УДК 638.4

А.С. Звягин, канд. биол. наук, докторант,
Л.П. Трошин, д-р биол. наук, профессор
Кубанский госагроуниверситет

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДИКОРАСТУЩЕГО ВИНОГРАДА СЕВЕРНОГО КАВКАЗА

Приводятся исследования популяций дикого предка культурного винограда Vitis vinifera subsp. silvestris Gmel. на Северном Кавказе с использованием девяти хлоропластных микросателлитных маркеров (cpSSRs). В ходе исследования выявлены 4 гаплотипа, среди них выявлен уникальный, который характерен для популяции, произрастающей в Азербайджане.

Виноград, маркеры, гаплотип, популяция, молекулярно-генетические исследования.

Grape, markers, haplotype, population, molecular and genetic studies.

Введение.

Исследование дикорастущего винограда представляет особый интерес для экологических и исторических целей, а также для управления и сохранения генетических ресурсов.

В Европе, во время четвертичной ледниковой эры, многие виды выжили только в благоприятных регионах и рефугиумах и поэтому путь их генетической дифференциации среди существующих популяций зачастую связан с выживанием в различных рефугиумных зонах в сочетании с генетическим дрейфом и эффектом основателя во время повторного развития. Молекулярные исследования пространственной генетической структуры вместе с археологическими данными (пыльца) помогают раскрыть различные географические маршруты распространения многих видов растений, а именно, на север из рефугиумных зон [11-12].

Виноград – это теплолюбивое растение, произрастающее вдоль средиземноморского региона. Он является важным источником питания с античных времен и люди достаточно сильно воздействовали на его распространение [24]. В частности, генетическое изменение структуры винограда есть результат взаимодействия разных факторов, связанных не только с появлением рефугиумных зон, но также с биогеографическими условиями вдоль средиземноморского бассейна и человеческого влияния.

Культурный виноград (*Vitis vinifera L.*) входит в род *Vitis* (*Tournef.*) *L.*, относящийся к семейству Виноградовых (*Vitaceae Juss.*). Он включает более 960 видов, распространенных в умеренной зоне Европы, Азии, Северной Америки. Н.И. Вавилов определил следующие основные центры происхождения винограда и введения его в культуру [5]:

1) среднеазиатский, охватывающий Северо-Западную Индию, Афганистан, Таджикистан, Узбекистан, Западный Тянь-Шань;

2) переднеазиатский, охватывающий внутреннюю Малую Азию, Закавказье, Иран и горную часть Туркменистана. В этом регионе виноград представлен огромным разнообразием культурных и диких форм.

К европейско-азиатской группе относят один вид: Vitis vinifera L., который включает в себя подвиды *Vitis vinifera subsp. sativa D.C.* (виноград культурный), давший огромное количество культурных сортов, и *Vitis vinifera subsp. silvestris Gmel.* (виноград лесной), который, как считается, является прародителем культурного винограда [2, 5-6].

Для того, чтобы понять процесс доместификации, важно квалифицировать происхождение и миграцию диких средиземноморских популяций. Это связанно с тем, что аллогамный способ размножения и высокий уровень гетерозиготности являются основой составляющих у культуры винограда, поэтому процесс доместификации в основном происходил вегетативным размножением селективных форм с предпочтительными аллельными комбинациями, а именно, наилучшими хозяйственными признаками [25].

Точное происхождение находится под вопросом. В настоящее время считается, что существует два региона происхождения: восточная и западная части Средиземного моря [25]. Также остается невыясненным вопрос: является ли передняя Азия центром происхождения или же нет. Все указывает на то, что регионы Северного Кавказа могут являться одним из главных центров, так как там присутствует очень большое генетическое разнообразие диких виноградных лоз [14, 17].

Задача нашей работы: на основе данных истории провести анализ присутствия генетического разнообразия дикого предка винограда. Для этого использовали генетические маркеры, которые были разработаны в последние годы, а именно, полиморфизм хлоропластной ДНК (cpDNA), которая наследуется по материнской линии [7, 15-16].

Анализ полиморфизма наследуемых геномов является очень полезным для сбора информации об эволюционной истории популяций. В частности, хлоропластный геном (ср), для которого родственное наследование было продемонстрировано у видов *Pinus* [20] и *Abies* [22], имеет несколько особенностей, которые могут использоваться для молекулярного анализа: маленький размер генома и большой объем информации о его структуре. Недавно данный анализ использовался для исследования дикого винограда [13].

Поэтому анализ хлоропластных повторяющихся простых последовательностей (cpSSRs, микросателлиты) дает большой объем информации по полиморфизму, так как присутствует высокой уровень мутаций в данных регионах [22], также позволяют они накапливаться в партеногенетических линиях и поэтому могут давать информацию о степени и распространении генетического разнообразия на межвидовом и внутривидовом уровне [13].

Материал и методы.

Для изучения внутривидовой изменчивости были использованы образцы из 10 географических точек. Образцы дикого винограда были собраны в пределах Северного Кавказа и Причерноморья (северные регионы Черного моря) – 39 экземпляров, относящихся к 10 популяциям, в ходе экспедиций, проводимых кафедрой виноградарства Кубанского государственного аграрного университета в течение 8-ми лет [3-4].

ДНК из собранных образцов выделяли CTAB-методом, модифицированным для виноградной культуры – методика была модифицирована за счет использования NaCl для удаления полисахаридов и PVP (Polyvinylpyrrolidone) – для удаления полифенолов [1]. 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 9 нейтральных хлоропластных микросателлитных маркера: ср3, ср5, ср10, сс5, сс9, сс14, сс23, NTCP 8, NTCP 12 [23]. Один из праймеров имел флюоресцентную метку с Dye Phosphoramidites (6-FAM, HEX).

В ходе исследования для всех праймеров были использованы одинаковые условия ПЦР, позволяющие получить максимальное количество продукта реакции.

Использовалась следующая программа для ПЦР: 2 мин. – 95°С – начальная денатурация, затем последующие 27 циклов:

– денатурация 45 сек. – 94°С;

– 20 сек. отжиг праймеров при 55°С;

– 40 сек. синтез при 72°С;

– последний синтез при 65°С в течение 30 мин.

В работе использовали следующие температуры отжига праймеров: 52°С для маркеров ср5, NTCP 8, NTCP 12; 55°С для маркеров сс9, ср10, сс23, ср3, сс5 и сс14.

ПЦР-смесь включала 10 нг ДНК, 0,2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTPs), 0,23 мкМ каждого праймера, 0,1 единицы Gold Taq-полимеразы (в общем объеме 10 мкл). Амплификация была проведена в амплификаторе 2720 Thermal Cycler фирмы «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: общее количество гаплотипов (A), эффективное число гаплотипов (N_e), генетическое разнообразие (H_e) [19] и средняя генетическая дистанция между образцами (D^2_sh) [8, 10, 18].

Результаты исследования.

В ходе исследования все локусы показали унимодальное распределение, то есть аллели различались на 1 п.н. Данное отличие согласуется с одношаговой мутационной моделью (stepwise mutation model), которая объясняется проскальзыванием микросателлитных повторов при репликации [9, 21]. Кроме того, нерекомбинантная природа хлоропластного генома означает, что неравномерный кроссинговер не может являться главной причиной данного механизма. Все локусы проявили разный уровень полиморфизма в исследуемых популяциях.

Наиболее часто встречающиеся аллели полиморфных локусов являются общими во всех субпопуляциях (табл. 1). В целом все праймеры оказались полиморфными, максимальный полиморфизм найден по локусам ср10, сс14 и сс23 – по три аллеля на локус.

Таблица 1 – Частота встречаемости 20 аллелей по 9 хлоропластным микросателлитным локусам в популяциях *V. vinifera ssp. sylvestris Gmel.*, собранных на Северном Кавказе

Локус	Аллель	Pop 1*	Pop 2*	Pop 3*	Pop 4*	Pop 5*	Pop 6*	Pop 7*	Pop 8*	Pop 9*	Pop 10*
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ср5	103,0	-	-	-	-	-	-	0,3	1,0	-	0,5
	104,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,7	-	1,0	0,5
ср 10	112,0	0,2	-	0,3	1,0	1,0	1,0	0,7	-	-	-
	113,0	0,8	1,0	-	-	-	-	0,3	1,0	1,0	1,0
	114,0	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-
ср3	106,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,7	-	1,0	0,5
	107,0	-	-	-	-	-	-	0,3	1,0	-	0,5

NTCP 8	248,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,7	-	1,0	0,5
	249,0	-	-	-	-	-	-	0,3	1,0	-	0,5
cc5	255,0	-	-	-	-	-	-	0,3	1,0	-	0,5
	256,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,7	-	1,0	0,5
cc9	168,0	0,8	1,0	0,7	-	-	-	0,3	1,0	1,0	1,0
	169,0	0,2	-	0,3	1,0	1,0	1,0	0,7	-	-	-
cc14	204,0	0,2	-	0,3	1,0	1,0	1,0	0,7	-	-	-
	205,0	0,8	1,0	-	-	-	-	0,3	1,0	1,0	1,0
	206,0	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-
NTCP 12	149,0	-	-	-	-	-	-	0,3	1,0	-	0,5
	150,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,7	-	1,0	0,5
cc23	280,0	0,2	-	0,3	1,0	1,0	1,0	0,7	-	-	-
	281,0	0,8	1,0	-	-	-	-	0,3	1,0	1,0	1,0
	283,0	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: Pop 1 – образцы, собранные в Абинске, Pop 2 – образцы, собранные в Армении, Pop 3 – образцы, собранные в Азербайджане, Pop 4 – образцы, собранные в Доманке, Pop 5 – образцы, собранные в Горячем Ключе, Pop 6 – образцы, собранные в Майкопе, Pop 7 – образцы, собранные в Сочи, Pop 8 – образцы, собранные в Кабардино-Балкарии, Pop 9 – образцы, собранные в Туркменистане, Pop 10 – образцы, собранные в Дагестане

Наиболее редкие аллели являются уникальным генетическим материалом, который требует сохранения: аллели 114 по локусу cp10, 206 по локусу cc14 и 283,0 по локусу cc23 – встречаются только в Азербайджанской популяции.

На основе аллельного разнообразия были составлены гаплотипы, характерные для данной географической зоны. Всего было выявлено 4 гаплотипа (рис. 1). При этом уникальным для данных популяций является 4-й гаплотип (haplo-4), он встречается только в образцах, собранных в Азербайджане (Pop 3). Наиболее распространенным является гаплотип 2 (haplo-2), он встречается в 5-ти популяциях, что говорит о близкой взаимосвязи данных популяций и о едином происхождении (табл. 2).

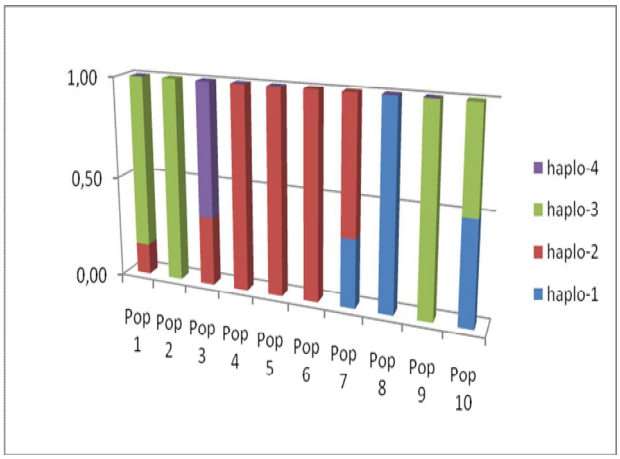

Рисунок 1 – Частота гаплотипов, встречающихся у 10-ти исследуемых популяций

Таблица 2 – Межпопуляционные различия у популяций *V. vinifera ssp. silvestris Gmel.*, собранных на Северном Кавказе

Популяция	A	P	N_e	H_e	D^2_sh	D_st(j)	H_t(j)	F_st(j)
Абинск (Pop 1)	2	0	1,352	0,282	0,501	0,116	0,203	0,572
Армения (Pop 2)	1	0	1,000	0,000	0,501	0,012	0,012	1,000
Азербайджан (Pop 3)	2	1	1,800	0,667	4,741	0,038	0,073	0,529
Доманка (Pop 4)	1	0	1,000	0,000	0,000	0,026	0,026	1,000
Горячий Ключ (Pop 5)	1	0	1,000	0,000	0,000	0,026	0,026	1,000
Майкоп (Pop 6)	1	0	1,000	0,000	0,000	0,077	0,077	1,000
Сочи (Pop 7)	2	0	1,800	0,667	6,000	0,027	0,061	0,443
Кабардино-Балкария (Pop 8)	1	0	1,000	0,000	0,000	0,037	0,037	1,000
Туркменистан (Pop 9)	1	0	1,000	0,000	0,000	0,012	0,012	1,000
Дагестан (Pop 10)	2	0	2,000	0,600	1,667	0,054	0,131	0,413
Сумма	-	-	-	-	-	0,425	0,657	0,647

Несмещенное гаплотипное разнообразие (H_e) показывает на различия в пределах каждой популяции, значения данного показателя варьируют в пределах от 0 до 1. Нулевое значение показывает отсутствие генетического разнообразия внутри групп. В целом все популяции показали единое происхождение, за исключением Азербайджанской, Дагестанской, Сочинской и Абинской популяций. Общее генетическое разнообразие, благодаря внутренней дифференциации, составляет 65,7%.

Выводы.

В ходе исследований можно сделать вывод, что хлоропластные микросателлитные маркеры позволяют выявить взаимосвязи в данных субпопуляциях.

Выявлены четыре гаплотипа, которые характеризуют исследованные субпопуляции. Все популяции генетически взаимосвязаны, при этом уникальной является популяция, отобранная в Азербайджане.

Поэтому необходимо дальнейшее проведение генетического мониторинга популяции *V. vinifera ssp. sylvestris Gmel.* с исследованием материала из других регионов и подключением данных о культурном винограде северокавказского региона. Это будет спо-

собствовать углублению познаний и усовершенствованию вопросов сохранения ценного генофонда подвида *V. vinifera ssp. sylvestris Gmel.* Северного Кавказа.

Литература

1. *Звягин, А. С.* Выделение ДНК из гербарных листьев Vitis vinifera / А. С. Звягин // Научный журнал КубГАУ [Электронный ресурс]. – 2010. – № 58 (4). Режим доступа: http://ej.kubagro.ru/2010/04/pdf/22.pdf.
2. *Негруль, А. М.* Энциклопедия культурных форм винограда // Доклады Академии наук СССР. – 1938. – № 8. – С. 585-585.
3. *Трошин, Л. П.* Международное совещание по реанимации евразийского аборигенного и дикорастущего винограда / Л. П. Трошин, Й. И. Турок, Д. Н. Маградзе // Научный журнал КубГАУ [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2008. – № 02 (36). – Шифр Информрегистра: 0420800012\0030. – Режим доступа: http://ej.kubagro.ru/2008/02/pdf/03.pdf.
4. *Турок, Й. И.* Сохранение генофонда евразийского винограда – первостепенная проблема европейских ампелографов / Й. И. Турок, Д. Н. Маградзе, Л. П. Трошин // Научный журнал КубГАУ [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2006. – № 01 (17). – Шифр Информрегистра: 0420600012\0018. – Режим доступа: http://ej. kubagro.ru /2006 /01/pdf/19.pdf.
5. Энциклопедия виноградарства. – Кишинев: Главная редакция МСЭ, 1986-1987. – ТТ. 1-3.
6. *Akiko, S.* Phylogenetic analysis of the grape family (Vitaceae) based on three chloroplast markers / S. Akiko, W. Jun // American Journal of Botany. – 2006. – № 93 (2). – P. 278-287.
7. *Dumolin, S.* Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method / S. Dumolin, B. Demesure and R. J. Petit // Theor. Appl. Genet. – 1995. – № 91. – P. 1253-1256.
8. *Eliades, N-G.* HAPLOTYPE ANALYSIS: software for analysis of haplotypes data / N-G. Eliades, D. G. Eliades // Distributed by the authors. Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-Augst University Goettingen, Germany. – 2009. – 69 p.
9. *Freimer, N. B.* Microsatellites: evolution and mutational processes / N. B. Freimer, M. Slatkin // In: Variation in the Human Genome. – 1996. – № 197. – P. 51-72.
10. *Goldstein, D. B.* An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci / D. B. Goldstein, A. R. Linares, L. L. Cavallisforza, M. W. Feldman // Genetics. – 1995. – № 139. – P. 463-471.
11. *Hewitt, G. M.* Post-glacial re-colonization of European biota / G. M. Hewitt // Biol. J. Linn. Soc. – 1999. – № 68. – P. 87-112.
12. *Huntley, B.* An atlas of past and present pollen maps of Europe: 0-13000 years ago / B. Huntley, H. J. B. Birks // Cambridge University Press: Cambridge. – 1983. – 45 p.
13. *Imazio, S.* Chloroplast microsatellites to investigate the origin of grapevine / S. Imazio, M. Labra, F. Grassi1, A. Scienza and O. Failla // – Genetic Resources and Crop Evolution. – 2006. – № 53. – P. 1003-1011.
14. *Levadoux, L.* Les populations sauvages et cultives de Vitis vinifera. L. / L. Levadoux // Ann. Amelior. Plantes. – 1956. – № 6. – P. 59-118.
15. *Morgante, M.* Analysis of hypervariable chloroplast microsatellites in Pinus halepensis reveals a dramatic bottleneck / M. Morgante, N. Felice, G. G. Vendramin // In: Karp A eds Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals, Chapman and Hall. – 1998. – P. 402-412.
16. *Nei, M.* Analysis of gene diversity in subdivided populations / M. Nei // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1973. - № 70. – P. 3321-3323.
17. *Olmo, H. P.* The origin and domestication of vinifera grape / H. P. Olmo // The origin and ancient history of wine. Gordon and Breach, Luxembourg. – 1995. – P. 31-43.
18. *Palme, A. E.* Chloroplast DNA variation, postglacial recolonisation and hybidisation in hazel, Corylus avellana / A. E. Palme, G. Vendramin // Mol. Ecol. – 2002. - № 11. – P. 1769-1779.
19. *Provan, J.* Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution / J. Provan, W. Powell, P. H. Hollingsworth // Trends Ecol. Evol. – 2001. – № 16. – P. 142-147.
20. *Richardson, T.* Hybridization of microsatellites to RAPD: a new source of polymorphic markers / T. Richardson, S. Cato, J. Ramser, G. Kahl, K. Weising // Nucleic Acids Research. – 1995. – № 23. – P. 3798-3799.
21. *Valdes, A. M.* Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited // Genetics / A. M. Valdes, M. Slatkin and N. B. Freiner. – 1993. – № 133. – P. 737-749.
22. *Vendramin, G. G.* Characterization and inheritance of polymorphic plastid microsatellites in Abies / G. G. Vendramin, B. Ziegenhagen // Genome. – 1997. – № 40 (6). – P. 857-864.
23. *Weising, K.* A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphism in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms / K. Weising, R. Gardner // Genome. – 1999. – № 42. – P. 9-19.
24. *Zohary, D.* Beginnings of fruit growing in the Old World / D. Zohary, P. Spiegel-Roy // Science. – 1975. – Vol. 187: 319-327.
25. *Zohary, D.* Domestication of Plants in the Old World: The Origin and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe and the Nile Valley / D. Zohary, M. Hopf. – 3rd edn. Oxford University, 2000. – 340 p.

Звягин Андрей Сергеевич, канд. биол. наук, докторант
Трошин Леонид Петрович, д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой виноградарства, 8(861)221-59-04
Кубанский госагроуниверситет