

УДК 634.8

КОНЦЕПТУАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ ВИНОГРАДА

**Владимир Владимирович Лиховской, Владимир Александрович Волинкин,
Алла Анатольевна Полулях, Наталья Леонидовна Студенникова,
Геннадий Юрьевич Спотарь**

Всероссийский национальный научно-исследовательский
институт виноградарства и виноделия «Магарах»
298600, Республика Крым, г. Ялта, ул. Кирова, 31 Россия
E-mail: volynkin@magarach-institut.ru

Научные знания по генетике и селекции винограда формируются на основе общих законов генетики растений, которые реализуются в селекции культуры. Применительно к конкретной культуре винограда формируется частная генетика и соответствующие селекционные закономерности. В статье приводятся результаты изучения форм дикорастущего лесного винограда Крыма, что анализируется как эколого-генетическая популяция определенного места обитания. Формирование концептуального развития генетики и селекции винограда проводится с учетом анализа исследований на молекулярно-генетическом уровне от популяций дикорастущего винограда до конкретных селективируемых признаков, что отражено в настоящей публикации как результат исследований культуры винограда в Институте «Магарах».

Ключевые слова: *виноград; генетика; селекция; популяции; молекулярно-генетические методы*

Введение

Генетика, геномика и селекция являются тремя пересекающимися и дополняющими друг друга областями научных знаний, предназначены для всестороннего и частного анализа геномов растений и их направленного улучшения. Генетика и селекция растений внесли огромный вклад в разработку нескольких новых концепций и для выяснения генов, и геномов растений, а также в создание огромного количества сортов сельскохозяйственных культур с желаемыми характеристиками, а геномика отразила природу генов, генных продуктов и геномов и также предоставила дополнительные ресурсы для улучшения культур.

В современном мире исследования и использование генетики, геномики и селекции растений по существу требуют глубокого понимания их компонентов, включая классическую, биохимическую, цитологическую и молекулярную генетику и традиционная, молекулярная, трансгенная и геномная селекция. Классическая генетика и традиционная селекция внесли огромный вклад, даже используя подход «от фенотипа к генотипу».

Передовые технологии, которые в настоящее время обсуждаются, предполагают создание и использование новых или чужеродных генов, но забывается о бесконечном богатстве желаемых генов в автохтонных сортах и диких родственниках. Исследование как можно более широкого природного генетического разнообразия, в том числе существующих в виде естественных популяций, дает информацию не только о наличии целевых донорских генов, но также о генетически расходящихся генотипах, ботанических сортах, подвидах, видах и даже родах, которые можно использовать в качестве потенциальных родителей при скрещивании для реализации оптимального генетического полиморфизма, необходимого для картирования и селекции. Генетическая дивергенция оценивается с использованием стратегий, основанных на фенотипах, с использованием морфологических маркеров, стратегиях, основанных на генотипах, с использованием молекулярных маркеров; используемые статистические процедуры; их полезность для оценки генетической дивергенции между генотипами,

автохтонными сортами, видами и родами; а также о влиянии родословных и географического положения на степень генетического разнообразия.

Проблема изучения и оценки фенотипической изменчивости и необходимость синтеза генетического и фенотипического анализа популяций являются одной из наиболее актуальных в популяционной биологии, что показано в исследованиях Ф. Айала, Ю.П. Алтухова [1]. Благодаря работам Н.В. Тимофеева-Ресовского и его сотрудников формируется синтетический подход к определению популяции как эколого-генетической системы, популяцией является совокупность генотипов одного вида в пределах одного фитоценоза [5]. С точки зрения генетики, популяция – это генетическая система, обладающая исторически сложившейся генетической структурой и популяция представляет собой множество форм, объединенных достаточно высокой степенью родства.

Основываясь на всех этих фундаментальных областях науки, развивалась и частная генетика, селекция культуры винограда, и большой вклад внесли А.М. Негруль, П.Я. Голодрига, их ученики и сподвижники. В статье приводятся результаты исследований во Всероссийском национальном научно-исследовательском институте виноградарства и виноделия «Магарах» от изучения естественных эколого-генетических популяций дикорастущего лесного винограда Крыма в совокупности с использованием гибридологического анализа для изучения экспериментальных гибридных популяций и молекулярно-генетических методов в формировании концептуальных подходов в развитии современной генетики и селекции винограда.

Объект и методы исследования

С целью развития эколого-популяционной и популяционной генетики винограда изучены популяции дикорастущего винограда Крыма естественной эволюции и гибридные популяции от экспериментально полученных в результате гибридизации. Естественные популяции дикорастущего лесного винограда выявлялись в различных зонах Крыма: различные ареалы Южного берега Крыма, Восточный Крым, Западно-Приморский и Горный Крым, что предполагало провести анализ именно эколого-популяционной изменчивости. Анализировались 160 форм дикого лесного винограда Крыма, которые были идентифицированы как истинно относящиеся к подвиду *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*, поскольку растения были идентифицированы как двудомные растения отдельно с функционально мужским или функционально женским типами цветка и которые подразделились в отношении 3 к 1.

Сравнительное изучение форм дикого лесного винограда проводили по комплексу 30 морфобиологических признаков (рис. 1). Изучаемые сорта винограда идентифицировались по морфобиологическим признакам по комплексу признаков, которые ранее были определены как таксономически значимые [2].

Для проведения молекулярно-генетических исследований гибридных популяций использовались популяции F1, полученные по схеме скрещивания «семенной x бессемянный», Подарок Запорожью x Алenuшка (10 шт.).

Выделение ДНК из молодых листьев винограда осуществляли методом выделения нуклеиновых кислот на основе ЦТАБ (2 % cetyltrimethylammonium bromide) [8]. Количество и чистоту выделенной ДНК определяли на спектрофотометре BioPhotometer plus (Eppendorf, США). Значения коэффициентов, характеризующих чистоту ДНК, составили для $A_{260}/A_{280} > 1,6$, $A_{260}/A_{230} > 1,4$, что является достаточным для проведения фрагментного анализа. Для генотипирования сортов использовали стандартный набор из 9 ядерных (nSSR) локусов: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62 и VrZAG79 [9]. Для

выявления генотипа бессемянности (локуса Seed Development Inhibitor, SDI) совместно использовались маркеры MAS p3_vVAGL11 и VMC7F2 [6].

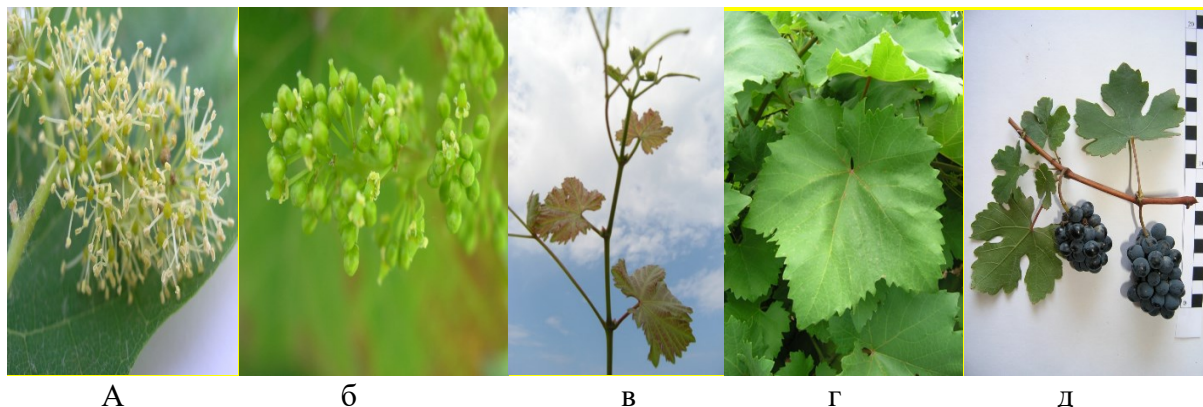


Рис. 1 Морфобиологические признаки описания форм дикорастущего винограда: а) функционально мужской тип цветка; б) функционально женский тип цветка; в) молодой лист (коронка); г) взрослый лист; д) гроздь и ягода *Vitis vinifera* L. ssp. *silvestris* Vill. Крыма

Мультиплексную ПЦР проводили на амплификаторе T100 (BIO-RAD, США) при следующих условиях: 1) денатурация при 95 °C – 5 мин.; 2) 35 циклов: при 95 °C – 30 с (денатурация); 58 °C – 30 с (отжиг); 72 °C – 45 с (элонгация) 3) при 72 °C – 15 мин. (окончательная элонгация). Каждый прямой праймер SSR-локуса был помечен на 5'-конце флуоресцентной меткой (6-FAM, 6-TAMRA или 5-R6G). Амплификация была проведена в общем реакционном объеме 15 мкл, с использованием 2,5-кратной реакционной смеси (ООО «Синтол»), в реакции вносили 20 нг ДНК.

Разделение продуктов амплификации выполняли методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США). Определение длин аллелей проводили в программном приложении GeneMapper (Version 4.0) с использованием маркера молекулярного веса СД-450 (ООО «Синтол») и GS400HD Rox (Applied Biosystems, США). Стандартизация размеров аллелей была выполнена с применением референсных сортов Каберне Совиньон, Пино черный, Кишмиш белый овальный (Султанина) согласно рекомендациям, VIVC [10].

Результаты и обсуждение

Эколого-популяционный анализ естественных популяций винограда

Культура винограда, как определяют в последнее время *Vitis vinifera* ssp. *vinifera* имеет тесную связь с человеком. Обладая непревзойденным разнообразием сортов, этот источник пищи (столовый виноград и изюм) и сырье для виноделия (технический виноград) стали эмблемой культурной самобытности основных евразийских цивилизаций. Ранние работы утверждали, что *V. vinifera* ssp. *sativa* произошел от своего дикого прародителя *Vitis vinifera* ssp. *silvestris* ~8000 лет назад во времена Неолитной земледельческой революции в Западной Азии. В последние годы это предположение изучалось в различных генетических исследованиях, но важные детали одомашнивания виноградной лозы часто были противоречивыми. Современные исследования доказывают существование центров происхождения и одомашнивания в западном Средиземноморье, на Кавказе и в Центральной Азии и доказывается, что время разделения популяций *V. vinifera* и *V. silvestris* датируется периодом от 15 000 до 400 000 лет назад, что предшествует историческому консенсусу о времени одомашнивания [7].

Нами было проведено изучение морфологических признаков и молекулярно-генетических маркеров форм дикого лесного винограда популяций различных

экологических зон Крыма, которое показало, что все выделенные формы принадлежат к истинному дикому лесному винограду – подвиду *Vitis vinifera* ssp. *silvestris*, которые были дифференцированы на разновидности и при этом в различных экологических зонах выявлены и преобладали различные разновидности. В свою очередь можно предполагать, что различные разновидности являются субпопуляциями единой популяции дикого лесного винограда *Vitis vinifera* ssp. *silvestris* Крыма (рис. 2).

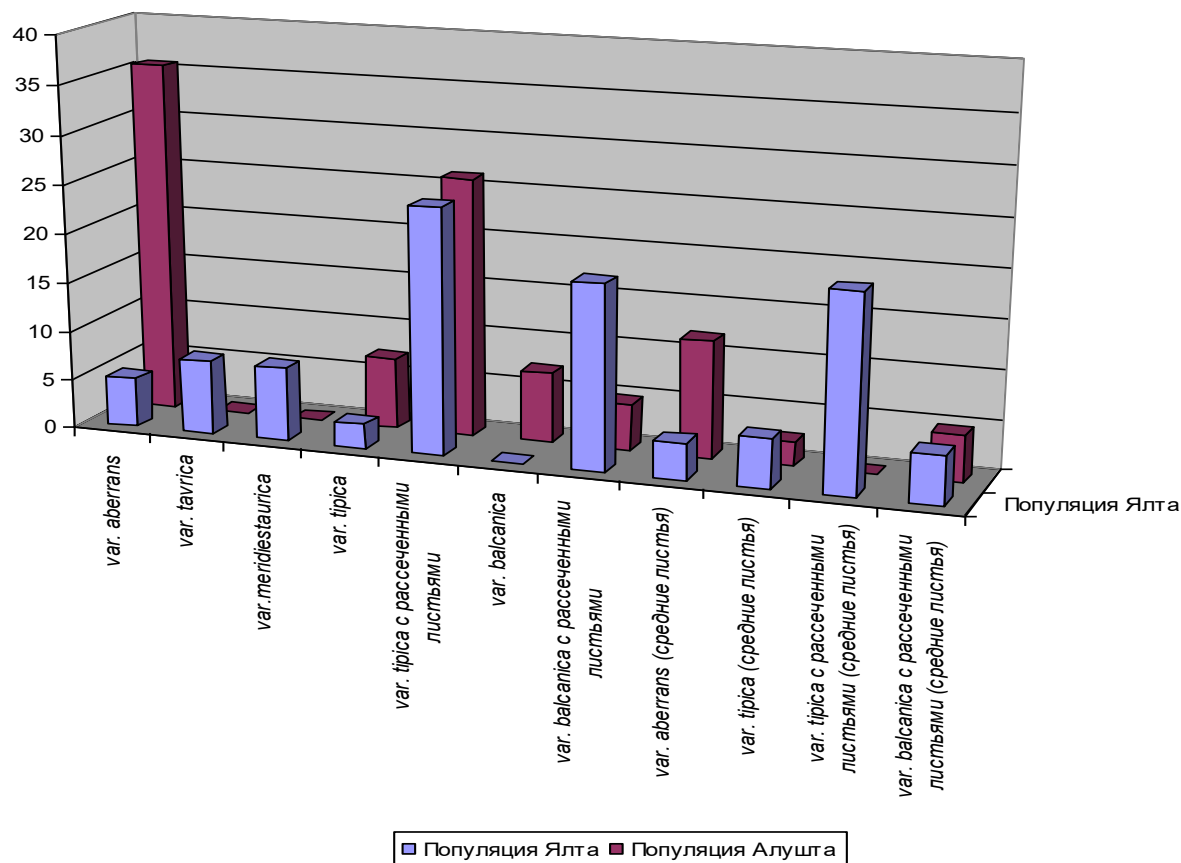


Рис. 2 Распространение субпопуляций дикого лесного винограда Крыма

Необходимо особо отметить, что были обнаружены растения, с выявленными признаками, которые не дифференцировались ни в одну из известных разновидностей дикого лесного винограда, описанных ранее. Это дало основание для выделения дополнительной разновидности *Vitis vinifera* ssp. *silvestris* var. *meridiestaurica* Vol. et Pol., что также может говорить о Крыме, как о возможном субцентре происхождения и первичного одомашивания винограда [2].

Есть основание предполагать, что первичное формирование автохтонных сортов винограда происходило на основе отбора от дикого винограда Крыма. Археологические данные свидетельствуют, что виноград был известен местным племенам горного Крыма еще в X веке до н. э. [2]. С другой стороны, представляет несомненный научный интерес оценить полученные результаты с точки зрения эколого-популяционной генетики, но для более детального ответа на вопросы эволюции и видообразования дикого лесного винограда Крыма как прародителя автохтонных сортов винограда Крыма необходим развернутый углубленный анализ выявленных субпопуляций на молекулярно-генетическом уровне, что может формировать направление дальнейших исследований.

Молекулярно-генетический анализ популяционной изменчивости винограда.

Природное разнообразие рода *Vitis* и, более конкретно, *V. vinifera* важен как на морфологическом, так и на молекулярном уровне. В последние годы много работ было посвящено развитию методов оценки многих показателей: от состава ягод до устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам. *Vitis vinifera* демонстрирует значительные различия в морфологии и представляет собой огромное разнообразие по нескольким признакам, в частности, связанным с качественными особенностями и устойчивостью к стрессам. Аналогичным образом, виды *Vitis* демонстрируют значительную изменчивость в зависимости от среды обитания и большое морфологическое разнообразие.

Генетическое разнообразие на молекулярном уровне, в основном зафиксированное SSR маркеры, а в последнее время и SNP. Гетерозиготность винограда очень высокая, что затрудняет анализ и использование этого разнообразия. Разнообразие важных генов, связанных с агрономическими характеристиками, все еще остается на низком уровне и могут представлять интерес для помощи виноградарскому сообществу чтобы понять функционирование генома винограда и ускорить создание новых сортов, толерантных или устойчивых к болезням, адаптированных к меняющейся среде и оптимального качества.

Исходные дикие виды, из которых была одомашнена виноградная лоза, до сих пор можно найти в остаточных популяциях в регионах Евразии с умеренным климатом. Этот вид раздельнополый, имеет мужские и женские растения, тогда как большинство современных сортов являются растениями-гермафродитами. Тем не менее, как и другие виды деревьев, сорта виноградной лозы являются высоко гетерозиготными и требуют вегетативного размножения для сохранения своих фенотипических особенностей. Хотя в последние десятилетия селекция была очень успешной в создании новых сортов столового винограда, сорта винного винограда в Европе не развивались таким же образом. Необходимость привязки к нескольким элитным сортам, признанным во всем мире, а также дополнительные трудности с внедрением оценки качества вина и отбора в селекционных программах привели к тому, что в прошлом столетии на винном рынке появилось очень мало новых выведенных винных сортов.

Прогрессу в селекции винограда, очевидно, будут способствовать две высококачественные последовательности генома виноградной лозы, которые были недавно опубликованы, и виноградная лоза была четвертым из первых цветковых растений и первой плодоносящей многолетней культурой, геном которой был полностью секвенирован.

Для изучения возможности использования в селекционных программах, а также для выявления генетических связей с культурными сортами, проводится планомерное изучение генетического полиморфизма популяций дикорастущего винограда ЮБК и горного Крыма с помощью генотипирования с использованием стандартного набора из 9 SSR-маркеров. В таблице 1 для сравнения представлены генотипы дикорастущих форм и аборигенных сортов Крыма.

При генотипировании в популяциях дикорастущих форм выявляется заметно большая гомозиготность, обнаруживаются редко встречаемые аллели. В представленных случайным образом отобранных генотипах гомозиготность встречается у дикорастущих форм в 48% маркерах, в аборигенных сортах – в 4%. В генотипах дикорастущих форм выявлены следующие редко встречающиеся аллели (выделены курсив): в маркере VVMD7 – 259 п.н., 263 п.н., в маркере VVMD25 – 267 п.н., 257 п.н., в маркере VVMD28 – 264 п.н.

Таблица 1

**Сравнение генотипов дикорастущих образцов винограда различных популяций
Горного Крыма и ЮБК и аборигенных сортов Крыма**

Наименование сорта, формы	Наименование и аллели SSR-маркеров																	
	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD25		VVMD27		VVMD28		VVMD32		ViZAG62		ViZAG79	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
Генотипы дикорастущих образцов винограда популяций Горного Крыма и ЮБК																		
№1 Алимова балка, с.Башта- новка Бахч.р.	133	133	230	230	263	263	249	267	182	190	236	252	240	258	194	196	247	259
№2 Алимова балка, с.Башта- новка Бахч. р.	155	155	230	230	259	263	267	267	188	190	236	264	240	272	194	194	251	251
№3 г.Алушта ЮБК	133	133	230	234	239	263	257	257	190	190	228	228	250	250	188	202	247	251
Генотипы аборигенных сортов Крыма																		
Шабаш	131	143	238	240	239	253	249	255	180	186	258	278	252	272	188	204	251	257
Кефесия	137	143	240	240	239	253	241	255	180	186	236	258	250	252	200	204	249	251
Джеват Кара	143	145	230	238	239	249	241	255	180	184	236	258	262	272	192	204	249	251

Отмечается, что у групп генотипов дикорастущих форм и аборигенных сортов Крыма генетическое родство значительно ближе внутри данных групп чем между группами. Для выявления однородности и подтверждения родительских форм в гибридных популяциях проведено генотипирование по стандартному набору из 9 ядерных SSR-маркеров популяции F1, полученной по схеме скрещивания «семенной х бессемянный» Подарок Запорожью х Аленушка. Результаты генотипирования представлены в таблице 2. По полученным генетическим профилям можно утверждать, что все гибридные формы данной популяции являются потомками одних родителей (сисбы), за исключением гибрида 32-11-5-3.

Также была прогенотипирована предполагаемая бессемянная родительская форма – сорт Аленушка (Черный палец), профиль которой представлен в таблице 3. По результатам генотипирования было подтверждено, что сорт Аленушка является родительской формой изучаемой популяции, поскольку в генотипах всех гибридных форм прослеживается наследование аллелей по кодоминантному принципу. Предполагаемый профиль второго родителя, вычлененный из совокупности профилей потомков и профиля сорта Аленушка отсутствует в базе генотипов международного каталога сортов VIVC.

В результате применения наиболее эффективных маркеров MAS p3_VvAGL11 и VMC7F2 были выявлены все бессемянные генотипы гибридных форм популяции Подарок Запорожью х Аленушка. Размер аллеля, сцепленного с фенотипом бессемянности, для этих маркеров составляет 198 п.н. Применение маркеров MAS в данной селекционной программе позволяет сократить площади посадки, трудо- и энергозатраты в 2 раза. Результаты генотипирования по маркерам MAS представлены в таблице 3 [3].

Таблица 2

Генотипы гибридов популяции скрещивания «семенной х бессемянный»

♀ Подарок Запорожью х Аленушка ♂

Адрес гибрида	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD25		VVMD27		VVMD28		VVMD32		VrZAG62		VrZAG79	
32-11-5-1	135	141	234	238	243	253	255	255	195	195	218	244	272	272	188	188	249	257
32-11-5-2	135	155	234	238	243	249	245	249	195	195	244	258	272	272	188	188	249	251
32-11-5-3	135	149	228	240	239	249	249	255	184	195	254	258	240	272	186	188	247	257
32-11-5-4	135	135	234	238	243	253	249	255	195	195	218	244	250	272	186	188	249	257
32-11-5-5	135	155	234	238	243	253	245	249	186	195	244	258	272	272	186	188	249	257
32-11-5-6	141	155	236	240	253	253	245	255	186	195	244	258	272	272	186	188	249	251
36-11-5-7	135	135	234	240	243	249	249	255	195	195	244	258	250	272	188	188	249	257
32-11-5-8	135	155	236	238	243	249	245	249	186	195	244	258	272	272	188	188	249	257
32-11-5-9	141	155	234	238	243	253	245	255	186	195	244	258	272	272	188	188	249	257
32-11-5-10	135	155	236	238	253	253	245	249	195	195	218	244	272	272	188	188	249	257
Аленушка (Черный палец)	135	155	234	236	249	253	245	255	195	195	218	258	250	272	188	188	251	257
Подарок Запорожью (предполагается)	135	141	238	240	243	253	249	255	186	195	244	244	272	272	186	188	249	249

Таблица 3

Генотипы популяции Подарок Запорожью х Аленушка, полученные в результате применения маркеров MAS по бессемянности

№ п/п	Адрес гибрида на селекционном участке	p3_VvAGL11		VMC7F2	
		A1	A2	A1	A2
1	32-11-5-1	188	198	198	200
2	32-11-5-2	176	184	206	210
3	32-11-5-3	184	188	200	210
4	32-11-5-4	176	188	200	206
5	32-11-5-5	176	188	200	206
6	32-11-5-6	176	184	206	210
7	36-11-5-7	184	198	198	210
8	32-11-5-8	184	198	198	210
9	32-11-5-9	184	198	198	210
10	32-11-5-10	176	188	200	206

Из выделенных бессемянных форм по урожаю 2023 г. на основании фенотипических признаков: категория бессемянности, размер ягод, урожайность и дегустационная оценка была выделена в элиту бессемянная форма М № 32-11-5-1 среднего срока созревания под рабочим названием Партенитский. Данная формы обладает относительно большой величиной ягод для бессемянных сортов (17,29 мм х

13,88 мм) при высокой категории бессемянности (I-II категории). Генетический профиль форма М № 32-11-5-1 представлен в таблице 3 (подчеркнут) [4].

Выводы

Результаты изучения популяций дикорастущего винограда Крыма с точки зрения эколого-популяционной генетики позволяют отметить, что в различных экологических зонах Крыма преобладают различные группы дикорастущего винограда, но это требует дальнейшего более детального изучения.

Исследование генотипов дикорастущих форм винограда Крыма молекулярно-генетическими методами дает возможность привлечь их для дальнейшего использования в качестве доноров хозяйственно-ценных признаков устойчивости к абиотическим факторам.

Применение маркер ассоциированной селекции по бессемянности позволяет полностью исключить семенные гибридные формы винограда из опытных популяций и соответственно сократить занимаемые площади и трудо- и энергозатраты в 2 раза на период от 3-4 лет и более.

Использование в селекционных программах SSR-маркеров, обладающих кодоминантным типом наследования, позволяет подтверждать сортовую принадлежность родительских форм и устанавливать происхождения гибридных форм, что повышает эффективность селекции винограда.

Список литературы

1. Ветрова В.П., Экарт А.К., Кравченко А.Н., Ларионова А.Я. Взаимосвязь аллозимного и фенотипического разнообразия популяций ели аянской (*Picea ajanensis*) // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 19(5). – С.581-588. DOI: 10.18699/VJ15.075
2. Волынкин В.А., Полулях А.А., Котоловец З.В. Современная трактовка систематики диких форм и аборигенных сортов винограда по признакам ампелографии// Интерактивная ампелография и селекция винограда. – Краснодар: КубГАУ. – С. 31-42.
3. Лиховской В.В., Зленко В.А., Хватков П.А., Малетич Г.К., Спотарь Г.Ю., Луцкай Е.А., Клименко В.П. Биотехнологические и молекулярно-генетические методы в селекции винограда. Садоводство и виноградарство. – 2022. – Т. 6. – С. 5-15. DOI: 10.31676/0235-2591-2022-6-5-15.
4. Лиховской В.В., Спотарь Г.Ю., Студенникова Н.Л., Котоловец З.В., Рыбаченко Н.А., Гончаренко В.А. Новая бессемянная форма винограда Партенитский // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2023. – Т. 25(4). – С. 341-348. DOI: 10.34919/IM.2023.11.40.003
5. Тимофеев-Ресовский Н.В., Яблоков А.В., Глотов Н.В. Очерк учения о популяции. – Москва: Наука, 1973. – 277 с.
6. Cabezas J., Cervera M., Ruiz-Garcia L, Carreno J, Martinez-Zapater J. A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine. Genome. – 2006. – Vol. 49(12). – 1572-1585.
7. Dong et al. Dual domestications and origin of traits in grapevine evolution. Science. – 2023. – Vol. 379. – С. 892-901
8. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant molecular biology. – 1985. – Vol. 5(2). – P. 69-76.
9. This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangl G.S., Eisenheld C., Ferreira-Monteiro F., Grando S., Ibáñez J., Lacombe T., Laucou V., Magalhães R., Meredith C. P., Milani N., Peterlunger E., Regner F., Zulini L., Maul E.

Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivar. Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – Vol. 109(7) – P. 1448-1458.

10. Vitis International Variety Catalogue VIVC. Julius KuhnInstitut. – [Electronic resource]. – URL: <https://www.vivc.de/>

Статья поступила в редакцию 07.07.2024 г.

Likhovskoi V.V., Volynkin V.A., Polulyakh A.A., Studennikova N.L., Spotar G.Yu. Conceptual development of grapevine genetics and breeding // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2024. – № 152. – P. 57-65

Scientific knowledge on grapevine genetics and breeding is developed on the basis of general laws of plant genetics, which are implemented in culture breeding. In relation to a certain grapevine culture, specific genetics and corresponding breeding patterns are generated. This article presents study results of the forms of wild-growing forest grapes in Crimea to be analyzed as ecological-genetic population of a certain habitat. Generation of conceptual development of grapevine genetics and breeding is carried out taking into account the research analysis at the molecular-genetic level from populations of wild-growing grapes to specific selectable traits, which is reflected in this publication as a result of grapevine culture research at the Institute Magarach.

Key words: *grapes; genetics; breeding; populations; molecular-genetic methods*