

## Первичная сборка и филогенетический анализ пластов *Vitis sylvestris* Gmel. Майкопской популяции

Савенкова Д.С.<sup>1✉</sup>, Елисютикова А.В.<sup>1</sup>, Милованов А.В.<sup>1</sup>, Хачумов В.А.<sup>2</sup>, Астапчук И.Л.<sup>1</sup>, Трошин Л.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, Россия, 350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13

<sup>2</sup>Академия биологии и биотехнологии имени Д.И. Ивановского, Южный федеральный университет, Россия, 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

✉dasha\_19.99s@mail.ru

**Аннотация.** Получение знаний о строении генома винограда является актуальным вопросом современной ампелографии, так как позволяет изучить внутривидовое генетическое разнообразие и эволюцию видов *Vitis*. Целью исследования является изучение особенностей строения хлоропластных геномов 6 образцов Майкопской популяции дикого лесного винограда *Vitis sylvestris* Gmel., собранных в результате экспедиционных обследований окрестностей г. Майкопа Республики Адыгея. Для этого были выделены хлоропласты из отобранных образцов листьев на базе Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета. Из образцов хлоропластов выделили тотальную ДНК. Были подготовлены библиотеки ДНК при помощи DNA Preparation (M) Tagmentation Kit. Секвенирование осуществляли на базе Кубанского государственного аграрного университета им. И.Т. Трубилина на приборе Illumina MiSeq. Сборку геномов проводили при помощи UGENE, аннотацию – при помощи веб-сервиса Chlorobox. Идентифицировали таксономическую принадлежность хлоропластных геномов при помощи NCBI BLAST. В результате работы, изученные образцы были отнесены к дикорастущему виду *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*. Были построены карты строения хлоропластного генома изученных образцов. Самое большое совпадение (100 % по покрытию и идентичности) с референсным геномом *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* INRA:8500Mtp140 (номер GenBank LC501387.1) наблюдалось у образца М6, а наименьшее – у образца М5 (99 % и 99,95 %). Это дает возможность отнести изученные образцы к виду *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*.

**Ключевые слова:** виноград; геном; хлоропласт; секвенирование; *Vitis sylvestris* Gmel.

**Для цитирования:** Савенкова Д.С., Елисютикова А.В., Милованов А.В., Хачумов В.А., Астапчук И.Л., Трошин Л.П. Первичная сборка и филогенетический анализ пластов *Vitis sylvestris* Gmel. Майкопской популяции // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2023;25(3):232-238. DOI 10.34919/IM.2023.25.3.002.

ORIGINAL RESEARCH

## Primary assembly and phylogenetic analysis of *Vitis sylvestris* Gmel. chloroplast genomes from the Maikop population

Savenkova D.S.<sup>1✉</sup>, Elisyutikova A.V.<sup>1</sup>, Milovanov A.V.<sup>1</sup>, Khachumov V.A.<sup>2</sup>, Astapchuk I.L.<sup>1</sup>, Troshin L.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin, 13 Kalinina str., 350044 Krasnodar, Russia

<sup>2</sup>Academy of Biology and Biotechnology named after D.I. Ivanovskiy, Southern Federal University, 194/1 Stachki ave., 344090 Rostov-on-Don, Russia

✉dasha\_19.99s@mail.ru

**Abstract.** Gaining knowledge about the structure of grape genome is a topical issue of modern ampelography, as it allows studying the intraspecific genetic diversity and evolution of *Vitis* species. The aim of the research is to study structural features of chloroplast genomes of 6 samples from the Maikop population of wild forest grapevines *Vitis sylvestris* Gmel., collected during expeditionary surveys in the Republic of Adygea. For this purpose, chloroplasts from leaf samples were isolated on the basis of the Academy of Biology and Biotechnology named after D.I. Ivanovskiy of the Southern Federal University. Total DNA was isolated from chloroplast samples. Genomic libraries were prepared using DNA Preparation (M) Tagmentation Kit. Sequencing was carried out on the basis of the Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin using the scientific instrument Illumina MiSeq. Genomes were assembled using UGENE, and annotated using Chlorobox web service. The taxonomic affiliation of chloroplast genomes was identified using NCBI BLAST. As a work result, the studied samples were assigned to the wild-growing species *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*. Maps of structure of the chloroplast genome of studied samples were constructed. The highest coincidence (100 % in coverage and identity) with the reference genome of *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* - INRA:8500Mtp140 (GenBank number LC501387.1) was observed in the sample M6, and the lowest was observed in the sample M5 (99 % and 99.95 %). This offers an opportunity to relate these samples to genus *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*.

**Key words:** grapes; genome; chloroplast; sequencing; *Vitis sylvestris* Gmel.

**For citation:** Savenkova D.S., Elisyutikova A.V., Milovanov A.V., Khachumov V.A., Astapchuk I.L., Troshin L.P. Primary assembly and phylogenetic analysis of *Vitis sylvestris* Gmel. chloroplast genomes from the Maikop population. Magarach. Viticulture and Winemaking. 2023;25(3):232-238. DOI 10.34919/IM.2023.25.3.002 (in Russian).

### Введение

Виноградные (лат. *Vitaceae*) – экономически важное семейство двудольных растений. Несмотря на большое биологическое разнообразие, из этого се-

мейства в хозяйственной деятельности используется только один вид – *Vitis vinifera* L. Он подразделяется на такие подвиды, как виноград культурный *Vitis vinifera* L. subsp. *sativa* (DC.) Hegi и виноград дикорастущий *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* (Gmel.) Hegi. Большинство исследователей и селекционеров придерживаются

гипотезы, что культурный виноград произошел от дикорастущего предка [1–3]. В процессе доместикации этого ценного растения отбирались генотипы с более крупными и сладкими ягодами, что приводило и к отбору гермафродитных форм, упрощавших возделывание [4]. На сегодняшний день нет подтвержденных данных о существовании культурной формы винограда в естественных популяциях. Считается, что преобладание обоеполюх цветков – это основной признак, который отличает дикий виноград от культурного [5].

Как известно, дикие родичи культурных растений являются источниками уникальной генетической изменчивости. В настоящее время селекционеры в своей работе используют информацию о геноме экономически значимых культур. Установлено, что большинство признаков имеют полигенный характер, то есть контролируются комплексом генов. Предполагается, что дикорастущие популяции винограда представлены смесью диких и культурных форм, а также спонтанных гибридов между ними [7–9]. В последние десятилетия появился интерес к изучению полных последовательностей хлоропластных геномов для разрешения филогенетических отношений между покрытосеменными растениями [10]. Так, например, в результате секвенирования хлоропластного генома винограда Arroyo-García и др. (2002) установили, что геном имеет длину 160928 п.н. включая пару инвертированных повторов, а порядок и структура генов идентичны таковым во многих других растительных геномах [11]. Внутривидовой полиморфизм был исследован с помощью микросателлитных маркеров без применения технологий высокопроизводительного секвенирования. В результате для культурного и дикого винограда были идентифицированы хлоротипы (хлоропластные гаплотипы), специфичные для конкретных географических регионов [3].

В результате работы консорциума Grape Genome Program (<https://www6.inra.fr/igpp>) была секвенирована полная последовательность генома культурного винограда сорта Пино Нуар (PN4002) [12–13].

По результатам морфологического описания и генотипирования была создана база данных о локусных состояниях гермплазмы, сохраненной в Российской ампелографической коллекции при АЗОСВиВ (Анапская зональная опытная станция виноградарства и виноделия) [13]. Помимо этого, проводится работа по изучению генетического материала аборигенных сортов винограда иными маркерными системами (ISSR, iPBS) [14], также впервые установлены последовательности ДНК редкого лесного винограда *Vitis sylvestris* Gmel. [15–17].

Современный культурный виноград является потомком дикорастущих форм, отобранных человеком. Соответственно он должен сохранять некоторые генетические особенности, свойственные популяциям предков. Сравнение генотипов современных сортов с генотипами из дикорастущих популяций, а также изучение хлоропластных геномов могут показать, какие именно дикорастущие популяции использо-

вались в прошлом для доместикации. Дикие родичи видов сельскохозяйственных культур имеют большое значение для селекционеров в качестве уникальных источников генетической изменчивости для использования в селекционных целях. Таким образом, расшифровка генома винограда является актуальным вопросом современности, так как позволяет изучить внутривидовое генетическое разнообразие и эволюцию видов *Vitis* в целом.

**Цель исследования** – провести анализ особенностей строения хлоропластных геномов 6 образцов дикого лесного винограда *Vitis sylvestris* Gmel. Майкопской популяции.

#### **Материалы и методы исследования**

В результате проведенных экспедиционных обследований окрестностей г. Майкопа Республики Адыгея, в 2022 г. были собраны образцы листьев дикого лесного винограда, которым присвоены шифры: М1, М2, М3, М4, М5, М6 (М – Майкоп).

Выделение хлоропластов из образцов виноградных листьев и хлоропластной ДНК производили на базе Южного федерального университета в г. Ростова-Дону усовершенствованным методом [18]. Качество и количество выделенной ДНК определили при помощи флуориметра Qubit («ThermoFisher», Германия).

Для определения полной нуклеотидной последовательности хлоропластных геномов винограда были подготовлены библиотеки ДНК при помощи DNA Preparation (M) Tagmentation Kit («Illumina Inc», США). Концентрация библиотек была оценена также при помощи флуориметра Qubit. Секвенирование осуществляли на базе Кубанского государственного аграрного университета им. И.Т. Трубилина на приборе «Illumina MiSeq» («Illumina Inc», США). Сборку генома *de novo* осуществляли на базе UGENE [19] с использованием алгоритмов SPAdes v.3.15.3 [20]. Качество сборки геномов оценивали с помощью QUAST v.5.0.2 [21]. Идентификацию видовой принадлежности образцов определяли с помощью веб-сервиса NCBI BLAST. Построение дерева правдоподобия осуществляли в программе MEGA 7. Аннотацию геномов проводили при помощи веб-сервиса Chlorobox при сравнении с референсной последовательностью *Vitis sylvestris* NC\_007957.

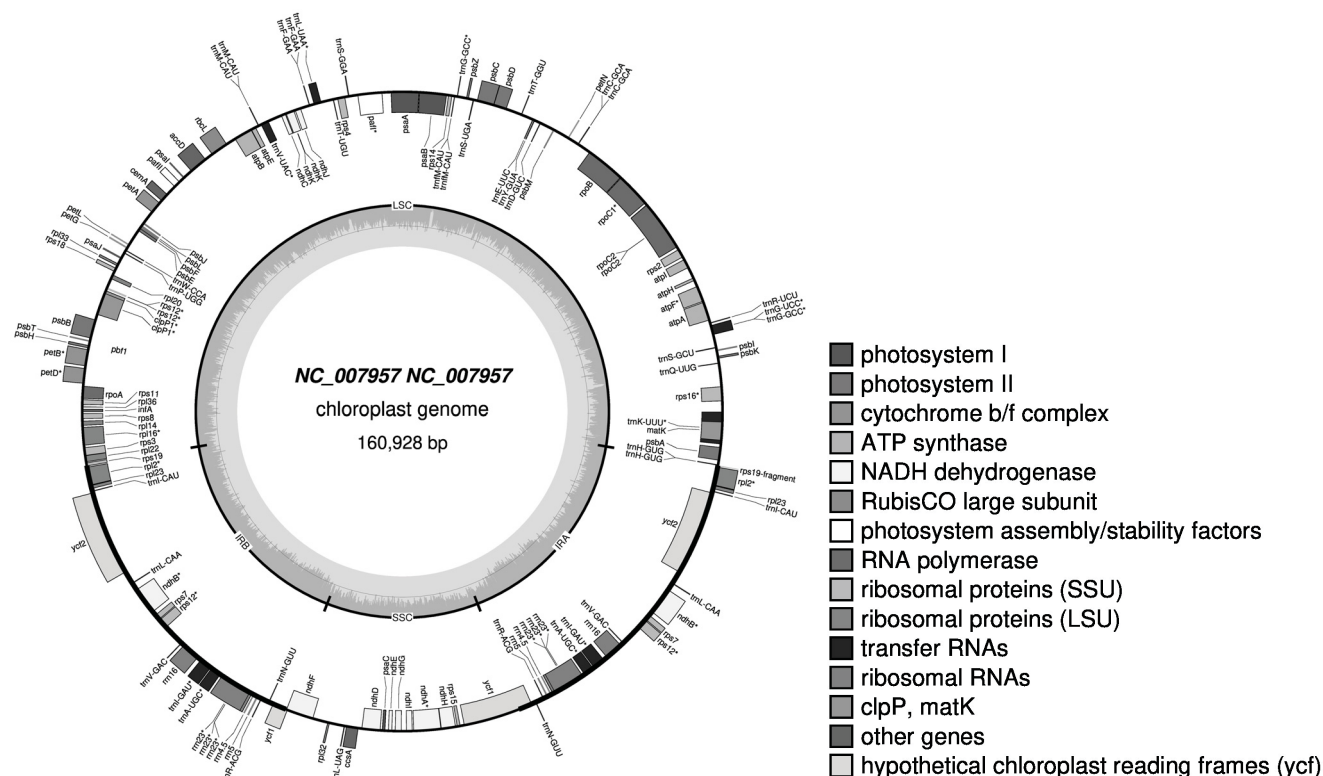
#### **Результаты и их обсуждение**

В результате проведенных исследований была выделена ДНК 6 виноградных пластов-представителей Майкопской популяции. Характеристики хлоропластных геномов, полученные в результате первичной сборки, а также номера в GenBank, под которыми они зарегистрированы, представлены в табл. 1.

Исходя из таблицы, были получены следующие значения. Самое большое количество прочтений наблюдалось у образца М1 (230739), в то время как самый низкий показатель был у образца М2 (101655). При этом размер генома у всех образцов примерно в одинаковом диапазоне: самый большой размер генома наблюдался у М6 (160920), самый низкий – у М5

**Таблица 1.** Результаты секвенирования хлоропластной ДНК образцов винограда Майкопской популяции  
**Table 1.** The results of chloroplast DNA sequencing of grape samples from the Maikop population

| Характеристика       | Образец     |             |             |             |             |             |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                      | M1          | M2          | M3          | M4          | M5          | M6          |
| № в GenBank (SRA)    | SRR23815019 | SRR23815018 | SRR23815010 | SRR23815009 | SRR23815008 | SRR23815007 |
| Число прочтений      | 230739      | 101655      | 207832      | 193148      | 113393      | 211657      |
| Размер генома        | 160928      | 160928      | 160927      | 160928      | 160416      | 160920      |
| Содержание G + C (%) | 37          | 37          | 39          | 39          | 41          | 37          |
| Покрытие генома      | 215.0x      | 94.8x       | 193.7x      | 180.0x      | 105.7x      | 197.3x      |



**Рис. 1.** Генетическая карта хлоропластного генома образца M1 Майкопской популяции. Толстыми линиями обозначены инвертированные повторы (IRa и IRb), разделяющие геном на малые (SSC) и большие (LSC) однокопийные области. Гены на внешней стороне карты транскрибируются по часовой стрелке, гены на внутренней стороне карты транскрибируются против часовой стрелки

**Fig. 1.** Genetic map of chloroplast genome of sample M1 from the Maikop population. Thick lines indicate the number of inverted repeats (IRa and IRb) that divide the genome into small (SSC) and large (LSC) single-copy areas. Genes on the outer side of the map are transcribed clockwise, genes on the inner side of the map are transcribed counterclockwise

(160416). Содержание G + C (%) составляет большее значение у образца M5 (41), одинаковое у образцов M1, M2, M6 (37), у M3 и M4 (39). Покрытие генома у полученных прочтений достигло высоких значений. Самое большое значение наблюдалось у образца M1 – 215,0x, самое маленькое – у образца M2 – 94,8x.

Визуализация геномов изученных образцов позволила обнаружить 189 аннотированных кодирующих и некодирующих последовательностей, которые отвечают за фотосинтез, строение мембран, а также представляют иные особенности строения пластомов (рис. 1).

С помощью BLAST определена видовая при-

надлежность каждого из изученных образцов. В результате было определено, что все исследуемые образцы относятся к виду *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* (табл. 2). Генетические последовательности 6-ти образцов были депонированы в базу данных NCBI под номерами SAMN33577491, SAMN33577492, SAMN33577493, SAMN33577494, SAMN33577495, SAMN33577496.

Был проведен сравнительный анализ референсных геномов в базе NCBI с изучаемыми образцами, в результате которого установили 100 % схожесть образцов M1, M2, M3, M4, M6 с видом *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*.

Помимо генома номер GenBank LC501387.1, проценты покрытия и идентичности совпали с последовательностью *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* Teulere pied sauvage chloroplast DNA (LC495478.1), *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* INRA:8500Mtp25 chloroplast DNA (LC508115.1), *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* INRA:8500Mtp49 chloroplast DNA (MZ569032.1) и *Vitis vinifera* x *Vitis labrusca* cultivar Hongshuangwei chloroplast (LC507100.1).

Образцы М1, М2, М4, М5 показали наибольшее совпадение с последовательностями *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* INRA:8500Mtp140, образец М3 с *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* INRA:8500Mtp232 (рис. 2).

Образец М5 показал наибольшее совпадение с последовательностями *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* INRA:8500Mtp140 chloroplast DNA (LC501387.1), *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* Teulere pied sauvage chloroplast DNA (LC495478.1), *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* INRA:8500Mtp25 chloroplast DNA (LC508115.1) и *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* INRA:8500Mtp49 chloroplast DNA (MZ569032.1). Образец М6 показал 100 % совпадение с *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* Teulere pied sauvage chloroplast DNA (LC495478.1), *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* INRA:8500Mtp25 chloroplast DNA (LC508115.1) и с *Vitis vinifera* x *Vitis labrusca* cultivar Hongshuangwei chloroplast (LC507100.1).

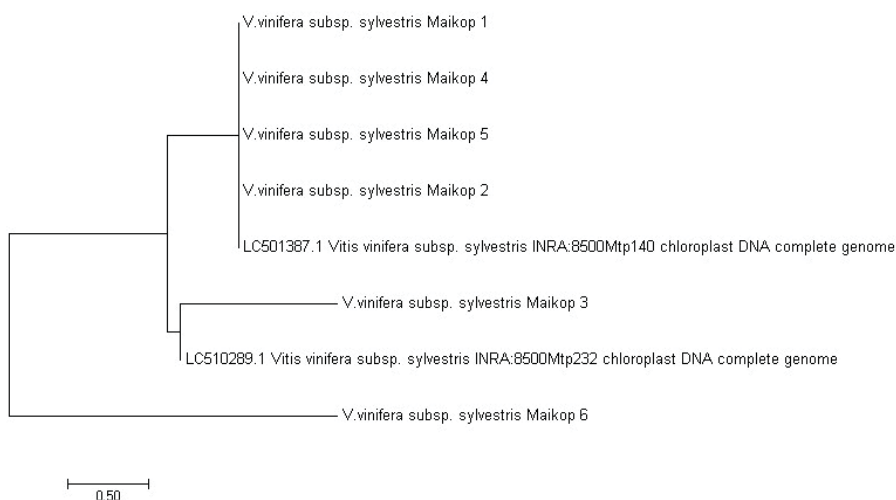
Исследование хлоропластных геномов в настоящее время является одним из основных источников информации о филогении и эволюции растений. Так филогения, основанная на последовательностях ДНК из полных последовательностей генома хлоропластов, убедительно подтверждает позицию *Vitaceae* как самой ранней расходящейся линии Rosids [10]. Изучение различных типов хлоропластной ДНК у *Vitis vinifera* subsp. *sativa* и *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* выявило приуроченность к определенным географическим регионам, что может прояснить вопрос о количестве событий доместикиции [3–4]. Полная последовательность генома хлоропластов *Vitis* также предоставляет ценные данные для использования в генной инженерии хлоропластов, например, для создания устойчивости к болезням, вредителям, а также гербицидам и абиотическим стрессам [23–29].

**Таблица 2.** Результаты сравнительного анализа образцов винограда Майкопской популяции с референсными геномами

**Table 2.** The comparative analysis results of grape samples from the Maikop population with reference genomes

| Образец | Референсный геном*   | Номер образца в GenBank | Покрытие** | Идентичность*** |
|---------|--|-------------------------|------------|-----------------|
| M1      | <i>Vitis vinifera</i> subsp. <i>sylvestris</i> INRA:8500Mtp140 chloroplast DNA   | SAMN33577491            | 99 %       | 100,00 %        |
| M2      | <i>Vitis vinifera</i> subsp. <i>sylvestris</i> INRA:8500Mtp140 chloroplast DNA   | SAMN33577492            | 99 %       | 100,00 %        |
| M3      | <i>Vitis vinifera</i> subsp. <i>sylvestris</i> INRA:8500Mtp140 chloroplast DNA   | SAMN33577493            | 99 %       | 100,00 %        |
| M4      | <i>Vitis vinifera</i> subsp. <i>sylvestris</i> INRA:8500Mtp140 chloroplast DNA   | SAMN33577494            | 99 %       | 100,00 %        |
| M5      | <i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis labrusca</i> cultivar Hongshuangwei chloroplast | SAMN33577495            | 99 %       | 99,95 %         |
| M6      | <i>Vitis vinifera</i> subsp. <i>sylvestris</i> INRA:8500Mtp140 chloroplast DNA   | SAMN33577496            | 100 %      | 100,00 %        |

Примечания: Референсный геном\* – последовательность из базы данных NCBI, на которую выравнивание исследуемых образцов прошло с большим процентом совпадения; Покрытие\*\* – значение, которое показывает, насколько исследуемые геномы совпадают по длине с референсными; Идентичность\*\*\* – то, насколько исследуемые геномы совпадают по нуклеотидному составу.



**Рис. 2.** Дерево максимального правдоподобия. Образцы указаны в дереве по инвентарному номеру коллекции.

**Fig. 2.** Maximum likelihood tree. The samples are listed in the tree by the inventory number in the Collection.

### Выводы

Таким образом, в результате экспедиционного обследования было отобрано 6 образцов листьев дикорастущего винограда Майкопской популяции. Проведены секвенирование, сборка, аннотация и сравнительный анализ хлоропластных геномов этих образцов. ДНК последовательности были депонированы в базу данных NCBI GenBank в виде архивов прочтений. Все изученные пластымы винограда отнесены к дикорастущему виду *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* на основании выравнивания в BLAST NCBI, равно как и база данных автоматически определила видо-

вую принадлежность архивов прочтений. Наибольшее совпадение (100 % по покрытию и идентичности) с референсным геномом *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* INRA:8500Mtp140 (номер GenBank LC501387.1) наблюдалось у образца М6, наименьшее – у образца М5 (99 % и 99,95 %). Данные образцы представляют интерес для селекции, работа с ними будет продолжена.

#### Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых ученых кандидатов наук № МК-2070.2022.5.

#### Financing source

The work was supported by the grant of the Russian Federation President for young candidates of sciences No. МК-2070.2022.5.

#### Конфликт интересов

Не заявлен.

#### Conflict of interests

Not declared.

#### Список литературы

- Ocete R., Lopez M.A., Gallardo A., Arnold C. Comparative analysis of wild and cultivated grapevine (*Vitis vinifera*) in the Basque Region of Spain and France. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 2008;123(1-3):95-98. DOI 10.1016/j.agee.2007.05.009.
- Arnold C., Schnitzler A., Parisot C., Maurin A. Historical reconstruction of a relictual population of wild grapevines (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*, Gmelin, Hegi) in a floodplain forest of the upper Seine valley, France. *River Research and Applications*. 2010;26(7):904-914. DOI 10.1002/rra.1312.
- Григорьева Е.А., Агаханов М.М., Александрова И.В., Волков В.А. Полногеномное секвенирование культурных и дикорастущих форм винограда (*Vitis vinifera* L.) // Письма в Вавилонский журнал генетики и селекции. 2019;5(1):13-18. DOI 10.18699/Letters2019-5-2.
- Arroyo-García R., Revilla E. The current status of wild grapevine populations (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) in the Mediterranean basin. *The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive*. 2013;51-72. DOI 10.5772/52933.
- Zecca G.A., De Mattia F., Lovicu G., Labra M., Sala F., Grassi F. Wild grapevine: *silvestris*, hybrids or cultivars that escaped from vineyards? Molecular evidence in Sardinia. *Plant Biology*. 2010;12(3):558-562. DOI 10.1111/j.1438-8677.2009.00226.x.
- Авдеев В.И. Генетика пола *Vitis* L. в природе и культуре // Мобилизация адаптационного потенциала садовых растений в динамичных условиях внешней среды: Международная научно-практическая конференция. М.: Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства. 2004;490-495.
- Lacombe T., Laucou V., Di Vecchi M., Bordenave L., Bourse T., Siret R., David J., Boursiquot J.M., Bronner A., Merdinoglu D., This P. Inventory and characterization of *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* in France. *Acta Horticulturae*. 2003;603:553-557. DOI 10.17660/ActaHortic.2003.603.73.
- Laguna Lumberras E. Sobre las formas naturalizadas de "*Vitis vinifera* L." en la Comunidad Valenciana, I. Especies. *Flora Montiberica*. 2003;23:46-82.
- This P., Lacombe T., Thomas M.R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*. 2006;22(9):511-519. DOI 10.1016/j.tig.2006.07.008.
- Jansen R.K., Kaitanis C., Saski C., Lee S.B., Tomkins J., Alverson A.J., Daniell H. Phylogenetic analyses of *Vitis* (*Vitaceae*) based on complete chloroplast genome sequences: effects of taxon sampling and phylogenetic methods on resolving relationships among rosids. *BMC Evolutionary Biology*. 2006;6(1):32 DOI 10.1186/1471-2148-6-32.
- Arroyo-García R., Lefort F., Andrés M.T.D., Ibáñez J., Borrego J., Jouve N., Cabello F., Martínez-Zapater J.M. Chloroplast microsatellite polymorphisms in *Vitis* species. *Genome*. 2002;45(6):1142-1149. DOI 10.1139/g02-087.
- Jaillon O., Aury J.M., Noel B., Policriti A., Clepet C., Casagrande A., Choisne N., Aubourg S., Vitulo N., Jubin C., Vezzi A. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*. 2007;449(7161):463-467. DOI 10.1038/nature06148.
- Лукьянов А.А., Большаков В.А., Ильницкая Е.Т. Создание базы данных и ДНК-паспортизация сортов Анапской ампелографической коллекции // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2018;51(3):49-58. DOI 10.30679/2219-5335-2018-3-51-49-58.
- Тёпфер Р., Мауль Э., Милованов А.В. Изучение генетического разнообразия генофонда винограда Северного Кавказа // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2016;119:1337-1355.
- Милованов А.В., Трошин Л.П., Елисютикова А.В., Попкова Е.С. Анализ генетического материала некоторых аборигенных сортов винограда Российской ампелографической коллекции // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2022;94:268-276. DOI 10.21515/1999-1703-94-268-276.
- Милованов А.В., Елисютикова А.В., Савенкова Д.С. Использование IPBS-маркеров для изучения генетического разнообразия аборигенных сортов винограда // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2022;95:204-212. DOI 10.21515/1999-1703-95-204-212.
- Милованов А.В., Савенкова Д.С., Елисютикова А.В. Оценка генетического разнообразия трех популяций дикорастущего винограда Краснодарского края и Республики Адыгея // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2022;181:295-315. DOI 10.21515/1990-4665-181-025.
- Triboush S., Danilenko N., Davydenko O. A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower. *Plant Molecular Biology Reporter* 1998;16(2):183. DOI 10.1023/A:1007487806583.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166-1167. DOI 10.1093/bioinformatics/bts091.
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*. 2012;19(5):455-477. DOI 10.1089/cmb.2012.0021.
- Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072-1075. DOI 10.1093/bioinformatics/btt086.
- DeCosa B., Moar W., Lee S.B., Miller M., Daniell H. Overexpression of the Bt Cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotechnology*. 2001;9:71-74. DOI 10.1038/83559.
- DeGray G., Rajasekaran K., Smith F., Sanford J., Daniell H. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiology*. 2001;127:852-862.

24. McBride K.E., Svab Z., Schaaf D.J., Hogan P.S., Stalker D.M., Maliga P. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *BioTechnology*. 1995;13(8):362-365. DOI 10.1038/nbt0495-362.
25. Kota M., Daniel H., Varma S., Garczynski S.F., Gould F., William M.J. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(5):1840-1845. DOI 10.1073/pnas.96.5.1840.
26. Daniell H., Datta R., Varma S., Gray S., Lee S.B. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnology*. 1998;16:345-348. DOI 10.1038/nbt0498-345.
27. Iamtham S., Day A. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nature Biotechnology*. 2000;18:1172-1176. DOI 10.1038/81161.
28. Lee S.B., Kwon H.B., Kwon S.J., Park S.C., Jeong M.J., Han S.E., Daniell H. Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. *Molecular Breeding*. 2003;11:1-13. DOI 10.1023/A:1022100404542.
29. Kumar S., Dhingra A., Daniell H. Plastid expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol*. 2004;136:2843-2854. DOI 10.1104/pp.104.045187.

## References

1. Ocete R., Lopez M.A., Gallardo A., Arnold C. Comparative analysis of wild and cultivated grapevine (*Vitis vinifera*) in the Basque Region of Spain and France. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 2008;123(1-3):95-98. DOI 10.1016/j.agee.2007.05.009.
2. Arnold C., Schnitzler A., Parisot C., Maurin A. Historical reconstruction of a relictual population of wild grapevines (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*, Gmelin, Hegi) in a floodplain forest of the upper Seine valley, France. *River Research and Applications*. 2010;26(7):904-914. DOI 10.1002/rra.1312.
3. Grigorieva E.A., Agakhanov M.M., Alexandrova I.V., Volkov V.A. Whole genome sequencing of cultivated and wild forms of grapes (*Vitis vinifera* L.). *Letters to the Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;5(1):13-18. DOI 10.18699/Letters2019-5-2 (in Russian).
4. Arroyo-García R., Revilla E. The current status of wild grapevine populations (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) in the Mediterranean basin. *The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive*. 2013;51-72. DOI 10.5772/52933.
5. Zecca G.A., De Mattia F., Lovicu G., Labra M., Sala F., Grassi F. Wild grapevine: *silvestris*, hybrids or cultivars that escaped from vineyards? Molecular evidence in Sardinia. *Plant Biology*. 2010;12(3):558-562. DOI 10.1111/j.1438-8677.2009.00226.x.
6. Avdeev V.I. Sex genetics of *Vitis* L. in nature and culture. Mobilization of the adaptive potential of garden plants in dynamic environmental conditions: Materials of the International Scientific-Practical Conference. M.: RAAS. 2004;490-495 (in Russian).
7. Lacombe T., Laucou V., Di Vecchi M., Bordenave L., Bourse T., Siret R., David J., Boursiquot J.M., Bronner A., Merdinoglu D., This P. Inventory and characterization of *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* in France. *Acta Horticulturae*. 2003;603:553-557. DOI 10.17660/ActaHortic.2003.603.73.
8. Laguna Lumbreras E. Sobre las formas naturalizadas de "*Vitis vinifera* L." en la Comunidad Valenciana, I. Especies. *Flora Montiberica*. 2003;23:46-82.
9. This P., Lacombe T., Thomas M.R. Historical origins

- and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*. 2006;22(9):511-519. DOI 10.1016/j.tig.2006.07.008.
10. Jansen R.K., Kaittanis C., Sasaki C., Lee S.B., Tomkins J., Alverson A.J., Daniell H. Phylogenetic analyses of *Vitis* (Vitaceae) based on complete chloroplast genome sequences: effects of taxon sampling and phylogenetic methods on resolving relationships among rosids. *BMC Evolutionary Biology*. 2006;6(1):32 DOI 10.1186/1471-2148-6-32.
11. Arroyo-García R., Lefort F., Andrés M.T.D., Ibáñez J., Borrego J., Jouve N., Cabello F., Martínez-Zapater J.M. Chloroplast microsatellite polymorphisms in *Vitis* species. *Genome*. 2002;45(6):1142-1149. DOI 10.1139/g02-087.
12. Jaillon O., Aury J.M., Noel B., Policriti A., Clepet C., Casagrande A., Choisne N., Aubourg S., Vitulo N., Jubin C., Vezzi A. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*. 2007;449(7161):463-467. DOI 10.1038/nature06148.
13. Lukyanov A.A., Bolshakov V.A., Ilnitskaya E.T. Creation of database and DNA-certification of varieties of Anapa Ampelographic Collection. *Fruit growing and viticulture of South Russia*. 2018;51(3):49-58. DOI 10.30679/2219-5335-2018-3-51-49-58 (in Russian).
14. Tepfer R., Maul E., Milovanov A.V. Study of the genetic diversity of grape gene pool of the North Caucasus. *Polythematic Online Scientific Journal of Kuban State Agrarian University*. 2016;119:1337-1355 (in Russian).
15. Milovanov A.V., Troshin L.P., Elisyutikova A.V., Popkova E.S. Analysis of the genetic material of some native grape varieties of the Russian ampelographic collection. *Works of the Kuban State Agrarian University*. 2022;94:268-276. DOI 10.21515/1999-1703-94-268-276 (in Russian).
16. Milovanov A.V., Elisyutikova A.V., Savenkova D.S. Using IPBS markers to study the genetic diversity of native grape varieties. *Works of the Kuban State Agrarian University*. 2022;95:204-212. DOI 10.21515/1999-1703-95-204-212 (in Russian).
17. Milovanov A.V., Savenkova D.S., Elisyutikova A.V. Assessment of the genetic diversity of three wild grapevine populations of the Krasnodar region and the Republic of Adygea. *Polythematic Online Scientific Journal of Kuban State Agrarian University*. 2022;181:295-315. DOI 10.21515/1990-4665-181-025 (in Russian).
18. Triboush S., Danilenko N., Davydenko O. A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower. *Plant Molecular Biology Reporter* 1998;16(2):183. DOI 10.1023/A:1007487806583.
19. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166-1167. DOI 10.1093/bioinformatics/bts091.
20. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*. 2012;19(5):455-477. DOI 10.1089/cmb.2012.0021.
21. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072-1075. DOI 10.1093/bioinformatics/btt086.
22. DeCosa B., Moar W., Lee S.B., Miller M., Daniell H. Overexpression of the Bt Cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotechnology*. 2001;9:71-74. DOI 10.1038/83559.
23. DeGray G., Rajasekaran K., Smith F., Sanford J., Daniell H. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast

- genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiology*. 2001;127:852-862.
24. McBride K.E., Svab Z., Schaaf D.J., Hogan P.S., Stalker D.M., Maliga P. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *BioTechnology*. 1995;13(8):362-365. DOI 10.1038/nbt0495-362.
25. Kota M., Daniel H., Varma S., Garczynski S.F., Gould F., William M.J. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(5):1840-1845. DOI 10.1073/pnas.96.5.1840.
26. Daniell H., Datta R., Varma S., Gray S., Lee S.B. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnology*. 1998;16:345-348. DOI 10.1038/nbt0498-345.
27. Iamtham S., Day A. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nature Biotechnology*. 2000;18:1172-1176. DOI 10.1038/81161.
28. Lee S.B., Kwon H.B., Kwon S.J., Park S.C., Jeong M.J., Han S.E., Daniell H. Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. *Molecular Breeding*. 2003;11:1-13. DOI 10.1023/A:1022100404542.
29. Kumar S., Dhingra A., Daniell H. Plastid expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol*. 2004;136:2843-2854. DOI 10.1104/pp.104.045187.

### Информация об авторах

**Дарья Сергеевна Савенкова**, магистрант; e-мэйл: [dasha\\_19.99s@mail.ru](mailto:dasha_19.99s@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0002-6785-4380>;

**Анастасия Васильевна Елисютикова**, студент; e-мэйл: [nas-elisyutikova@yandex.ru](mailto:nas-elisyutikova@yandex.ru); <https://orcid.org/0009-0008-8941-1506>;

**Александр Валериевич Милованов**, канд. биол. наук, науч. сотр.; e-мэйл: [milovanov1991@mail.ru](mailto:milovanov1991@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0002-6312-1147>;

**Владимир Артурович Хачумов**, канд. биол. наук, мл. науч. сотр.; e-мэйл: [vladimirkhachumov@yandex.ru](mailto:vladimirkhachumov@yandex.ru); <https://orcid.org/0000-0002-0144-8822>;

**Ирина Леонидовна Астапчук**, канд. биол. наук, науч. сотр.; e-мэйл: [irina\\_astapchuk@mail.ru](mailto:irina_astapchuk@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0002-9713-0383>;

**Леонид Петрович Трошин**, профессор, д-р биол. наук, профессор кафедры виноградарства; e-мэйл: [lptroshin@mail.ru](mailto:lptroshin@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0003-1232-2077>.

### Information about authors

**Darya S. Savenkova**, undergraduate; e-mail: [dasha\\_19.99s@mail.ru](mailto:dasha_19.99s@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0002-6785-4380>;

**Anastasia V. Elisyutikova**, student; e-mail: [nas-elisyutikova@yandex.ru](mailto:nas-elisyutikova@yandex.ru); <https://orcid.org/0009-0008-8941-1506>;

**Alexander V. Milovanov**, Cand. Biol. Sci., Staff Scientist; e-mail: [milovanov1991@mail.ru](mailto:milovanov1991@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0002-6312-1147>;

**Vladimir A. Khachumov**, Cand. Biol. Sci., Junior Staff Scientist; e-mail: [vladimirkhachumov@yandex.ru](mailto:vladimirkhachumov@yandex.ru); <https://orcid.org/0000-0002-0144-8822>;

**Irina L. Astapchuk**, Cand. Biol. Sci., Staff Scientist; e-mail: [irina\\_astapchuk@mail.ru](mailto:irina_astapchuk@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0002-9713-0383>;

**Leonid P. Troshin**, Professor, Dr. Biol. Sci., Professor of the Viticulture Department; e-mail: [lptroshin@mail.ru](mailto:lptroshin@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0003-1232-2077>.

Статья поступила в редакцию 17.05.2023, одобрена после рецензии 21.06.2023, принята к публикации 21.08.2023.