (локус VrZag 62) до 13 (локус VVMD 28). Среднее значение эффективного число аллелей (ne), учитывающее частоту их встречаемости, составило 4,101. Наблюдаемая гетерозиготность (Het_o) находилась в пределах от 0,440 (VVMD27) до 0,860 (VVS2), ожидаемая гетерозиготность (Het_e) – в диапазоне от 0,655 (VrZAG79) до 0,833 (VVMD25). Среднее значение Het_o (0,678) было немного меньше Het_e (0,734), что может свидетельствовать о незначительном инбредном характере популяции (Чесноков, 2015). Среднее значение коэффициента Шеннона-Виннера (I), характеризующего разнообразие популяции, составило 1,635. Наше исследование явилось продолжением работы по изучению дикорастущих форм винограда Крыма, проводимых в лаборатории молекулярно-генетических исследований ВННИИВиВ «Магарач» (Гориславец и др., 2017; Гориславец и др., 2020). Полученные в данном исследовании результаты соответствуют полученным ранее (na = 9,778; ne = 4,318; I = 1,692) (Гориславец и др., 2020). Следует отметить, что полученные нами средние значения гетерозиготности, хотя и отличаются от полученных ранее (Het_o = 0,723; Het_e = 0,749) в меньшую сторону, однако имеют сравнимые с ними значения. При этом закономерность $Het_o < Het_e$ по результатам нашего исследования сохраняется и выражена более чётко. Установлено, что среди исследованных наиболее часто встречаются образцы, в микросателлитных профилях которых выявлены следующие аллели: $VVS2_{133}$ (p = 0,33), $VVMD5_{234}$ (p = 0,31), $VVMD7_{249}$ (p = 0,25), $VVMD25_{249}$ и $VVMD25_{267}$ (p = 0,24), $VVMD27_{190}$ (p = 0,69), $VVMD28_{236}$ (p = 0,30), $VVMD32_{240}$ (p = 0,46), $VrZAG62_{194}$ (p = 0,49), $VrZAG79_{251}$ (p = 0,42) (таблица 2).

Доля аллелей с минимальной частотой (p = 0,01) находилась в пределах от 11 (VVMD32) до 30% (VVMD7 и VVMD25). Таким образом, все рассмотренные локусы являются полиморфными. В отличие от nSSR-маркеров, хлоропластные маркеры (cpSSR-маркеры) имеют меньшее количество вариаций, что позволяет оценить возможное происхождение образцов винограда (Arroyo-Garcia et al., 2006). На основании размеров аллелей cpSSR-локусов выделяют несколько гаплотипов (хлоротипов). В таблице 3 приведены полученные размеры аллелей nSSR- и cpSSR-локусов исследованных дикорастущих форм. В микросателлитных профилях срДНК исследованных образцов выявлены 6 аллелей: $ccmp3_{106}$, $ccmp3_{107}$, $ccmp5_{104}$, $ccmp5_{105}$, $ccmp10_{114}$, $ccmp10_{115}$. На основании полученных размеров аллелей были идентифицированы хлоротипы (Arroyo-Garcia et al., 2006). При этом, как и в предыдущих исследованиях дикорастущего винограда Крыма (Гориславец и др., 2020), выявлены формы, имеющие хлоротипы A (38 образцов) и D (10).

Таблица 2 – Частота встречаемости аллелей по nSSR-локусам в генотипах дикорастущих формах винограда Крыма

nSSR-локусы																	
VVS2		VVS2		VVS2		VVS2		VVS2		VVS2		VVS2		VVS2		VVS2	
п.н.	р	п.н.	р	п.н.	р	п.н.	р	п.н.	р	п.н.	р	п.н.	р	п.н.	р	п.н.	р
133	0,33	220	0,01	233	0,01	239	0,14	237	0,01	228	0,15	234	0,01	186	0,01	237	0,01
135	0,02	226	0,05	239	0,22	241	0,09	243	0,07	234	0,02	240	0,46	188	0,09	243	0,07
141	0,02	228	0,02	243	0,01	249	0,24	247	0,41	236	0,30	248	0,04	194	0,49	247	0,41
143	0,05	230	0,30	247	0,02	251	0,02	249	0,02	244	0,01	250	0,28	196	0,29	249	0,02
145	0,08	232	0,05	249	0,25	255	0,08	251	0,42	246	0,02	252	0,02	200	0,01	251	0,42
147	0,04	234	0,31	251	0,05	257	0,16	255	0,02	248	0,04	256	0,08	202	0,02	255	0,02
151	0,18	236	0,03	257	0,01	259	0,01	257	0,02	252	0,21	258	0,05	204	0,09	257	0,02
153	0,01	238	0,06	259	0,12	261	0,01	259	0,03	254	0,01	264	0,02			259	0,03
155	0,20	240	0,04	261	0,02	265	0,01	194	0,03	258	0,09	272	0,04				
157	0,01	242	0,12	263	0,29	267	0,24			264	0,10						
165	0,06	244	0,01							266	0,01						
										268	0,02						
										270	0,02						

Примечания: п.н. – размер аллеля (в парах нуклеотидов); р – частота встречаемости

Таблица 3 – Микросателлитные профили исследованных дикорастущих форм винограда Крыма

№ образца	Хлоропластные локусы, п.н.				Ядерные локусы, п.н.																	
	ccmp3	ccmp5	ccmp10	хлоротип	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD25		VVMD27		VVMD28		VVMD32		VrZAG62		VrZAG79	
1	106	105	114	A	147	155	232	232	249	249	239	261	190	190	228	228	240	250	194	194	247	247
2	106	105	114	A	133	145	226	242	251	259	249	255	188	190	258	264	240	240	194	204	251	251
3	**107**	**104**	**115**	**D**	**133**	**133**	**238**	**240**	**239**	**257**	**241**	**249**	**176**	**186**	**234**	**244**	**240**	**272**	**188**	**194**	**247**	**251**
4	106	105	114	A	133	145	230	234	239	263	241	259	180	190	236	266	250	272	194	196	249	251
5	107	104	115	D	151	165	230	242	263	263	239	241	190	190	252	264	240	256	194	196	251	251
6	106	105	114	A	133	145	236	236	239	239	251	257	190	190	228	236	240	256	188	196	243	247
7	106	105	114	A	147	155	230	230	249	259	267	267	190	190	252	252	240	250	194	194	247	251
8	**106**	**105**	**116**	**C**	**133**	**143**	**228**	**238**	**247**	**249**	**239**	**239**	**182**	**182**	**248**	**258**	**256**	**264**	**200**	**204**	**237**	**259**
9	**106**	**105**	**116**	**C**	**135**	**151**	**230**	**240**	**247**	**249**	**249**	**255**	**180**	**184**	**258**	**258**	**252**	**272**	**188**	**204**	**247**	**249**
10	107	104	115	D	147	155	230	242	239	263	249	249	190	190	228	228	248	250	188	194	247	251
11	107	104	115	D	155	155	234	234	239	251	249	257	190	190	236	264	240	240	196	204	247	247
12	106	105	114	A	133	155	226	242	239	249	249	267	190	190	252	252	240	256	194	196	243	251
13	106	105	114	A	143	151	228	230	239	239	255	267	188	194	248	252	250	256	188	194	251	257
14	107	104	115	D	155	155	220	242	239	251	249	249	190	192	236	264	240	250	196	204	247	251
15	106	105	114	A	133	145	234	234	239	239	249	257	190	190	228	236	240	256	188	196	243	247
16	107	104	115	D	165	165	234	234	251	263	257	257	190	192	236	264	250	258	196	204	247	251
17	106	105	114	A	133	151	230	234	249	263	239	267	190	190	236	252	240	240	194	196	247	251
18	106	105	114	A	133	133	230	234	249	263	249	267	182	192	228	228	250	250	194	194	251	259
19	106	105	114	A	133	145	234	234	259	263	239	255	190	192	236	268	240	250	194	196	251	251
20	106	105	114	A	133	151	234	240	249	249	249	257	190	190	252	264	240	240	194	196	243	247
21	106	105	114	A	151	155	230	242	249	263	249	265	190	192	234	254	240	250	194	194	247	247
22	106	105	114	A	155	165	230	230	249	263	257	257	190	190	228	248	240	258	194	194	247	251
23	106	105	114	A	151	155	234	234	239	263	251	255	190	192	228	264	250	258	194	196	247	247
24	106	105	114	A	133	155	230	238	239	249	239	249	180	192	236	236	250	250	194	194	251	251
25	**107**	**104**	**115**	**D**	**133**	**133**	**230**	**238**	**233**	**249**	**241**	**249**	**180**	**194**	**246**	**268**	**264**	**272**	**186**	**196**	**251**	**255**
26	106	105	114	A	145	151	230	234	239	263	241	249	186	190	252	264	240	240	194	204	251	251
27	106	105	114	A	133	133	232	234	249	263	239	249	190	190	236	258	240	240	194	196	247	247

продолжение таблицы 3

№ образца	Хлоропластные локусы, п.н.				Ядерные локусы, п.н.																	
	ccmp3	ccmp5	ccmp10	хлоротип	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD25		VVMD27		VVMD28		VVMD32		VrZAG62		VrZAG79	
28	106	105	114	A	133	155	232	234	239	263	267	267	190	190	236	252	240	250	194	204	247	247
29	106	105	114	A	133	141	230	240	239	249	239	267	190	190	252	252	240	250	194	202	243	247
30	106	105	114	A	151	157	234	244	239	261	257	267	190	192	236	258	248	248	194	196	251	251
31	106	105	114	A	133	151	234	234	263	263	257	267	190	190	236	264	240	240	194	194	247	247
32	106	105	114	A	133	151	230	234	263	263	249	267	190	190	228	258	240	240	194	196	247	251
33	106	105	114	A	151	155	230	230	259	263	267	267	190	190	252	252	240	240	194	196	247	251
34	**106**	**105**	**114**	**A**	**133**	**135**	**238**	**242**	**243**	**251**	**241**	**255**	**182**	**194**	**228**	**236**	**252**	**256**	**188**	**194**	**255**	**257**
35	107	104	115	D	133	151	234	234	263	263	239	249	190	190	270	270	250	258	194	194	247	251
36	106	105	114	A	133	151	230	242	249	263	267	267	190	190	228	236	240	250	194	194	243	247
37	106	105	114	A	147	155	230	230	249	259	267	267	190	190	252	252	240	250	194	194	247	251
38	106	105	114	A	151	155	230	230	249	259	267	267	190	190	236	258	240	250	196	196	247	251
39	106	105	114	A	133	155	234	242	259	263	249	249	190	190	236	248	240	240	194	196	247	251
40	106	105	114	A	133	151	234	236	259	263	249	257	190	190	236	258	250	250	194	196	251	251
41	106	105	114	A	133	155	234	234	261	263	249	267	188	190	236	264	240	240	196	204	247	247
42	107	104	115	D	133	153	230	230	259	259	241	249	182	190	236	236	240	250	194	196	251	251
43	106	105	114	A	133	143	226	226	239	259	257	257	190	190	236	252	250	256	194	196	251	251
44	106	105	114	A	133	155	232	242	249	263	267	267	188	190	236	236	234	240	194	196	247	251
45	107	104	115	D	143	151	226	230	249	263	255	257	182	190	236	252	250	250	194	194	247	251
46	106	105	114	A	133	165	230	234	239	259	257	257	190	190	228	236	240	250	188	196	247	251
47	106	105	114	A	143	145	234	234	249	249	241	255	182	190	228	236	240	258	194	194	247	259
48	106	105	114	A	155	165	230	238	249	263	239	239	190	190	236	236	240	248	196	196	247	251
49	106	105	114	A	145	151	234	242	239	263	241	267	186	190	246	252	240	240	188	196	251	251
50	106	105	114	A	133	141	230	242	239	249	239	239	190	190	252	252	240	250	194	202	243	247

Примечания: Микросателлитные профили выравнены относительно референсных сортов Каберне Совиньон и Пино Нуар. ***Жирным шрифтом*** *выделены идентифицированные образцы (образец №3 идентифицирован как сорт Semillon, №8 – Primitivo, №9 – Chaouch Blank, №25 – Muscat a petit grains, №34 – Moldova).*

Кроме того, в данном исследовании идентифицированы также 2 образца (№8 и №9) с хлоротипом C, который не был описан ранее для дикорастущих форм Крыма. Известно, что хлоротип A характерен для образцов винограда западноевропейского происхождения, а хлоротип D – для образцов восточного происхождения (Riaz et al., 2018; Zdunic et al., 2017). Поскольку состав дикорастущего винограда Крыма определяется сочетанием как представителей *V. vinifera* ssp. *sylvestris*, так и одичавшими формами *V. vinifera* ssp. *sativa*, наличие выявленных хлоротипов может являться результатом сложной истории перемещения прародителей указанных образцов. Для оценки генетического сходства изученных образцов на основе nSSR-профилей с использованием метода попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (UPGMA) была рассчитана матрица генетических дистанций и построена дендрограмма (рисунок 1).

Как следует из приведённого рисунка, образцы объединились в 3 кластера, включающих 2…3 подкластера соответственно с 25, 18 и 7 образцами. При этом образцы с хлоротипом A были представлены во всех трёх кластерах; образцы с хлоротипом D находились в первом и втором кластерах; 2 идентифицированных нами образца с хлоротипом C попали во второй кластер. Также выявлено, что образцы №7 и №37, попавшие в первый кластер, имели идентичный генотип, что вероятно связано с трудностями отбора дикорастущих лоз, которые могут разрастаться на несколько метров.

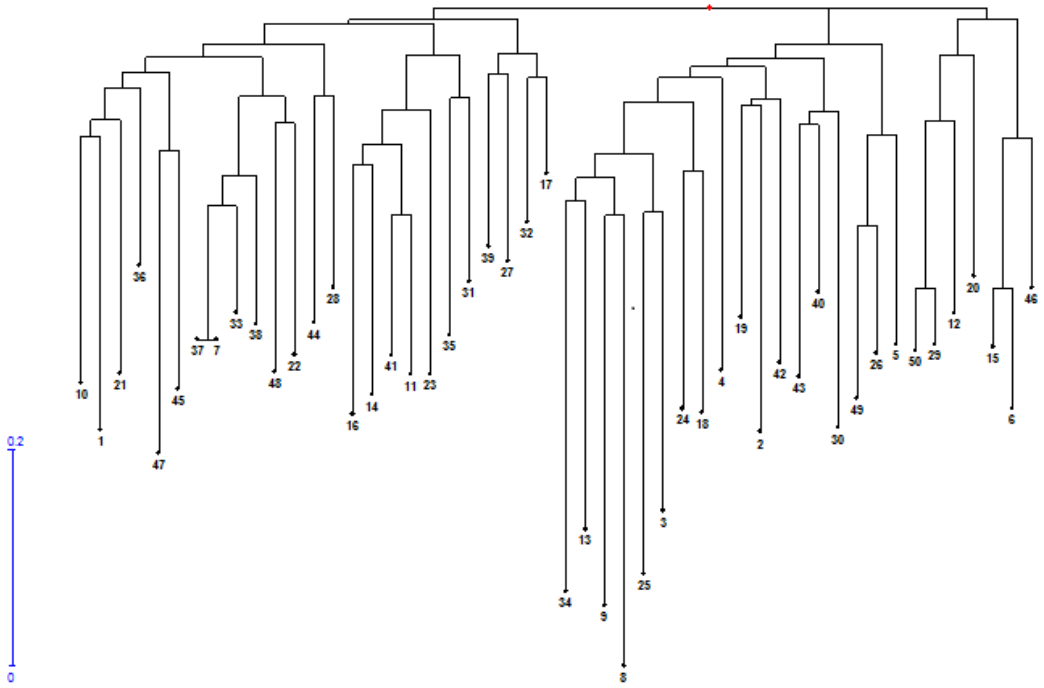

Рисунок1 – Дендрограмма генетического сходства
дикорастущих форм винограда Крыма по методу UPGMA

Сравнительный анализ полученных микросателлитных профилей nДНК и срДНК с данными базы VIVC (https://www.vivc.de) позволил идентифицировать среди дикорастущих форм винограда микросателлитные профили, которые соответствовали генотипам: Семильон (образец №3), Примитиво (№8), Чауш чёрный (№9), Мускат а пти гран (№25), Молдова (№34). Таким образом, примечательно, что выявленные нами образцы (№8 и №9) с хлоротипом С являются одичавшими культурными сортами. Следует также отметить, что все вышеупомянутые 5 образцов, относящихся к культурным сортам, а также образец №13 объединились в один подкластер, что свидетельствует об их генетическом сходстве. Французский винный сорт **Семильон** по морфологическим признакам принадлежит к западноевропейской эколого-географической группе сортов винограда. Был завезён в Крым в XVIII веке и наиболее распространен в Алуштинской долине, в окрестностях горы Чатыр-Даг. Известный с XIX столетия столовый сорт **Чауш чёрный** появился в Малой Азии, относится к эколого-географической группе сортов бассейна Черного моря. В Крыму данный сорт, главным образом, сосредоточен в Алуштинском районе и в окрестностях Балаклавы. **Примитиво** – винный сорт балканского происхождения, по морфологическим признакам принадлежит к западноевропейской эколого-географической группе. Возможно, завезён в Крым генуэзскими мореплавателями в Средние века. **Мускат а пти гран** – винный сорт родом из Греции или Италии. Данный сорт в связи с древностью его происхождения также мог попасть на Крымский полуостров в результате миграции народов. Столовый сорт **Молдова** – сложный межвидовой гибрид (Гузаль кара × Вилллар блан), выращиваемый в Южнобережной зоне Крымского полуострова. Его семена в горно-лесную зону могли быть занесены птицами. Оставшиеся неидентифицированными образцы крымского дикорастущего винограда могут относиться как к *V. vinifera* ssp. *sylvestris*, так и к одичавшим аборигенным сортам, которые на данный момент не представлены в базе VIVC.

Выводы

В результате проведённого исследования 50 образцов дикорастущего винограда, произрастающего в горно-лесной зоне Крыма, были генотипированы по ДНК-профилям 9 ядерных (nSSR) и 3 хлоропластных (cpSSR) микросателлитных локусов. Выявлено высокое разнообразие аллельного спектра nSSR-локусов, идентифицировано 88 вариантов аллелей, среднее число аллелей на локус (n) составило 9,7. Наибольшая частота встречаемости отмечена для образцов, в генотипах которых присутствуют аллели: $VVS2_{133}$, $VVMD5_{234}$, $VVMD7_{249}$, $VVMD25_{249}$ и $VVMD25_{267}$, $VVMD27_{190}$, $VVMD28_{236}$, $VVMD32_{240}$, $VrZAG62_{194}$, $VrZAG79_{251}$. Среднее значение Het_o (0,678) было немного меньше Het_e (0,734), что может свидетельствовать о незначительном инбредном характере популяции. По cpSSR-локусам выявлены аллели: $ccmp3_{106}$, $ccmp3_{107}$, $ccmp5_{104}$, $ccmp5_{105}$, $ccmp10_{114}$, $ccmp10_{115}$. На основе этого идентифицированы хлоротипы A, C и D. Установлено, что 76% исследованных образцов имели хлоротип A. Согласно полученной методом UPGMA дендрограмме генетического сходства, образцы с хлоротипом A представлены в трёх кластерах; с хлоротипом D – в двух, с хлоротипом C – в одном кластере. На основании данных информационной базы VIVC, среди изученных дикорастущих образцов идентифицированы 5 сортов: Молдова, Мускат а пти гран, Примитиво, Семильон, Чауш чёрный. Таким образом, полученные данные позволяют расширить информацию о ДНК-профилях дикорастущих форм Крыма и определить генетические отношения образцов. Работа по отбору и генотипированию образцов дикорастущего винограда Крыма продолжается.

Благодарности

Работа выполнена в рамках государственного задания № FNZM-2022-0008. Автор выражает благодарность к.б.н. Гориславец С.М. за руководство отбором дикорастущих образцов и предоставленные образцы ДНК растительного материала для исследования, к.б.н. Рисованной В.И. – за научно-консультационную поддержку в процессе выполнения исследования, м.н.с. Г.Ю. Спотарю – за техническое обеспечение работы генетического анализатора.

Acknowledgments

The work was carried out within the framework of state assignment No. FNZM-2022-0008. The author expresses his gratitude to the Cand. Biol. Sci. Gorislavets S.M. for guiding the selection of wild growing samples and providing DNA samples of plant material for research, Cand. Biol. Sci. Risovannaya V.I. – for scientific and consulting support during the research process, Junior Staff Scientist Spotar G.Yu. – for technical maintenance operation of genetic analyzer.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Гориславец С.М., Рисованная В.И., Волков Я.А., Колосова А.А., Володин В.А. Поиск и оценка дикорастущих форм винограда, произрастающих на территории Ялтинского горно-лесного природного заповедника, с использованием молекулярных маркеров // Магарач. Виноградарство и виноделие. 2017. №1. С. 19-21. EDN: YGUPJP
2. Гориславец С.М., Володин В.А., Колосова А.А., Волков Я.А., Спотарь Г.Ю., Рисованная В.И. Характеристика биологического разнообразия аборигенных и диких форм *Vitaceae* Juss. как важнейшего ресурса зародышевой плазмы Крыма на основе анализа

микросателлитных локусов // Вестник РФФИ. 2020, № 2. С. 25-37. https://doi.org/10.22204/2410-4639-2020-106-02-25-37. EDN: PEQNDB
3. Гориславец С.М., Володин В.А., Спотарь Г.Ю., Рисованная В.И., Алексеев Я.И. Генотипирование сортов винограда селекции Института «Магарач» на основе анализа аллельного полиморфизма SSR локусов // Магарач. Виноградарство и виноделие. 2019. Т. 21, № 4. С. 289-293. https://doi.org/10.35547/IM.2019.21.4.002. EDN: HQGYYF
4. 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: сборник трудов конференции. Краснодар: СКФНЦСВВ. 2005. Т. 2. С. 113-117. EDN: RBDQAH
5. Звягин А.С., Трошин Л.П. О происхождении дикого и культурного винограда // Труды КубГАУ. 2010, № 25. С. 84-88. EDN: MWEORZ
6. Методика генотипирования, идентификации и регистрации генотипов винограда с помощью анализа микросателлитных локусов (SSR-PCR) / РД 00 384830-064. 2010, 21 с.
7. Рисованная В.И., Гориславец С.М. К вопросу о генетическом родстве сортов винограда Джеват кара и Буланый // Магарач. Виноградарство и виноделие. 2018. № 2. С. 4-6. EDN: XQFXBR
8. Чесноков Ю.В.. Артемьева А.М. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50, № 5. С. 571-578. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.5.571rus. EDN: UXSRIX
9. De Adres M.T., Benito A., Perez-Rivera G., Ocete R., Lopez M.A., Gaforio L., Arroyo-Garcia R. Genetic diversity of wild grapevine populations in Spain and their genetic relationships with cultivated grapevines // Molecular Ecology. 2012. Vol. 21, N 4. P. 800-816. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05395.x
10. Arroyo-Garcia R., Ruiz-Garcia L., Bolling L., Ocete R., Lopez M.A., Arnold C., Ergul A., Soylemezoglu G., Uzun H.I., Cabello F., Ibanez J., Aradhya M.K., Atanassov A., Atanassov I., Balint S., Cenis J.L., Constantini L., Gorislavets S., Grando M.S., Klein B.I., McGovern P.E., Merdinoglu D., Pejic I., Pelsy F., Primikirios N., Risovannaya V., Roubelakis-Angelakis K.A., Snoussi H., Sotiri P., Tamhankar S., This P., Troshin L., Malpica M., Lefort F., Martinez-Zapater J.M. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms // Molecular Ecology. 2006. Vol. 15, N 12. P. 3707-3714. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03049.x
11. Barth S., Forneck A., Verzeletti F., Blaich R., Schumann F. (2009). Genotypes and phenotypes of an ex situ *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Gmel.) Beger germplasm collection from the Upper Rhine Valley // Genetic Resources and Crop Evolution. 2009. Vol. 56, N 8. P. 1171-1181. https://doi.org/10.1007/s10722-009-9443-1
12. Cunha J., Teixeira-Santos M., Brazao J., Carneiro L.C., Veloso M., Fevereiro P., Eiras-Dias J.E.J. Genetic diversity in Portuguese native *Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera* and ssp. *sylvestris* // Czech J. Genet. Plant. Breed. 2010. Vol. 46. P. 54-56. https://doi.org/10.17221/2447-CJGPB
13. Grassi F., Labra M., Imazio S., Rubio R., Failla O., Scienza A., Sala F. Phylogeographical structure and conservation genetics of wild grapevine // Conservation Genet. 2010. Vol. 7. P. 837-845. https://doi.org/10.1007/s10592-006-9118-9
14. Pei D., Song S., Kang J., Zhang C., Wang J., Dong T., Ge M., Pervaiz T., Zhang P., Fang J. Characterization of simple sequence repeat (SSR) markers mined in whole grape genomes // Genes. 2023. Vol. 14, N 3. P. 663. https://doi.org/10.3390/genes14030663
15. Riaz S., Lorenzis G., Velasco D., Koehmstedt A., Maghra D., Bobokashvili Z., Musayev M., Zdunic G., Laucou A., Walker A., Failla O., Preece J., Aradhya M., Arroyo-Garcia R. Genetic

diversity analysis of cultivated and wild grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions around the Mediterranean basin and Central Asia Riazetal // BMC Plant Biology. 2018. Vol. 18. P. 1-14. https://doi.org/10.1186/s12870-018-1351-0

16. This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Constantini L., Crespan M., Dangl G., Eisenheld C., Ferreira-Monteiro F., Grando S., Ibanez J., Lacombe T., Luacou V., Magalhaes R., Meredith C.P., Milani N., Peterlunger E., Regner F., Zulini L., Maul E. Development of standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars // Theoretical and Applied Genetics. 2004. Vol. 109. P. 1448-1458. https://doi.org/10.1007/s00122-004-1760-3
17. Zdunic G., Maul E., Hancevic K., Leko M., Butorac L., Mucalo A., Maletic E. Genetic diversity of wild grapevine (*Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris* Gmel. Hegi) in the Eastern Adriatic Region // American Journal of Enology and Viticulture. 2017. Vol. 68, N 2. P. 252-257. https://doi.org/10.5344/ajev.2016.16072

References

1. Goryslavets, S.M., Risovannaya, V.I., Volkov, Ya.A., Kolosova, A.A., & Volodin, V.A. (2017). Identification and evaluation of wild growing vines on the territory of Yalta Mountain-Forest Nature Reserve using molecular markers. *Magarach. Viticulture and winemaking*, 1, 19-21. EDN: YGUPJP (In Russian, English abstract).
2. Goryslavets, S.M., Volodin, V.A., Kolosova, A.A., Volkov, Ya.A., Spota,r G.Yu., & Risovannaya, V.I. (2020). Characteristics of the biological diversity of native and wild forms *Vitaceae* Juss. as the most important resource of Crimea vegetation germplasm (gene pool) based on analysis of microsatellite loci. *Russian foundation for basic research journal*, 2, 25-37. https://doi.org/10.22204/2410-4639-2020-106-02-25-37. EDN: PEQNDB. (In Russian, English abstract).
3. Gorislavets, S.M., Volodin, V.A., Spotar, G.Yu., Risovannaya, V.I., & Alekseev, Ya.I. (2019). Genotyping of grape varieties released by the Institute Magarach based on analysis of allelic polymorphism of SSR loci. *Magarach*. *Viticulture and Winemaking*, 21(4), 289-293. https://doi.org/10.35547/IM.2019.21.4.002. EDN: HQGYYF. (In Russian, English abstract)
4. Zvyagin, A.S., Troshin, L.P., Mukhina, Zh.M., & Suprun, I.I. (2005). Adaptation of microsatellite analysis techniques for studying the genetic diversity of grape Pinot blank, Risling varieties and its clonesю In *Innovations and efficiency of production processes in viticulture and winemaking: proc. sci. conf.* (Vol. 2, pp. 113-117). Krasnodar: NCFSCHVW. EDN: RBDQAH. (In Russian)
5. Zvyagin, A.S., & Troshin, L.P. (2010). On wild grape and cultivar origin. *Works of the Kuban state agrarian university*, 25, 84-88. MWEORZ. (In Russian, English abstract)
6. Anonimous (2010). *Technique for genotyping, registering and identification of grape genotypes using microsatellite loci analysis (SSR-PCR) / RD 00 384830-064*. (In Russian)
7. Risovannaya, V.I., & Gorislavets, S.M. (2018). To the issue of genetic affinity of Gevat Kara and Bulanyi grapes. *Magarach. Viticulture and Winemaking*, 2, 4-6. EDN: XQFXBR. (In Russian, English abstract).
8. Chesnokov, Yu.V., & Artemyeva, A.M. (2015). Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Agricultural biology*, 50(5), 571-578. https:// https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.5.571rus. EDN: UXSRIX. (In Russian, English abstract).
9. De Adres, M.T., Benito A., Perez-Rivera G., Ocete R., Lopez M.A., Gaforio L., & Arroyo-Garcia, R. (2012). Genetic diversity of wild grapevine populations in Spain and their genetic relationships with cultivated grapevines. *Molecular Ecology*, 21(4), 800-816. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05395.x

10. Arroyo-Garcia, R., Ruiz-Garcia, L., Bolling, L., Ocete, R., Lopez, M.A., Arnold, C., Ergul, A., Soylemezoglu, G., Uzun, H.I., Cabello, F., Ibanez, J., Aradhya, M.K., Atanassov, A., Atanassov, I., Balint, S., Cenis, J.L., Constantini, L., Gorislavets, S., Grando, M.S., Klein, B.I., McGovern, P.E., Merdinoglu, D., Pejic, I., Pelsy, F., Primikirios, N., Risovannaya, V., Roubelakis-Angelakis, K.A., Snoussi, H., Sotiri, P., Tamhankar, S., This, P., Troshin, L., Malpica, M., Lefort, F., & Martinez-Zapater, J.M. (2006). Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular Ecology*, 15(12), 3707-3714. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03049.x
11. Barth, S., Forneck, A., Verzeletti, F., Blaich, R., & Schumann, F. (2009). Genotypes and phenotypes of an ex situ *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Gmel.) Beger germplasm collection from the Upper Rhine Valley. *Genetic Resources and Crop Evolution,* 56(8), 1171-1181. https://doi.org/10.1007/s10722-009-9443-1
12. Cunha, J., Teixeira-Santos, M., Brazao, J., Carneiro, L.C., Veloso, M., Fevereiro, P., & Eiras-Dias, J.E.J. (2010). Genetic diversity in Portuguese native *Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera* and ssp. *sylvestris. Czech J. Genet. Plant. Breed.*, 46, 54-56. https://doi.org/10.17221/2447-CJGPB
13. Grassi, F., Labra, M., Imazio, S., Rubio, R., Failla, O., Scienza, A., & Sala, F. (2010). Phylogeographical structure and conservation genetics of wild grapevine. *Conservation Genet.*, 7, 837-845. https://doi.org/10.1007/s10592-006-9118-9
14. Pei, D., Song, S., Kang, J., Zhang, C., Wang, J., Dong, T., Ge, M., Pervaiz, T., Zhang, P., & Fang, J. (2023). Characterization of simple sequence repeat (SSR) markers mined in whole grape genomes. *Genes,* 14(3), 663. https://doi.org/10.3390/genes14030663
15. Riaz, S., Lorenzis, G., Velasco, D., Koehmstedt, A., Maghra, D., Bobokashvili, Z., Musayev, M., Zdunic, G., Laucou, A., Walker, A., Failla, O., Preece, J., Aradhya, M., & Arroyo-Garcia, R. (2006). Genetic diversity analysis of cultivated and wild grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions around the Mediterranean basin and Central Asia Riazetal. *BMC plant biology*, 18, 1-14. https://doi.org/10.1186/s12870-018-1351-0
16. This, P., Jung, A., Boccacci, P., Borrego, J., Botta, R., Constantini, L., Crespan, M., Dangl, G., Eisenheld, C., Ferreira-Monteiro, F., Grando, S., Ibanez, J., Lacombe, T., Luacou, V., Magalhaes, R., Meredith, C.P., Milani, N., Peterlunger, E., Regner, F., Zulini, L., & Maul, E. (2004). Development of standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 1448-1458. https://doi.org/10.1007/s00122-004-1760-3
17. Zdunic, G., Maul, E., Hancevic, K., Leko, M., Butorac, L., Mucalo, A., & Maletic, E. (2017). Genetic diversity of wild grapevine (*Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris* Gmel. Hegi) in the Eastern Adriatic Region. *American Journal of Enology and Viticulture*, 68(2), 252-257. https://doi.org/10.5344/ajev.2016.16072

Автор:

Гурий Викторович Корнильев, кандидат биологических наук, ведущий инженер, ФГБУН «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН», gurij-kornilev@yandex.com

Author details:

Hurii Korniliev, PhD in Biology, leading engineer at the All-Russian National Research Institute of Vinegrousing and Winemarking 'Magarach', gurij-kornilev@yandex.com