

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный
исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени
Н.И. Вавилова» (ВИР)

На правах рукописи

Агаханов Магамедгусейн Магамедганифович

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

научно-квалификационной работы (диссертации)

Исследование генетического потенциала продуктивности, качества и устойчивости к
грибным болезням генофонда винограда в коллекции ВИР для создания новых
комплексно-устойчивых сортов

Направление: 35.06.01 – Сельское хозяйство

Специальность: 06.01.05 «Селекция и семеноводство сельскохозяйственных
растений»

Санкт-Петербург, 2021г.

Работа выполнена в ЦКП лаборатория оздоровления генофонда растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»

Научный руководитель – Ухатова Юлия Васильевна,

кандидат биологических наук, заместитель директора
института по научно-организационной работе, заведующий
ЦКП лаборатория оздоровления генофонда растений

Рецензенты:

Анисимова Ирина Николаевна

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
отдела генетики Федерального государственного
бюджетного научного учреждения «Федеральный
исследовательский центр Всероссийский институт
генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова».

Новикова Любовь Юрьевна

доктор сельскохозяйственных наук, ведущий научный
сотрудник отдела автоматизированных информационных
систем генетических ресурсов растений Федерального
государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр Всероссийский
институт генетических ресурсов растений
имени Н.И. Вавилова».

Введение

Актуальность темы. Виноград является одной из главных возделываемых и экономически важных сельскохозяйственных культур.

Народнохозяйственное значение развития виноградарства на государственном уровне очень велико и занимает существенное место в экономике различных стран мира. В южных регионах России виноград является одной из главных возделываемых культур. Основные площади виноградников сосредоточены в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах.

Получение большого и качественного урожая напрямую зависит от фитосанитарного состояния насаждения. Известно, что виноград поражают различные фитопатогены такие как грибы, бактерии, вирусы. Среди грибных болезней наиболее опасными считаются: оидиум, серая гниль, фомопсис, милдью, антракноз.

Милдью (*Plasmopara viticola* Berl. Et Toni.) является основной болезнью, которая приводит к большим убыткам. В самом начале милдью была обнаружена на американских дикорастущих лозах. Из грибных болезней второе место по вредоносности занимает оидиум (*Uncinula necator* Burill.). Этот патоген также американского происхождения, и впервые был обнаружен в 1845 г. в оранжерее Лондона. Оидиум поражает все части лозы. Вначале на листьях появляются небольшие светлые пятна, затем они сливаются с крупными пятнами и могут покрыть весь лист пепельным налетом, в следствии чего этого лист скручивается и опадает.

Количество вирусов, поражающих виноград, больше, чем вирусов-патогенов других многолетних растений (Bouamama-Gzara et al., 2017). Более 70 видов вирусов, принадлежащих к 17 семействам и 27 родам, было обнаружено на винограде (Xiao H. et al., 2018). Симптоматика может проявляться по-разному: угнетение роста и развития растения, хлороз, некроз, образования складок, борозд и углублений на древесине, утолщения в месте прививки, появление пятен, штрихи и кольца, скручивание листьев, изменение их окраски (пожелтение или покраснение) и др. Все эти изменения приводят к сокращению продолжительности эксплуатации виноградника и снижению качества ягод. Например, только в результате поражения скручиванием листьев урожай уменьшается в среднем на 15-20%, но может достигать 40% (Martelli 2014).

Научный подход особенно важен на базовой стадии развития виноградарства – выведении высокопродуктивных, устойчивых к болезням сортов винограда и получении очищенного (от вирусных и других заболеваний) посадочного материала. Выведение сортов винограда, имеющих необходимые потребительские и другие важные для отрасли качества – задача генетики и селекции.

Обычно селекция имеет своей целью создать сорта культурных растений, которые превышали бы по урожайности и качеству лучшие местные стандарты или соответствовали новым требованиям, предъявляемым производством. Для получения устойчивых форм используют методы гибридизации внутривидовые так и межвидовые.

Актуальность данной работы состоит в том, что в результате углубленного изучения ампелографической коллекции винограда создается научно-исследовательский ресурс для картирования и идентификации генов хозяйственно-ценных признаков культурного винограда в виде двух картирующих популяций гибридов F1 от скрещивания и самоопыления растений - источников генов устойчивости, выявленных в коллекции ВИР; в проведении геномных исследований, направленных на создание результатов полногеномного секвенирования *Vitis rotundifolia* Michx., позволяющего выявлять в геномах отдаленных гибридов винограда фрагменты хромосом, интрогрессированные от иммунного к грибным заболеваниям *V. rotundifolia* Michx; а также в последующих апробации и усовершенствовании методов длительного хранения изученных образцов винограда в контролируемых условиях среды.

Новизна исследования: Впервые на Северо-Кавказской зоне изучено большое сортовое и гибридное разнообразие по биологическим признакам, включая хозяйственно-ценные признаки. На жестком фоне эпифитотии впервые из коллекции ВИР выявлен источник генов устойчивости к грибным заболеваниям; впервые при изучении ампелографической коллекции винограда ВИР созданы две картирующие популяции гибридов F1 от скрещивания и самоопыления растений - источников генов устойчивости, выявленных в коллекции ВИР; впервые проведено полногеномное секвенирование образца *Vitis rotundifolia* Michx. с использованием нанопорового секвенатора MinION (Oxford Nanopore Technologies), что позволит селекционерам впоследствии выявлять в геномах отдаленных гибридов винограда фрагменты хромосом, интрогрессированные от иммунного к грибным заболеваниям *V. rotundifolia* Michx. Предложен первый вариант сборки генома *Vitis rotundifolia* с использованием секвенирования третьего поколения.

Цель диссертационного исследования - анализ генетического потенциала коллекции генетических ресурсов винограда ВИР для последующего использования идентифицированного генофонда в селекции.

Для реализации этой цели поставлен ряд **задач**:

- 1) анализ генетического разнообразия коллекций Дагестанского и Крымского филиалов ВИР по результатам генотипирования с использованием молекулярных маркеров.

- 2) фенотипирование коллекций по основным хозяйственно-ценным признакам;
- 3) выявление источников хозяйственно-ценных признаков;
- 4) проведение скрещиваний с участием выявленных источников для получения расщепляющихся популяций и создания инструмента для картирования генов, контролируемых ценные признаки;
- 5) проведение полногеномного секвенирования генома иммунного вида *Vitis rotundifolia* с использованием нанопорового секвенатора MinION (Oxford Nanopore Technologies);
- 6) усовершенствование методов длительного хранения образцов коллекции в культуре *in vitro*

Положения, выносимые на защиту:

- Генетическое разнообразие ампелографической коллекций ВИР;
- Хозяйственно-ценные признаки винограда;
- Полногеномные исследования вида *Vitis rotundifolia* с использованием нанопорового секвенатора MinION (Oxford Nanopore Technologies).

Апробация результатов.

Основные результаты диссертационной работы представлены в виде постерных и устных докладов на профильных научных мероприятиях:

1. VII СЪЕЗД ВАВИЛОВСКОГО ОБЩЕСТВА ГЕНЕТИКОВ И СЕЛЕКЦИОНЕРОВ, ПОСВЯЩЕННЫЙ 100-ЛЕТИЮ КАФЕДРЫ ГЕНЕТИКИ СПБГУ, И АССОЦИИРОВАННЫЕ СИМПОЗИУМЫ Санкт-Петербург, 18–22 июня 2019 года

2. МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ "125 ЛЕТ ПРИКЛАДНОЙ БОТАНИКИ В РОССИИ" Санкт-Петербург, 25–28 ноября 2019 года

3. PLANT GENETICS, GENOMICS, BIOINFORMATICS, AND BIOTECHNOLOGY (PLANTGEN2019) Novosibirsk, 24–29 июня 2019 года

4. БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ, ЖИВОТНОВОДСТВЕ И СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ Москва, 15–16 апреля 2019 года

5. СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОИНФОРМАТИКА Ялта, Севастополь, 14–20 сентября 2020 года

6. Международная научно-практическая конференция «Магарач». Наука и практика 2020», посвященная 100-летию П.Я. Голодриги, 26–30 октября 2020 г.

1. Место, условия, материал и методика исследований

1.1 Место проведения исследований

Научно-исследовательская работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР), на Дагестанской опытной станции – филиале ВИР (ДОС ВИР) и Крымской опытно-селекционной станции – филиале ВИР (КрОСС ВИР).

1.2 Материалы и методы исследований

1.2.1. Материал исследований.

Исходным материалом для исследований послужила выборка из 72 образцов винограда ампелографической коллекции Дагестанской опытной станции ВИР (ДОС ВИР) и образец североамериканского вида *V. rotundifolia* единственный сорт Дикси (Dixie), поддерживаемый живом виде на Крымской опытно-селекционной станции ВИР (Крымск, Краснодарский край). Список изученного материала представлен в приложении 1. Изученные образцы были любезно предоставлены куратором ампелографической коллекции к.б.н. Крымской ОСС ВИР В. А. Носульчаком и специалистом Дагестанской ОС ВИР Н.К. Казаровым. Подробное описание материала каждой части исследования приведено в соответствующем разделе главы «результаты».

1.2.2. Методы исследований.

Исследование проводили методами полевых и лабораторных опытов.

Полевые опыты были проведены в соответствии общепринятыми методиками виноградарства М.А. Лазаревского (1963), П.И. Недова (1985), А.Г. Амирджанова (1986). Статистическая обработка данных проведена по Б. А. Доспехову (1985) с использованием пакета прикладных программ MS Excel, Statistica 12, SPSS.

В работе проводили скрещивание выделенного источника устойчивости к грибным заболеваниям для получения гибридов.

В качестве лабораторных методов использованы генотипирование, секвенирование, а также методы биотехнологии (микроразмножение).

1.2.2.1. Фенологические исследования.

Фенологические наблюдения были проведены в 2018-2020 годах. При анализе материала в течение вегетационного периода проводили фенологические наблюдения и оценка устойчивости по хозяйственно-ценным признакам. В процессе фенологических

исследований отмечались следующие фазы: начало сока движения, начало распускания почек, начало цветения, массовое цветение, конец цветения, начало созревания ягод, полная зрелость ягод, сила роста, серая гниль, милдью, оидиум. Данные в настоящий момент обрабатываются.

1.2.2.2. Генотипирование

Новые возможности для сортовой идентификации и организации работы с коллекциями генетических ресурсов винограда появились с развитием технологий молекулярного маркирования и ДНК-секвенирования (Troggio et al., 2007). Первый шаг по внедрению ДНК-маркеров в практику сортовой идентификации был сделан в 2010 году, когда Международным союзом по охране новых сортов растений (UPOV) было разработано руководство по ДНК-профилированию сортов «Подбор молекулярных маркеров и создание баз данных» (Guidelines for DNA-Profiling..., 2010). Геном *V. vinifera* содержит множество микросателлитных локусов, в высшей степени полиморфных (Dokupilová et al., 2013). Исследованиями (Thomas et al. 1993a) было показано, что в геноме винограда преобладают микросателлитные локусы, содержащие дву- и трех-нуклеотидные повторы (GT)_n, (GA)_n, (CAC)_n, (GACA)_n, (GATA)_n. При этом установлено, что повторы GA и GT наиболее многочисленны и распространены по всему геному. Важным обстоятельством является тот факт, что последовательности геномной ДНК, фланкирующие микросателлитные повторы, являются довольно консервативными, позволяя использовать праймеры, разработанные для *V. vinifera*, также и для анализа других видов *Vitis*.

В геноме *V. vinifera* L. содержится огромное количество полиморфные микросателлитные локусы, аллельное разнообразие которых может использоваться для выявления генетической структуры зародышевой плазмы винограда коллекции хранятся *ex situ*, а также для обнаружения дублеты и сортовая идентификация (Dokupilová et al., 2013). В таблице 1 представлены образцы участвовавших в изучение генетической разнообразие. Мы в нашем исследовании использовали 72 сортов винограда из ампелографической коллекции Дагестанской опытной станции ВИР (ДОСВИР), который был основан в 1975 году и в настоящее время поддерживает 320 культурных сортов винограда и 25 дикорастущих экотипов.

В этом исследовании генетическое разнообразие коллекции зародышевой плазмы винограда было изучено путем анализа полиморфизма восьми микросателлитные локусы, которые были ранее рекомендованы с целью сортовой идентификации.

Таблица 1. Список источников, участвовавших в изучение генетической разнообразии

Источник	Число
Западно-европейская группа сортов	27
Группа сортов бассейна черного моря	13
Староместные Дагестанские сорта	21
Европейско-азиатские гибриды	3
Внутри-видовые гибриды	2
Смешанно-комплексно устойчивые гибриды	5
Межвидовые гибриды	1

Для коллекции *ex situ* генетическая оценка разнообразия образцов важна, поскольку пока только традиционные методы, основанные на морфологической оценке признаков использовались для распознавания сортов винограда. В этом исследовании генетическое разнообразие коллекции зародышевой плазмы винограда было изучено путем анализа полиморфизма восьми микросателлитных локусов, которые были ранее рекомендованы с целью сортовой идентификации.

Задача исследования состояла в том, чтобы оценить уровень полиморфизма восьми микросателлитных локусов, ранее рекомендованных для целей сортовой идентификации у винограда, и включало ряд последовательных этапов: подбор полиморфных праймеров, выделение и оценка качества ДНК, постановка ПЦР, постановка электрофореза на агарозном геле, анализ размеров амплифицированных фрагментов. В качестве материала был использован образцы из ампелографической коллекции филиала Дагестанской опытной станции ВИР.

Основными этапами генотипирования были выделение ДНК, постановка и проведение ПЦР, электрофорез, анализ полученных фрагментов.

Этап 1. Выделение ДНК

ДНК выделялась из свежих листьев модифицированным СТАВ-методом с добавлением 2-меркаптоэтанола (Rahimah et al., 2006).

Навеску 0,16 г листьев, замороженных в жидком азоте, гомогенизировали с использованием вибрационной мельницы (Retsch MM 400, Германия) в стерильных центрифужных пробирках объемом 2 мл (Axugen, США). После измельчения к гомогенату добавляли 800 мкл СТАВ буфера (2% СТАВ w/v, 20 мМ EDTA, pH 8,0, 1,4 М NaCl, 100 мМ трис-HCl, pH 8,0, 5 мМ аскорбиновой кислоты, 4 мМ диэтилдитиокарбаминовой

кислоты и 2% поливинилпирролидон-40) и 3,2 мкл 2-меркаптоэтанола. Смесь перемешивали и инкубировали в течении 30 мин в твердотельном термостате (Термит ДНК-технологии, Россия) при 60°C. После инкубации к смеси добавляли 800 мкл хлороформ-изоамиловой смеси (24 : 1), перемешивали на вортексе (Biosan, Латвия) и центрифугировали в течении 15 мин при температуре 20°C и 10000 об/мин. После центрифугирования верхнюю водную фазу переносили в стерильные пробирки объемом 2 мл. ДНК осаждалась из водной фазы добавлением 200 мкл ледяного изопропанола. Затем, пробирки охлаждались при -20°C в морозильной камере в течении 1 ч и центрифугировались при 4°C и 12000 об/мин в течении 15 мин. Полученный осадок ДНК промывали в 200 мкл промывочного буфера (76% этанола, 10 мМ ацетата аммония). Осадок высушивали от остатков спирта и промывочного буфера и растворяли в 160 мкл ТЕ буфера – 10 мМ трис-НСl (рН 8,0) и 1 мМ ЭДТА (рН 8,0). В раствор ДНК добавляли 0,2 мкл РНКазы (10 мг/мл) и инкубировали при комнатной температуре в течении 20 мин. Далее, в раствор добавляли 80 мкл 7,5М ацетата аммония (рН 7,7) и охлаждали на льду в течении 20 мин. Смесь центрифугировали в течении 15 мин при 12000 об/мин и 4°C. После центрифугирования супернатант переносили в стерильные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и ДНК повторно осаждалась добавлением 600 мкл этанола. Раствор охлаждали в морозильной камере 1 ч при -20°C, центрифугировали при 12000 об/мин и 4°C в течении 15 мин. Супернатант удаляли, осадок промывали в 400 мкл 70% этанола. Осадок высушивали от остатков спирта и растворяли в 60 мкл ТЕ буфера. Полученная ДНК оценивалась на нано-спектрофотометре Implen N60 (Германия). Качество проверяли электрофорезом в 1% -ном агарозном геле.

Этап 2. Постановка ПЦР

Для амплификации микросателлитных локусов использовали восемь микросателлитных локусов: SCU 15VV, VVS 2, VVMD27, VVMD31, VVIN54, VVIP 31, SCU 11 VV, VVIB 01 (таблица 2), с флуоресцентными метками на 5' концах прямых праймеров. Для каждой пары праймеров подбирался термальный режим с учетом их нуклеотидного состава рекомендацией разработчиков и была подобрана программы при помощи SyberGreen, представлен в таблице 3. Полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700 (США).

Для проведения ПЦР использовали стандартную для всех использовавшихся праймеров реакцию смесь (общим объемом – 25 мкл), содержащей 2 мкл ДНК, 1 мкл 2,5мМ dNTP, 2,5 мкл 10X реакционного буфера содержанием 50мМ MgCl₂, по 0,5 мкл

прямого и обратного праймера в концентрации 10 пМ, 0,5мклTaq полимеразы (5 е.а./мкл), 18мкл ddH₂O (Диалат Лтд).

Таблица 2. Лocusы использованные для генетического разнообразия винограда

Локус	Прямой	Обратный	Мотив	Размер аллелей	Расположение locus (на хромосоме)	Ссылки
1	2	3	4	6	7	8
SCU 10VV	TACCCCAACA ACCSTTTTTC CC	TTCTCCGCCAC CTCSTTTTCAC	(CAA) _n	198 - 235	18	Scot et al., (2000)
SCU 11VV	AATTGATAGT GCCACGTTCT CGCC	AACGCCGACA AGAATCCCAA GG	(CTT) _n	239 - 274	19	Scot et al., (2000)
SCU 15VV	GCCTATGTGC CAGACCAAAA AC	TTGGAAGTAGC CAGCCCAACCT TC	(CAA) _n	174 - 194	14	Scot et al., (2000)
VVS 2	CAGCCCGTAA ATGTATCCAT C	AAATTCAAAAT TCTAATTCAAC TGG	(CT) _n	129 - 155	11	Thomas et al.,(1993)
VVS 3	CAGCCCGTAA ATGTATCCAT C	AAATTCAAAAT TCTAATTCAAC TGG	(GA) _n	190 - 448	2	Thomas et al., (1993)
VVM D 5	CTAGAGCTAC GCCAATCCAA	TATACCAAAA ATCATATTCCT AAA	(CT) _n AT(CT) _n ATAG(AT) _n	239 - 279	16	Bowers et al. (1996)
VVM D 6	ATCTCTAACC CTAAAACCAT	CTGTGCTAAGA CGAAGAAGA	(CT) _n C(CT) _n TTAG(C T)TAAT(CT) _n C(CT) _n C(CT) _n	180 - 199	7	Bowers et al. (1996)
VVM D 27	GTACCAGATC TGAATACATC CGTAAGT	ACGGGTATAG AGCAAACGGT GT	(CT) _n	173 - 194	5	Bowers et al. (1999a)
VVM D 31	CAGTGTTTTT CTTAAAGTTT CAAGG	CTCTGTGAAAG AGGAAGAGAC GC		196 - 224	7	Bowers et al. (1999b)
VVIH 54	CCGCACTTGT GTTGAATTTT AG	CAAACCGTTTT TACACCAGCA G	(GA) _n	139 - 177	13	Merdinoglu et al. (2005)
VVIP 31	TATCCAAGAG ACAAATTTCC AC	TTCTCTTGTTT CCTGCAAATGG	(GA) _n	173 - 196	19	Merdinoglu et al. (2005)

VVIB 01	TGACCCTCGA CCTTAAAATC TT	TGGTGAGTGCA ATGATAGTAG A	(CT) _n	294 - 312	2	Merdinog lu et al. (2005)
VVIV 67	TATAACTTCT CATAGGGTTT CC	TTGGAGTCCAT CAAATTCATCT	(CA) _n AT(CA) _n (GA) _n TT(GA) _n (AG) _n	352 - 383	15	Merdinog lu et al. (2005)
UDV 107	GGAAAAGGA CACAAAAGTA GCAA	CAGAATACCG CCAGTTGGTT	(CT) _n (CA) _n (TA) _n	146 - 171	9	Di Gaspero et al. (2005)

Таблица 3. Протокол амплификации использованных праймеров

Праймер	Программа	
	VVMD 5	Денатурация
VVMD 5	Отжиг праймеров (30 циклов)	95 °C – 1 мин
		48 °C – 1 мин
		72 °C – 30 сек
	Элонгация	72 °C – 7 мин
	Охлаждение	4 °C – ∞
VVMD 6	Денатурация	95 °C – 5 мин
VVMD 6	Отжиг праймеров (30 циклов)	95 °C – 1 мин
		50 °C – 1 мин
		72 °C – 30 сек
	Элонгация	72 °C – 7 мин
	Охлаждение	4 °C – ∞
SCU 10 VV SCU 11 VV SCU 15 VV	Денатурация	94 °C – 1 мин
SCU 10 VV SCU 11 VV SCU 15 VV	Отжиг праймеров (30 циклов)	94 °C – 1 мин
		56 °C – 1 мин
		72 °C – 30 сек
	Элонгация	72 °C – 5 мин
	Охлаждение	4 °C – ∞
VVIV 67	Денатурация	94 °C – 10 мин
VVIV 67	Отжиг праймеров (35 циклов)	92 °C – 45 сек
		57 °C – 1 мин
		72 °C – 1 мин 30 сек
	Элонгация	72 °C – 5 мин
	Охлаждение	4 °C – ∞
VVS 3 VVH 54 UDV 107	Денатурация	95 °C – 5 мин
VVS 3 VVH 54 UDV 107	Отжиг праймеров (30 циклов)	95 °C – 1 мин
		54 °C – 1 мин
		72 °C – 30 сек
	Элонгация	72 °C – 7 мин
	Охлаждение	4 °C – ∞
VVIP 31	Денатурация	95 °C – 5 мин

VVIB 01	Отжиг праймеров (30 циклов)	95 °С – 1 мин 52 °С – 1 мин 72 °С – 30 сек
	Элонгация	72 °С – 7 мин
	Охлаждение	4 °С – ∞
VVS 2	Денатурация	95 °С – 5 мин
	Отжиг праймеров режиме touchdown	94 °С – 50 сек 62–57 °С с понижением температуры отжига на 1 °С за каждый цикл 72 °С – 1 мин (5 циклов) 94 °С – 50 сек 57 °С – 50 сек 72 °С – 1 мин (32 цикла)
	Элонгация	72 °С – 5 мин
	Охлаждение	4 °С – ∞
VVMD 27 VVMD 31	Денатурация	95 °С – 5 мин
	Отжиг праймеров (30 циклов)	95 °С – 1 мин 53 °С – 1 мин 72 °С – 30 сек
	Элонгация	72 °С – 7 мин
	Охлаждение	4 °С – ∞

Этап 3. Проведение электрофореза в агарозном геле

Электрофоретический анализ геномной ДНК, продуктов ПЦР проводили в 1% агарозном геле (Hydra Gene Co.), приготовленном на буфере TAE (40 мМТрис-НСl, рН 8,0; 20 мМ ацетат натрия; 1мМ ЭДТА) с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0.01 мкг/мл. В качестве маркера молекулярного 55 веса ДНК использовали маркер «100 bp» (МЕДИГЕН). Электрофорез вели при напряжении 5-10 В/см в течение 40 минут-3 часов. Изображение геля получали с помощью прибора Molecular Imager GelDoc TM XR+ System (BioRad) с использованием УФ-излучения.

Этап 4 Анализ размеров амплифицированных фрагментов

Анализ размеров амплифицированных фрагментов проводили на генетическом анализаторе НАНОФОР 05 (ИАП РАН, Россия). Продукты амплификации, полученные для каждого растения с праймерами для исследуемых локусов, смешивали и разводили в 100 раз. Детекционная смесь состояла из 1 мкл смеси разведенных продуктов амплификации, 1 мкл размерного стандарта (СД-450, Синтол, Россия) и 9 мкл Ni-Di формамида (Thermo Fisher, США). Смесь денатурировали при 95 °С 5 мин и охлаждали во льду.

Полиморфизм микросателлитных локусов анализировали с помощью программы Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Анализ в Structure 2.3.4 проводился с использованием следующих параметров: burn-in period 100 000, MCMC 600 000, admixture model, вероятное количество кластеров указывалось от 2 до 15.

Для каждого микросателлитного маркера был рассчитан коэффициент информативности (PIC, Polymorphic Information Content) по формуле $PIC = 1 - \sum(P_j)^2$, где P_j это частота встречаемости j -той аллели, суммированная для всех аллелей этого локуса у всех проанализированных генотипов в выборке. Показатели полиморфизма локусов в выборке определяли с использованием программы GenAlEx 6.2 (Peakall, Smouse, 2006).

1.2.2.3. Секвенирование

Одним из уникальных источников генов устойчивости к оидиуму и милдью для селекции винограда является североамериканский вид *V. rotundifolia* Michaux, относящийся к подроду *Muscadinia* Planch. Многие систематики рассматривают *Muscadinia* в качестве самостоятельного рода, соответственно, в литературе распространено альтернативное название вида – *Muscadinia rotundifolia* (Michaux) Small. Этот вид можно считать практически иммунным к возбудителям оидиум и милдью, однако использовать этот ценный источник генов устойчивости для селекции европейских сортов винограда затруднительно.

До настоящего времени в базе данных Sequence Read Archive (SRA) и European Nucleotide Archive (ENA) были представлены результаты четырех проектов по секвенированию полного генома *V. rotundifolia* с использованием платформы Illumina. Они содержат архивы коротких прочтений ДНК этого вида длиной до 150 пн. Более полную информацию о геноме *V. rotundifolia* можно получить путем прочтения протяженных (до сотен тысяч пар нуклеотидов) последовательностей ДНК с использованием секвенаторов «третьего поколения» – Pacific Biosciences' (PacBio) Single Molecule Real-Time (SMRT) и Oxford Nanopore Technologies (ONT) MinION. В отличие от секвенирования коротких (100-300 пн) фрагментов ДНК на платформе Illumina, эти секвенаторы «длинных прочтений» позволяют получить расшифровку фрагмента молекулы ДНК в 100 и более тысяч пар оснований. Кроме того, с появлением таких технологий секвенирования получил широкое распространение так называемый метод «гибридной сборки» полноразмерных геномов (Grigoreva et al, 2019). При гибридной сборке длинные прочтения с секвенаторов PacBio или ONT предоставляют информацию об общей структуре генома, а короткие прочтения с платформы Illumina уточняют сборку в конкретных участках и параллельно, корректируют ошибки, которые являются слабым местом технологий секвенирования третьего поколения.

В настоящую задачу входило полногеномное секвенирование и сборка нуклеотидных последовательностей для получения информации о геноме донора генов устойчивости – иммунного вида *V. rotundifolia*.

В качестве объекта изучения для полногеномного секвенирования был использован североамериканского вида *V. rotundifolia* единственный сорт Дикси (Dixie), поддерживаемый живом виде на Крымской опытно-селекционной станции ВИР (Крымск, Краснодарский край).



Рисунок 1. Фото сорта Дикси (Dixie)

Краткое описание сорта Дикси (Dixie).

Гроздь мелкая (5-10 ягод), рыхлая. Ягода сравнительно крупная, 4,6 г отдельные достигают 6,0 г, шаровидной формы. Окраска ягод на солнечной стороне желтовато-оранжевая (бронзовая). Кожица покрыта многочисленными точками. У созревших ягод наблюдаются бурые пятна неопределенной конфигурации. Плодоножка ягоды длинная, тонкая покрыта мелкими бородавками. Подушечка мелкая, созревшие ягоды легко опадают. Кожица толстая, прочная, плохо отделяется от мякоти. Мякоть зеленая, в виде сгустка, скользкая, специфического вкуса с сильным мюскадинным ароматом, легко узнаваемым за несколько метров от куста. Семена трудно отделяются от мякоти, крупных размеров, плоские, бурой окраски. Клювик почти отсутствует. Халаза в центре тела. Брюшные бороздки слабо выражены. В ягоде 2-3 семени. Масса 100 семян 5 г.

В 1992 году сорт Дикси (Dixie), был интродуцирован известным отечественным ампелографом В.А. Носальчуком. С 1992 по 1994 году на Павловской опытной станции ВИР (Санкт-Петербург) образец проходил карантинную проверку. После прохождения карантина в 1995 году саженцы были переданы на Крымскую опытно-селекционную станцию, где и были высажены в коллекцию. По составленной нами родословной в

происхождение сорта Дикси участвовало 20 сортов *V. rotundifolia* которая отличается типом цветка (муж и жен) окраской (белая, черная) сроками созревания ягод.

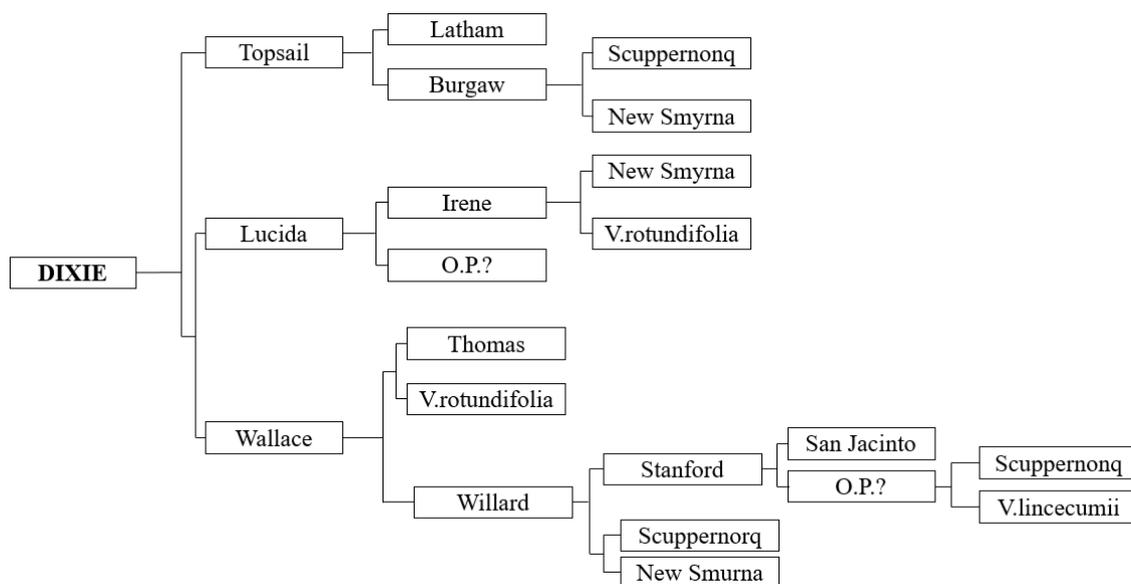


Рисунок 2. Родословная сорта Дикси

В отличие от других видов представители североамериканского вида *Vitis rotundifolia* Michaux, относящегося к подроду *Muscadinia* являются уникальным источником генов устойчивости. Однако использовать этот ценный источник генов устойчивости в селекции европейских сортов винограда затруднительно. Если виды подрода *Euvitis* скрещиваются между собой легко, то получить гибриды между видом *V. vinifera* (подрод *Euvitis*, 38 хромосом) с видом *V. rotundifolia* (подрод *Muscadinia*, 40 хромосом) ранее удалось с большим трудом, при этом гибридные сеянцы стали фертильными только после их полиплоидизации (аллотетраплоидии) (Волинкин и др., 2012). Очевидно, что ни созданный ранее селекционный гибридный материал с участием *V. rotundifolia*, ни материал, полученный вновь с целью поиска генов устойчивости к оидиуму, милдью и филлоксеру, не удастся идентифицировать без информации о геноме донора генов устойчивости - иммунного вида *V. rotundifolia*.

На сегодняшний день известно около 80 гибридов и сортов этого вида американского происхождения. Было несколько попыток интродуцировать разнообразие сортов *V. rotundifolia*. В 1999 году по нашей заявке было получено 33 сорта по 1 черенку. В отдел биотехнологии Крымского ОСС куда были переданы черенки, не удалось укоренить ни одного сорта. В отличие от других видов *Vitis* у представителей этого *V. rotundifolia* очень низкая (почти нулевая) приживаемость одревесневших черенков.

Этап 1. Выделение ДНК для полногеномного секвенирования. Проверка качества и концентрации выделенной ДНК.

ДНК выделялась из молодых лиофилизированных листьев с использованием коммерческого набора DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Разрушение клеточной стенки в листьях осуществлялось с использованием жидкого азота и гомогенизатора TissueLyser LT (Qiagen). Целостность выделенной ДНК оценивали в 1% агарозном геле, а качество с использованием спекрофотометра NanoDrop One (Thermo FS). Концентрация ДНК измерялось с помощью флуориметра Qubit 4 (Thermo FS). Секвенирование производилось с использованием прибора MinION (Oxford Nanopore Technologies).

Этап 2. Подготовка библиотек для секвенирования на платформе MinION

Секвенирование производилось с использованием прибора MinION (Oxford Nanopore Technologies). Были задействованы две проточные ячейки типа R9.4.1. Подготовка библиотек и загрузка на ячейки осуществлялась с использованием набора Ligation Sequencing Kit 1D (MinION). Для приготовления каждой из библиотек было использовано примерно 2000 нг высокомолекулярной очищенной ДНК. Перед подготовкой библиотек ДНК была фрагментирована с использованием колонок g-TUBE (Covaris), согласно протоколу производителя. Ожидаемый размер фрагментов составил 10 000 пн и 12 000 пн для первой и второй библиотек соответственно.

Этап 3. Процедура секвенирования на MinION и биоинформатическая обработка данных

Технология секвенирования на нанопорах подразумевает получение информации об изменении потенциала силы тока при прохождении молекулы ДНК через белковую пору. В зависимости от структуры азотистого основания (А, G, Т, С), сила тока изменяется по-разному. Таким образом, «сырой» сигнал секвенирования представляет собой запись изменения силы тока (fast5) с помощью программ русоQC. Для последующих биоинформатических операций такой бинарный сигнал необходимо декодировать и перевести в широко используемый и поддерживаемый уже разработанным программным обеспечением (ПО) формат. С этой целью сырой сигнал fast5 проходит процедуру распознавания нуклеотидов (basecalling), которая переводит информацию о нуклеотидах А, G, С, Т из бинарной записи fast5 в формат fasta/fastq (Basecalling, 2019). На сегодняшний день доступно несколько программ для такой конвертации, среди них: chiron, flappie, guppy, scrappie (Wick et al., 2019). В данном исследовании был использован один из самых широко используемых и точных алгоритмов декодирования guppyV.0.1.11.

После преобразования сигнала был осуществлен контроль качества секвенирования с помощью программ *rusoQC* (Leger, Leonardi, 2019) и *poretools* (Loman, Quinlan, 2014). Контроль качества позволяет получить информацию о базовых статистических показателях проведенного секвенирования: общее количество прочтений (ридов), количество ридов, успешно прошедших процедуру распознавания нуклеотидов, N50 – показатель непрерывности чтения, обозначающий минимальную длину прочтения для более половины (50%) всех полученных ридов, медиана длины ридов и медиана качества, определяемого по шкале Phred (Q) (Ewing, Green, 1998). Для фильтрации возможной контаминации библиотек человеческой ДНК была использована программа *minimap2* (Li, 2018). Чтения низкого качества с большой вероятностью ошибок, определяемой по показателю Phred ≤ 8 , и чтения длиной менее 500 пн были отфильтрованы с помощью *NanoFilt* (DeCosteret al., 2018).

Этап 4. Полногеномная сборка *V. rotundifolia* методом *denovo* для данных ONT и сборка гибридным методом

Для сборки генома методом *denovo* применялся алгоритм (pipeline) *minimap2* - *miniasm* (Li, 2016), который является одним из наиболее широко используемых при сборке длинных прочтений, и подразумевает последовательное выполнение нескольких этапов (рисунок 3). Однако алгоритм *minimap2* - *miniasm* не включает в себя шага корректировки возможных ошибок прочтений, полученных с MinION. Кроме того, при использовании только чтений с MinION при сборке *denovo* образуется большое количество пустот в сборке, так называемых «гэпов» (gaps) из-за неравномерности покрытия. Эти проблемы частично решаются процедурой полировки (polishing) сборки, полученной с использованием длинных прочтений, путем ее наложения на множество коротких, но многочисленных прочтений, полученных с Illumina. Поэтому мы дополнили рутину *minimap2* - *miniasm* еще одним этапом – коррекцией ошибок с помощью наложения полученной сборки длинными чтениями на сырые прочтения Illumina и ONT, используя программы *Racon* (Vaseret al., 2017) и *Pilon* (Walker et al., 2014) (см. рисунок 3). Для этого из базы данных сырых прочтений (SRA) геномной ДНК *V. rotundifolia* были использованы риды, полученные с Illumina HiSeq2500, обеспечивающие 30-кратное покрытие генома этого вида (Bioproject SRX2868329: WGS of Muscadine Grape (*Vitis rotundifolia*)). *Racon* был использован для двух раундов коррекции полученной сборки и *Pilon* для трех раундов процедуры ее финальной «полировки» (polishing). Это позволило снизить частоту ошибок секвенирования, которые характерны для длинных ридов с MinION, и уменьшить

количество пропусков в полученной сборке, тем самым увеличить долю скаффолдов среди всех фрагментов.

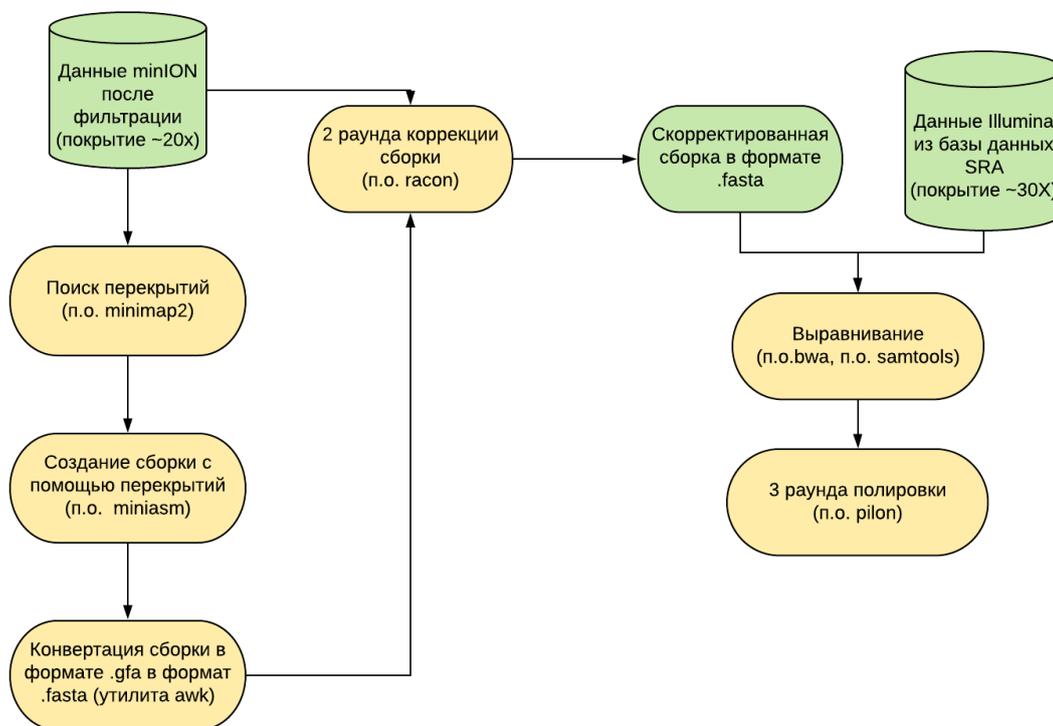


Рисунок 3. Схема процесса (pipeline) сборки генома *V. Rotundifolia* методом *denovo* по результатам секвенирования на MinION с использованием программы *minimap2* - *miniasm*

Дополнительно был применен альтернативный подход к получению полногеномной сборки *denovo V. rotundifolia* – гибридным методом. Этот метод подразумевает изначальное комбинирование коротких и длинных прочтений, которое выполняет программа SPAdes (hybridSPAdes) (Antipov et al., 2016). Как и в предыдущем случае, были использованы ранее опубликованные короткие риды с Illumina HiSeq2500, (SRX2868329: WGS ofMuscadineGrape (*Vitisrotundifolia*), комбинированные с результатами секвенирования на MinION.

Алгоритм гибридной сборки включает в себя сборку коротких прочтений графами Де Брюина и последующем закрытии «пропусков» сборки с помощью длинных ридов. Отличительной особенностью алгоритма является автоматический подбор наиболее подходящих *k*-меров (*k*-mer – короткие фрагменты ридов варьирующей длины, на которые разбиваются прочтения для последующей сборки).

Этап 5. Оценка качества полногеномной сборки *V. rotundifolia*

Для оценки качества сборки и ее фрагментированности полногеномная сборка *V. rotundifolia*, полученная двумя различными способами, была проанализирована с помощью BUSCO V.3.0.2 (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) (Simao et al., 2015, Seppey et al., 2019). BUSCO представляет собой биоинформатический инструмент, который позволяет оценить качество полногеномной сборки, полученной из множества коротких прочтений, основываясь не на технических параметрах, как например, показатель N50, или статистическое распределение длин полученных контигов, а принимая во внимание «смысловой» параметр собранного генома – полноту представленности генов, ортологи которых встречаются, например, более, чем у 90% видов Embryophyta. При этом, BUSCO принимает во внимание преимущественно уникальные гены (single-copy orthologs). Алгоритм BUSCO включает три этапа:

- 1) поиск функциональных последовательностей в анализируемой сборке, путем ее выравнивания методом tBlast на одну из доступных баз данных генов – ортологов BUSCO;
- 2) прогнозирование структуры генов для выявленных функциональных последовательностей с помощью программы Augustus (Stanke et al., 2006);
- 3) заключительный этап определяет насколько выявленные в сборке функциональные последовательности являются полноразмерными. Если их длина находится в пределах двух стандартных отклонений от длины последовательностей генов – ортологов данной группы в BUSCO – аннотированным генам присваивается статус «полноразмерный» (CompleteBUSCOs). Полноразмерные гены, обнаруженные не в единственной копии, относятся к группе «дублированный» (Duplicated). Частично воссозданные гены классифицируются как «фрагментированные» (Fragmented), не обнаруженные гены классифицируются как «отсутствующие» (Missed). Для анализа двух версий полногеномной сборки *V. rotundifolia* было использовано 1614 последовательностей ортологичных генов из базы данных BUSCO высших растений (Embryophyta)embryophyta_odb 10.2019-11-20.

1.2.2.4. Получение гибридов F1 и проверка на наличие контаминации

На фоне многолетней эпифитотии (массового поражения образцов винограда грибными патогенами) был выявлен образец дагестанский автохтонный сорт винограда Кара яй изюм, проявляющий устойчивость к многим грибным болезням. Этот сорт относится к эколого-географической группе восточных сортов с обоеполым типом цветка. Грозди в большей степени средней величины, а иногда достаточно крупные с мясистой-сочной мякотью.

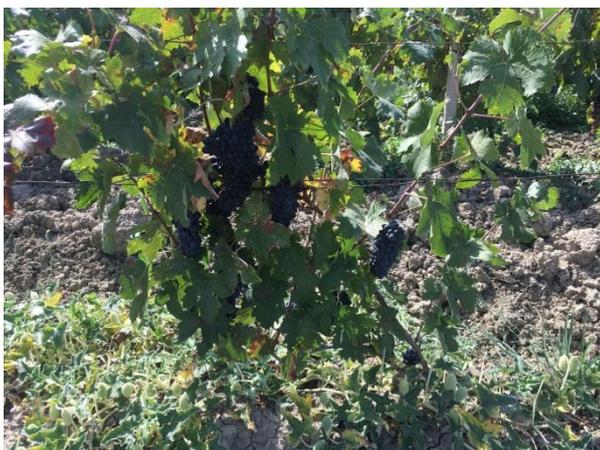


Рисунок 4. Староместный Дагестанский сорт Кара яй изюм

Для получения гибридов F1 мы брали в качестве отцовской формы растение, проявляющее признаки устойчивости к оидиуму и милдью а также материнские формы с функционально-женским типом цветка, не устойчивые к грибным болезням.

Таблица 4. Получение гибридов F1

♀	♂
Кара яй изюм	Альзуб
	Джунга
	Агчакракар
	Коз узюм
	Чолбер
	Махборцибил
	Иритумут
	Гимра
	Шилохвостный

В таблице 4 представлена схема гибридизации. Для гибридизации отбирали кусты с крупными соцветиями, затем на них надевали изоляторы из пергаментной бумаги с целью предотвращения случайного переопыления. В период цветения устойчивого растения тычиночные нити с пыльниками собирали в бумажные пакетики, а затем переносили в проветриваемое темное помещение для просушивания и дозревания. После этого проводилось искусственное скрещивание путём нанесения пыльцы отцовского растения на цветки материнского. Для того, чтобы на соцветие через воздух не попадала пыльца посторонних сортов на рыльце пестика, изолятор обычно не снимали, а в нем вырезали круглое отверстие, через которое производилось искусственное опыление с помощью кисточки или ваты, после чего отверстие заклеивали кружочком из пергаментной бумаги.

Задача исследования состояла в том, чтобы определить наличие контаминации при получении гибридов F1, для целей гибридной идентификации у винограда включало ряд последовательных этапов: стратификация семян, подбор полиморфных праймеров,

выделение и оценка качества ДНК, постановка ПЦР, постановка электрофореза на агарозном геле, анализ размеров амплифицированных фрагментов. В качестве материала был использован образец показывающий устойчивость на общей эпифитоти к грибным заболеваниям и образцы не устойчивые с женским типом цветка.

- Стратификация гибридных семян

Полученные гибридные ягоды остаются на кустах до полного вызревания семян. Затем грозди снимали с кустов вместе с пергаментными изоляторами. Из ягод извлекали семена. Далее тщательно промывали, слегка просушивали на хорошо проветриваемых стеллажах. Однако перед посадкой в кассеты необходимо было провести стратификацию семян - метод предпосевной подготовки, обеспечивающий ускоренное и единовременное прорастание семян. Ключевым этапом данного метода является продолжительная инкубация (45-60 дней) семян в низкотемпературных условиях (0-4°C) и увлажнённой песчаной почве.

Посев семян в чашки Петри производили в начале апреля месяца. Перед посевом семян в чашки Петри обеззараживали в растворе марганцовки. В марлевом мешочке опускали в насыщенный розовый раствор марганцовки, вынимают минут через 10-15 и промывают под струей воды. Главное, не держать слишком долго и не сжечь семена в слишком сильном растворе. Раствор марганцовки для обработки семян должен быть 1-2%, для чего 1 грамм препарата разводят в 100 г воды.

Затем более 200 семян с каждого скрещивания равномерно укладывали на фильтровальную бумагу в чашке Петри. В чашку Петри наливали по 5 мл дистиллированной воды, при этом уровень жидкости в чашке должен быть ниже поверхности семян и оставляли в неотопливаемом помещении при температуре 18-20°C. Наклюнувшиеся семена пересаживали в кассеты для дальнейшего прорастания при температуре 20°C и с поддержанием необходимой влажности.



Рисунок 5. Сеянцы гибридов F1

Сеянцев с 3-5 листками были пересажены в конце апреля в открытый грунт, на расстояние между бороздками было 30 см, между сеянцами 15 см.



Рисунок 6. Высаженные в Дагестане популяции винограда, полученные путём контролируемого скрещивания.

Своевременно проводились полив, прополка и рыхление почвы. В начале июня и июля была проведена подкормка растений. Таким образом, в полевые условия всего было высажено 8 популяций по 150-200 растений в каждой (Рис 3).

- Выделение ДНК

Следующим шагом была необходимость проверки факта того, что полученные семена не являются результатом случайного, неконтролируемого переопыления. Для этого из каждой популяции была сделана выборка из 10 растений. С каждого растения были собраны свежие листья, из которых была выделена ДНК. ДНК выделяли из свежих листьев с использованием модифицированного СТАВ-метод с 2-меркаптоэтанолом (Rahimah et al., 2006). Полученная ДНК оценивалась на нано-спектрофотометре Implen N60 (Германия). Качество проверяли электрофорезом в 1% -ном агарозном геле.

- Микросателлитный анализ.

Для реакции амплификации микросателлитных локусов использовали десять микросателлитных локусах: SCU 10VV, SCU 11 VV, SCU 15 VV, UDV 107, VVIB 01, VVIP 31, VVIV 67, VVS 3, VVMD5, VVMD6 (см. табл. 1), с флуоресцентными метками на 5' концах прямых праймеров. Амплификацию проводили в общем объеме 25 мкл, состоящем из 10-20 нг матричной ДНК, 1мкл 2,5мМ dNTP, 2,5 мкл 10X реакционного буфера содержанием 50мМ MgCl₂, по 0,5 мкл прямого и обратного праймера в концентрации 10

пМ, 0,5мклTaq полимеразы (5 е.а./мкл), 18мкл ddH₂O (Диалат Лтд). Полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700 (США). Для каждой пары праймеров подбирался термальный режим с учетом их нуклеотидного состава рекомендацией разработчиков и была подобрана программы при помощи SyberGreen, протокол амплификации указан в табл. 2.

Продукты амплификации детектировали с помощью генетическом анализаторе AppliedBiosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Продукты амплификации, полученные для каждого растения с праймерами для исследуемых локусов, смешивали и разводили в 100 раз. Детекционная смесь состояла из 1 мкл смеси разведенных продуктов амплификации, 1 мкл размерного стандарта (СД-450, Синтол, Россия) и 9 мкл Hi-Diформамида (ThermoFisher, США). Смесь денатурировали при 95°C 5 мин и охлаждали во льду. Размеры фрагментов ДНК определяли с использованием аналитического программного обеспечения GeneScan™ версии 3.1 (Applied Biosystems). Для обработки полученной информации о размерах локусов и анализа структуры популяций использовалось программное обеспечение Structure 2.3.4, а также RStudio.

1.2.2.5. Методы микроразмножения, сохранения в культуре *in vitro*

Исследование проводили на растениях 13 образцах винограда Дагестанской ампелографической коллекции, которые ранее были изучены генетически по происхождению (Агаханов и др. 2019). По происхождению эти сорта относятся к разным эколого-географическим группам и активно используется на промышленных насаждениях и в селекции, для создания высокопродуктивных и устойчивых сортов. В качестве физиологически активных веществ были выбраны регуляторы роста ГК, ИМК, 6-БАП. Для закладки опытов были использованы микрочеренки различных частей растения: верхней, средней и нижней.

Для предотвращения большого выпада эксплантов сбор черенков проводили в период покоя, черенки проращивали на световых установках при температуре +25...+30 С. Затем полученные верхушечные и пазушные почки побегов отделяли от стебля, тщательно промывали мыльной водой и далее проточной водопроводной водой. Промытые почки стерилизовали свежеприготовленным бытовым отбеливателем АСЕ (концентрация гипохлорита натрия 0,5%), растворенном в дистиллированной воде в соотношении 1:9. Для лучшего смачивания поверхность почек добавляли 0,1 мл/л ТВИН 20. Емкость с растительным материалом помещали на шейкер или периодически встряхивали вручную в течение 15-20 минут (Ухатова, 2017). Затем под бинокулярным микроскопом в ламинар-боксе вычленили апексы и/ или меристемы в стерильных условиях. После отделения меристематической верхушки ее скальпелем помещали на кончик иглы таким образом,

чтобы не нарушить полярность при посадке на питательную среду в чашках Петри или пробирках, которые далее переносили в комнату на световые установки с освещенностью 3000-4000 люкс, температурой 23 - 25⁰ С, относительной влажностью воздуха 65 - 70%.

Исследовали следующие концентрации и сочетания фитогормонов:

1. МС+1мг/л БАП
2. МС+1,5мг/л БАП
3. МС Fe*2+1мг/л БАП+0,5мг/л ГК
4. МС 1мг/л БАП+0,2 мг/л ГК
5. МС 0,5мг/л БАП + 0,2 мг/л ИМК

В качестве контроля брали питательную среду Мурасиге и Скуга (1962) с добавлением 0,5мг/л БАП.

2. Результаты

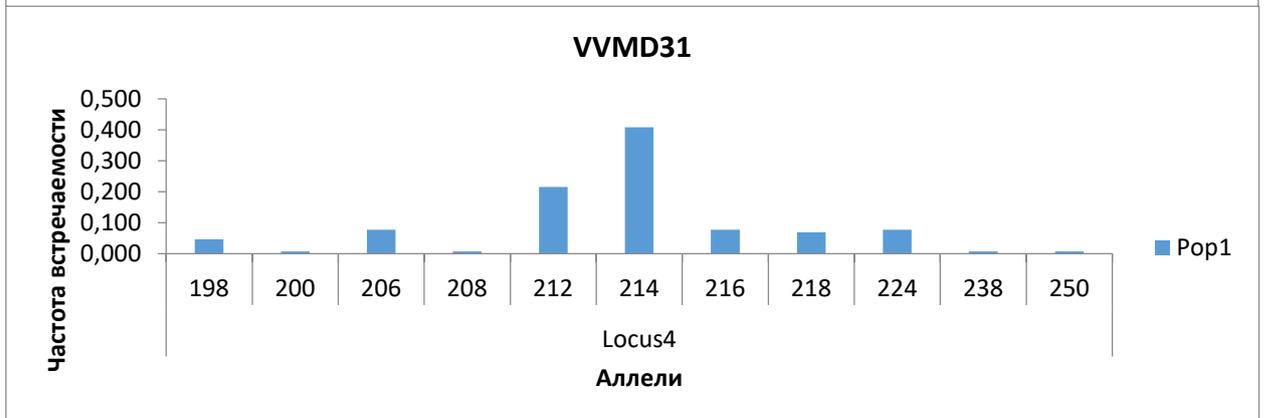
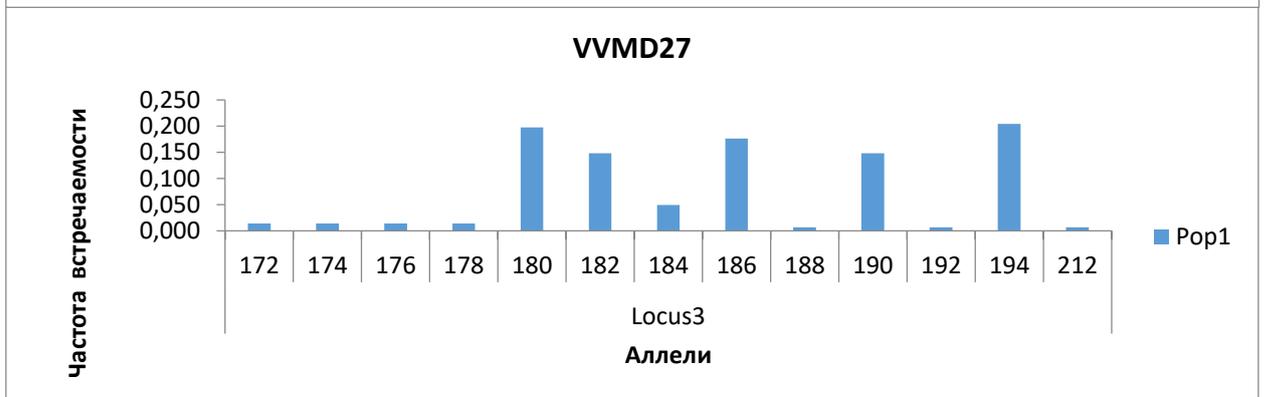
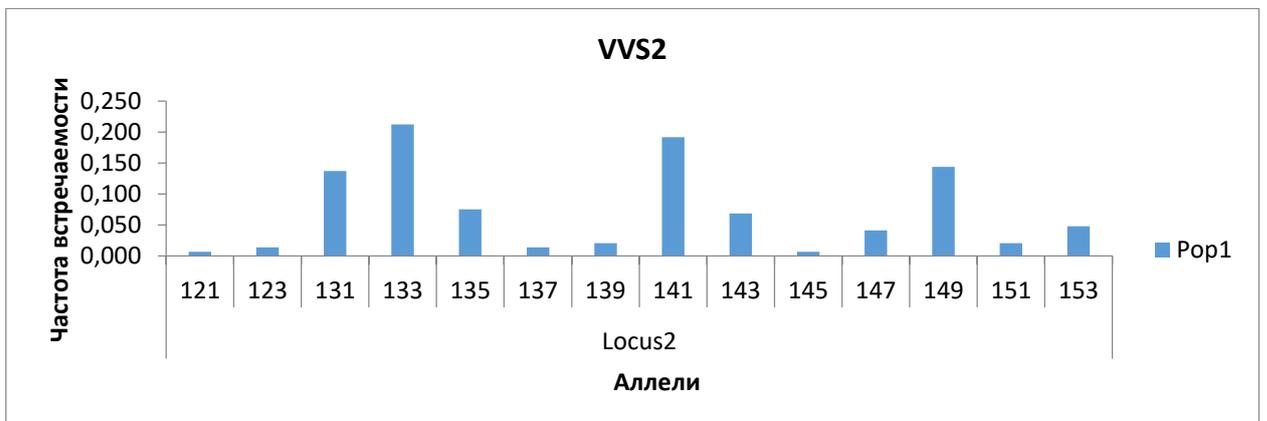
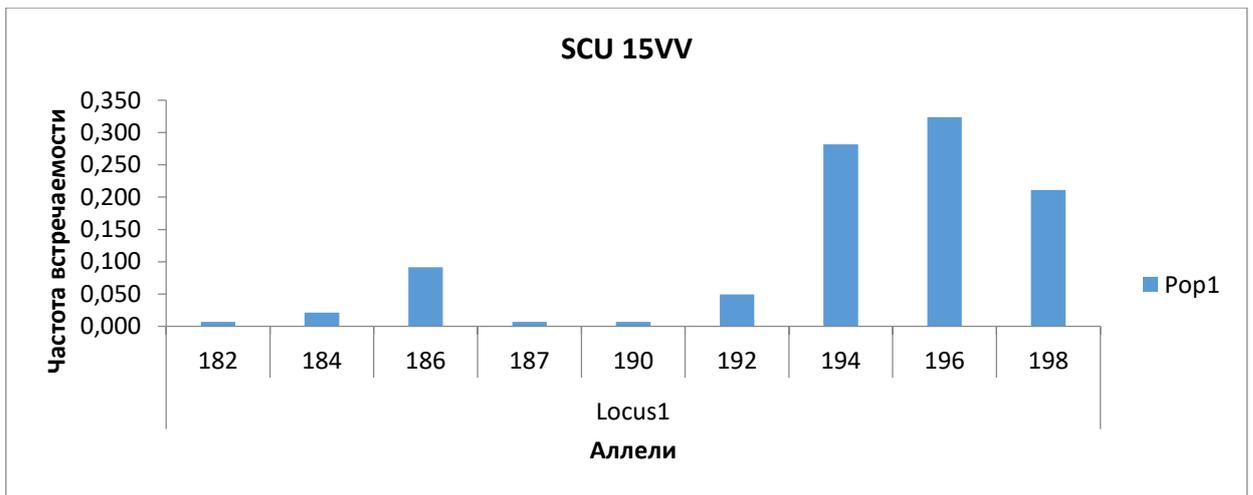
2.1 Результаты генотипирования генетического разнообразия коллекции винограда

В проведенном исследовании 72 сорта винограда из коллекции ДОО ВИР были проанализированы с восемью микросателлитными локусами: scu15vv, VVS 2, VVMD 27, VVMD 31, VVIN54, VVIP31, scu11vv и VVIB01, который ранее рекомендованных для сортовой идентификации винограда (Thomas et al., 1993; Bowers et al., 1999). Число выявленных аллелей, гетерозиготность (процент выявленных гетерозигот к общему числу проанализированных растений) для каждого микросателлитного локуса представлены в таблице.

Таблица 5. Изменчивость микросателлитных локусов по результатам генотипирования 72 образцов винограда коллекции ДОО ВИР

Локус	SCU 15V V	VVS 2	VVMD 27	VVMD 31	VVIN5 4	VVIP3 1	SCU11V V	VVIB0 1
Число аллелей	9	14	13	11	18	28	25	14
Гетерозиготность	0.760	0.863	0.841	0.762	0.844	0.945	0.874	0.755
Размер фрагментов (пн)	182-198	121-153	171-212	198-250	143-183	164-197	213-293	284-324
PIC, Polymorphic Information Content	0.835	0.835	0.753	0.767	0.671	0.870	0.630	0.726

Как следует из таблицы 5, в общей сложности для восьми проанализированных микросателлитных локусов было выявлено 132 аллеля. Для каждого маркера был рассчитан коэффициент информативности PIC, значения которого были достаточно высоки и варьировали в пределах 0,63–0,87. Частота встречаемости аллелей каждого локуса среди 72 образцов винограда представлена на рисунке 7.



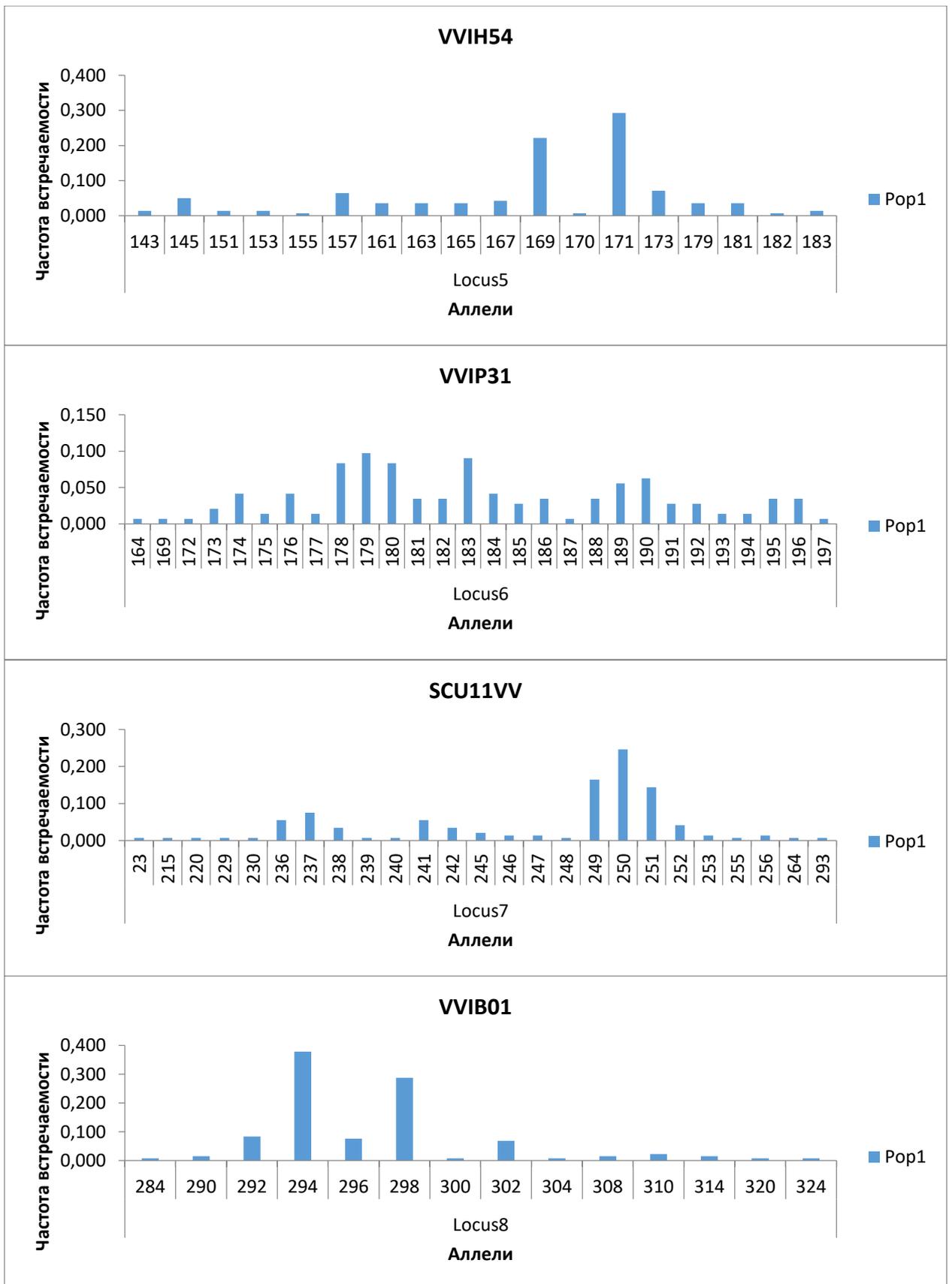


Рисунок 7. Частота встречаемости аллелей микросателлитных локусов SCU15VV, VVS2, VVMD27, VVMD31, VVIN54, VVIP31, SCU11VV, VVIB01 среди образцов винограда коллекции ДОС ВИР

Генетическая структура коллекции винограда ДОС ВИР по данным полиморфизма микросателлитных локусов была проанализирована с помощью программы Structure 2.3.4, основанной на вероятностной модели Бейса (Bayesian method). Метод позволяет обнаружить генетическую структуру популяции, размещая отдельные индивидуумы в наиболее вероятное число кластеров (K), в пределах которых отклонение от равновесия Харди-Вайнберга было бы минимальным. Вероятность числа кластеров в изучаемой выборке (K) оценивалась в диапазоне от 1 до 15, для каждого значения K выполнялось 10 повторов анализа. Наиболее вероятное число кластеров (K), то есть объективно обособленных генетических групп в изучаемой выборке, определялось согласно алгоритму, предложенному Evanno et al. (2005). Четыре генетических кластера (K) были выделены в оценили генетическое разнообразие образцов винограда (рисунок 8).

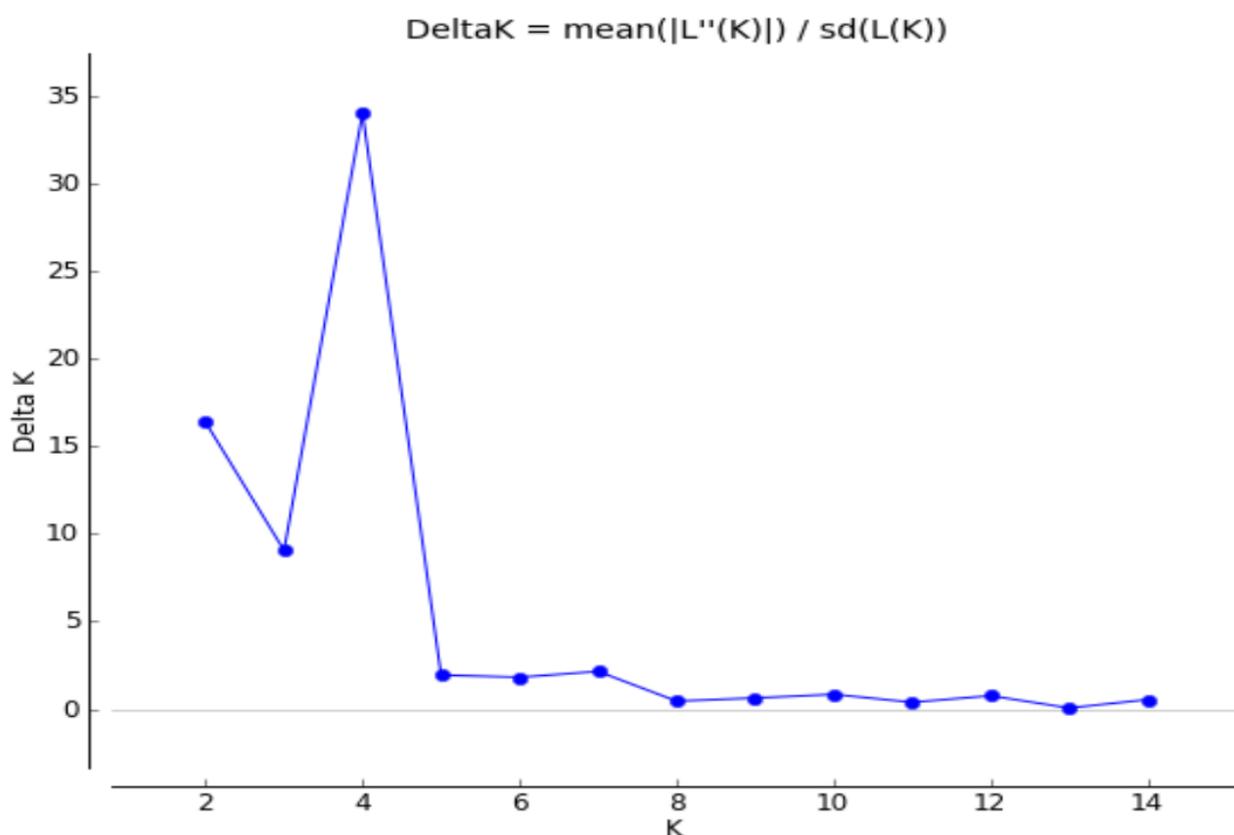


Рисунок 8. Вероятность числа кластеров (K) – генетически обособленных групп – среди 72 образцов коллекции винограда ДОС ВИР по результатам генотипирования по 8 микросателлитным локусам

Каждая из первых трех гроздей содержит образцы винограда того же географического происхождения и представляет собой отдельную эколого-географическую группу, четвертый кластер включал в основном гибриды (рисунок 9).

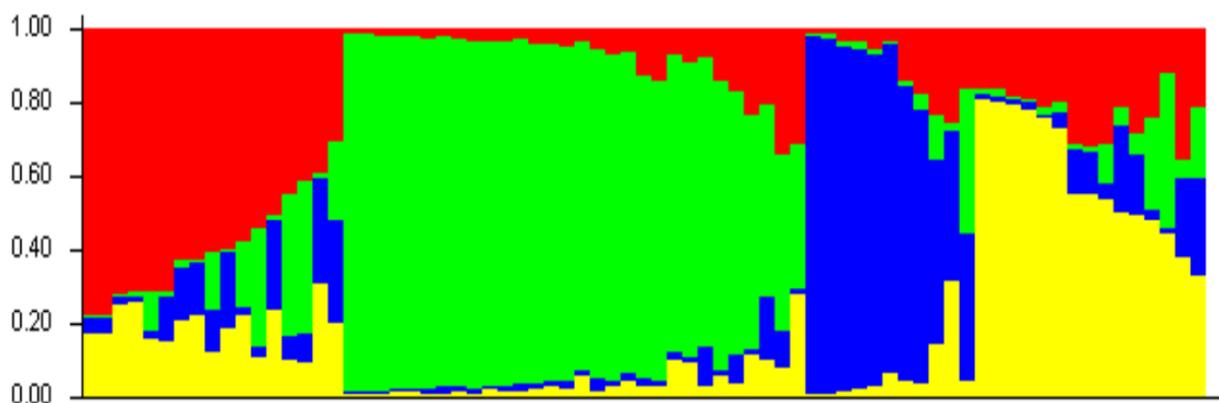


Рисунок 9. Генетическая структура разнообразия 72 сортов винограда из ампелографической коллекции ДОС ВИР

Первая (красная) группа включает 28 образцов винограда, которые в основном относятся к восточной эколого-географической группе *conar. orientalis* Negr. и представляют собой дагестанские автохтонные сорта винограда. Второй кластер (зеленый) объединяет 18 образцов винограда и представляет в основном западноевропейскую эколого-географическую группу сортов винограда (*conar. occidentalis* Negr.). Среди них было некоторые известные сорта винограда, такие как «Рислинг» и «Алиготе». К третьему (синему) были отнесены древние автохтонные сорта винограда бассейна Черного моря (*convar. Pontica* Negr.). В четвертую группу (желтому) вошли европейско-азиатские, внутри-видовые, смешанно-комплексно устойчивые и межвидовые гибриды. На сегодняшний день никаких молекулярных исследований не проводилось. Нами было проведено анализ генетической структуры коллекций и ее генетическое разнообразие. Разнообразие восьми полиморфных микросателлитных локусов позволило нам оценить генетическую структуру и установить отношения между генотипом виноградного образца и его происхождением.

2.2 Секвенирование MinION, распознавание нуклеотидов, контроль качества прочтений

Две ячейки MinION (тип R9.4.1) были использованы для секвенирования двух библиотек геномной ДНК, выделенной из листьев *V. rotundifolia* (сорт 'Dixie'). Перед загрузкой в ячейку первая библиотека содержала 1008 нг ДНК (с концентрацией 84 нг/мкл), вторая библиотека – 1152 нг (96 нг/мкл). Время работы одной ячейки в среднем составило 48 ч. Всего с двух ячеек было получено 1 748 466 прочтений (далее –ридов) (таблица 6).

Таблица 6. Общая статистика “сырых” данных секвенирования двух библиотек геномной ДНК *V. rotundifolia*, полученных с двух ячеек MinION с помощью программы NanoStatV.0.8.1из пакета Nanopack

Статистический показатель	Значение
Средняя длина рида (пн)	5,987.6
Среднее качество рида (Phred)	12.3
Медиана длины рида (пн)	4,142.0
Медиана качества рида (Phred)	12.5
Общее количество ридов	1,748,466
N50 длины рида (пн)	9,514
Всего прочитано нуклеотидов (пн)	10,469,195,297
>Q5	1744047 (99.7%) 10468.0Mb
>Q7	1740159 (99.5%) 10465.2Mb
>Q10	1478525 (84.6%) 8862.5Mb
>Q12	1040592 (59.5%) 6223.0Mb
>Q15	119125 (6.8%) 497.8Mb
Топ 5 ридов с лучшим качеством по шкале Phred (длина, пн)	
1	20.4 (422)
2	20.1 (334)
3	20.0 (1241)
4	20.0 (525)
5	19.9 (252)
Топ 5 самых длинных ридов – длина (качество по шкале Phred)	
1	122768 (13.1)

2	121913 (9.3)
3	113066 (10.0)
4	112400 (8.7)
5	112314 (11.7)

После декодирования сырого сигнала fast5 в fastq/fastai коррекции ошибок с помощью guppy было получено 1 738 535 ридов. Для полученных ридов был произведен контроль качества с помощью ruqQC, получены такие статистические показатели, как количество ридов, количество оснований, N50, медианы длин и качества ридов. Показатель N50 (минимальная длина, которую имели более половины полученных ридов) по результатам запуска первой ячейки составил 7310 пн, второй – 14600 пн. Медианы длин ридов составили 3500 пн для первой ячейки и 6380 пн – для второй (табл. 7).

Таблица 7. Основные статистические характеристики полученных данных после процедуры распознавания нуклеотидов (basecalling с помощью guppy), полученные с помощью ruqQC

Количество активных пор	Номер ячейки	Количество ридов	Количество оснований	Медиана длины	Медиана качества по шкале Phred	N50
481	1	1 220 594	5 732 084 000	3530	11.809	7310
455	2	517 941	4 729 669 000	6380	11.373	14600

На следующем этапе анализа данных была осуществлена фильтрация прочтений низкого качества, коротких прочтений и наиболее вероятных прочтений инородной ДНК. Для удаления возможной контаминации биологическим материалом человека процедура фильтрации была произведена с помощью minimap2. Всего был удален 41 501 рид (~2%), содержащий 100% сходство с референсным геномом человека. NanoFilt был применен для фильтрации по показателям качества прочтений (вероятности встретить ошибочно распознанный нуклеотид) и длины ридов. Для последующего анализа были сохранены риды, имеющие показатель качества по шкале Phred не менее 8 и длину прочтения более 500 пн. После фильтрации по этим показателям было получено 1635299

высококачественных ридов, составивших в общей сложности более 10 млрд (10 197 618 064) пн. Отфильтрованные риды низкого качества составили 5,9% от общего числа прочтений.

Принимая во внимание опубликованный размер генома культурного винограда (*V. vinifera*) в ~486 тыс. пн (Canaguier et al., 2017), можно предположить, что полученный объем данных обеспечивает почти 21-кратное «покрытие» секвенируемого генома *V. rotundifolia*. Такая глубина прочтений позволяет осуществлять сборку методом *denovo* без использования референсного генома (Vitis, 2020).

По результатам комбинирования коротких и длинных прочтений нами были протестированы разные длины k-меров (21, 33, 55, 77 пн). В качестве наиболее результативной, алгоритм автоматически выявил длину k-меров 77 пн. Сборка была протестирована на основные статистические показатели с помощью программы Quast (Gurevich et al., 2013). Общая длина сборки составила 539 Мб (млн пн), что соотносится с аналогичным показателем для референсного генома *V. vinifera*, размер которого был определен в ~486 Мб (Canaguier et al., 2017). В таблице 8 представлены основные статистические показатели качества полногеномной сборки *V. rotundifolia*, полученной с использованием *denovo*, привлекая только данные нанопорового секвенирования (ONT) и используя данные Illumina и ONT (гибридный метод).

Таблица 8. Основные характеристики полногеномной сборки *V. rotundifolia*, полученной методом *denovo* и гибридным методом по результатам оценки с помощью Quast

Показатели качества сборки	Сборка <i>denovo</i> ONT+Illumina (гибридный метод) (пн)	Сборка <i>denovo</i> , исключительно используя данные ONT (пн)
Количество контигов (≥ 0 пн)	809 308	2039
Количество контигов (≥ 1000 пн)	43 425	2037
Количество контигов (≥ 5000 пн)	15 430	2020
Количество контигов (≥ 10000 пн)	9292	1998
Количество контигов (≥ 25000 пн)	4056	1808

Количество контигов (≥ 50000 пн)	1516	1493
Общая длина контигов (сборки) (≥ 0 пн)	428 439 192	386 122 654
Количество скаффолдов	84 025	2039
Самый длинный скаффолд	319 841	2 353 788
N50	24 761	374 653
N75	6901	173 204
L50	4103	293
L75	12 305	669
GC%	33,31	33,94

По результатам сравнения двух подходов к получению полногеномной сборки *V. rotundifolia* установлено, что оба метода имеют свои преимущества и недостатки. Гибридный метод позволяет получить большее количество скаффолдов, однако при этом сборка получается намного более фрагментированной, чем при сборке с использованием только данных нанопорового секвенирования. Сборка *denovo* с использованием *minimap2* - *miniasm* с последующей процедурой полировки (*polishing*) на сырые риды Illumina дает возможность получить более длинные скаффолды, однако в гораздо меньшем количестве, из-за чего большая часть исследуемого генома остается не покрытой скаффолдами.

Полученные разными способами две версии полногеномной сборки *V. rotundifolia* различаются также по количеству выявленных повторяющихся последовательностей. Для их идентификации в полученных сборках был использован алгоритм «маскирования» (*masking*), который позволяет найти и скрыть повторы путем сравнения полногеномной сборки и доступных баз данных повторяющихся элементов с помощью программы Repeat Masker (Tarailo-Graovac, Chen, 2009). Для сборки, полученной гибридным методом, были выявлены повторы общей протяженностью 1 651 434 пн, для сборки с использованием данных ONT — почти в 3,5 раза меньше (484 681 пн).

На рисунке 10. представлены результаты оценки полноты представленности последовательностей ортологичных генов в сборке *denovo*, полученной с использованием данных ONT и гибридным методом.

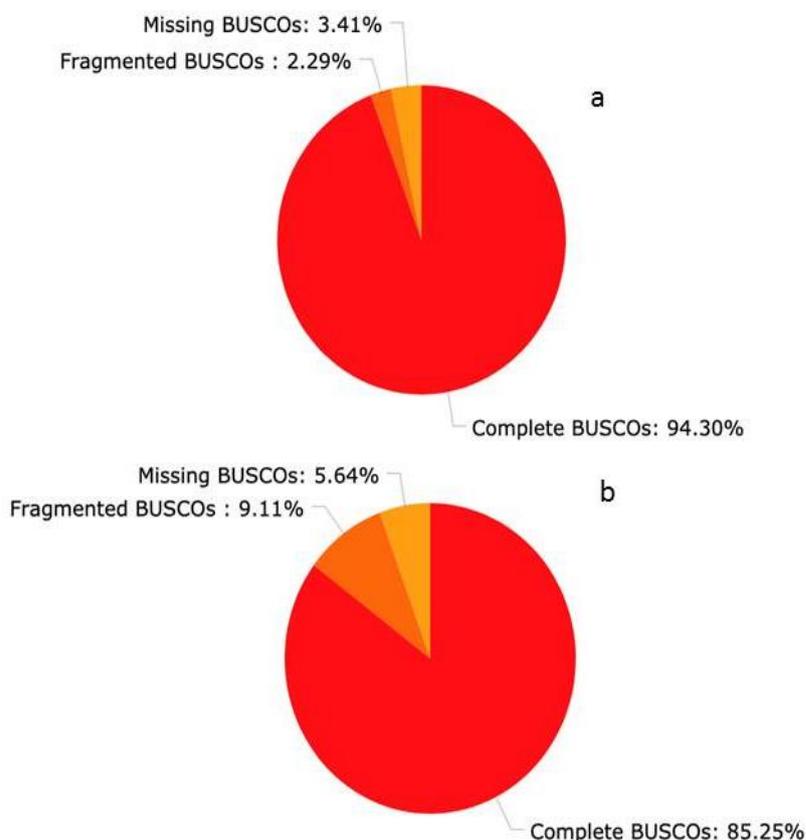


Рисунок 10. Представленность последовательностей ортологичных генов из базы данных BUSCO высших растений (Embryophyta) в полногеномной сборке *V. rotundifolia*, полученной методом *denovo* с использованием исключительно данных ONT (a) и гибридным методом (ONT+Illumina) (b)

В целом можно заключить, что обе версии сборки удовлетворяют показателям представленности в них последовательностей генов –ортологов, универсальных для Embryophyta, хотя сборка гибридным методом выглядит более фрагментированной. Результаты анализа BUSCO выявили несколько больше полных последовательностей генов –ортологов (CompleteBUSCOs) для сборки с использованием исключительно данных ONT, что можно объяснить простотой предсказания генов для длинных непрерывных чтений. С другой стороны, судя по показателям общей длины сборки и количестве контигов и скаффолдов, можно заключить, что сборка гибридным методом покрыла более протяженную часть уникальных участков генома, чем сборка с использованием minimap2 - miniasm.

Предложенная нами полногеномная сборка иммунного вида *V. rotundifolia* может быть также проанализирована с точки зрения идентификации гомологичных участков с опубликованным геномом культурного винограда *V. vinifera* 12X (InternationalGrapeGenomeProgram, GenBankassemblyaccession: GCA_000003745.2) и оценки степени сходства геномов двух видов. Особый интерес может представлять выравнивание полученной сборки на 12 хромосому в геноме *V. vinifera*, где ранее был картирован локус RUN1/RPV, ассоциированный с устойчивостью к оидиуму (RUN1) и милдью (RPV1).

Исследование Cochetel et al., (2020), опубликовавших первую версию сборки генома *V. rotundifolia*, позволила проанализировать различия в структуре этого локуса RUN1/RPV1 у иммунного *V. rotundifolia* (сорт 'Trayshed') и поражаемого *V. vinifera* (сорт 'Sauvignonblanc'). Локус RUN1/RPV1, фланкированный двумя микросателлитными маркерами VMC4f3.1 и VMC8g9 (Barker et al., 2005), протяженностью 5 млн пар оснований был расшифрован на хромосоме 12 *V. vinifera*. Аналогичный участок на хромосоме 12 у *V. rotundifolia* соответствовал интервалу почти 7,3 млн пн, вследствие многочисленных дупликаций внутри этого участка генома. В пределах этого интервала на хромосоме 12 у *V. vinifera* были идентифицированы 33 R-гена из семейства NBS-LRR (Nucleotidebindingsiteleucine-richrepeat), роль которых в формировании устойчивости к патогенам описана для многих видов растений, в том числе и винограда (Ziniet al., 2019). Для *V. rotundifolia* в том же локусе было выявлено 57 NBS-LRR генов, причем один класс этого семейства генов TIR-X со специфичным доменом был обнаружен только в геноме у устойчивого *V. rotundifolia* (сорт 'Trayshed'). Присутствие TIR-X генов постулируется в качестве одной из возможных причин устойчивости *V. rotundifolia* к фитопатогенам (Cochetelet al., 2020). Аналогичный анализ структуры локуса RUN1/RPV1 у еще одного сорта *V. rotundifolia* (сорт 'Dixie') с целью выявления вставок, делеций, повторов, может быть полезным для уточнения вероятных генов –кандидатов, определяющих устойчивость *V. rotundifolia* к оидиуму и милдью.

2.3 Создание картирующей популяции гибридов F1

Следующим шагом была необходимость проверки факта того, что полученные семена не являются результатом случайного, неконтролируемого переопыления. Для этого из каждой популяции была сделана выборка из 10 растений. С каждого растения были собраны свежие листья, из которых была выделена ДНК ДНК СТАВ-методом (Rahimah, A. B., S. C. Cheah, and S. Rajinder 2006). В качестве метода проверки был выбран фрагментный анализ микросателлитных локусов. Данный метод используется как один из способов

определения генетического разнообразия, родства, принадлежности к конкретной популяции, для исследования гибридизации, эволюционных процессов. Растения анализировались по 10 микросателлитным локусам: scu10vv, scu11vv, scu15vv (Scott, Kirsten D., et al. 2000), udv107 (DiGaspero, Gabriele, et al. 2005), vvip31, vvib01, vviv67 (Merdinoglu, Didier, et al. 2005), vvmd5, vvmd6 (Bowers, J. E., et al. 1996), vvs3 (Thomas, M. R., and N. S. Scott. 1993). Для получения фрагментов выбранных локусов суммарно было проведено 800 ПЦР. Результат реакций сначала детектировался на агарозном геле, а затем проводилось измерение длины фрагментов на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (ThermoFisherScientificInc., USA). Полученные с анализатора сырые данные обрабатывались с использованием онлайн платформы ThermoFisherConnect. Для обработки полученной информации о размерах локусов и анализа структуры популяций использовалось программное обеспечение Structure 2.3.4, а также RStudio. На рисунке (Рис 3) представлен график популяционной структуры, полученный на основании результатов данного анализа и можно заключить, что скрещивание 3 и скрещивание 6 не подверглись контаминации и потенциально могут быть использованы для создания генетических карт.

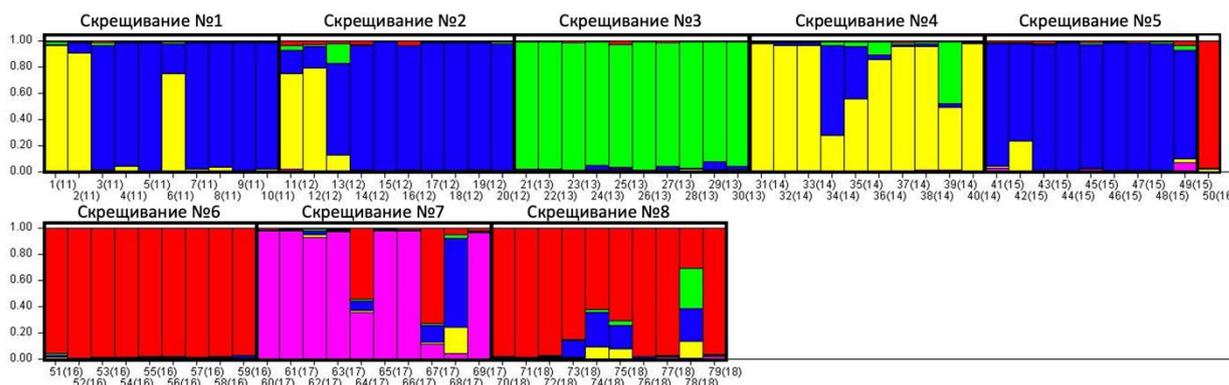


Рисунок 11. График популяционной структуры винограда, высаженного в полевых условиях Дагестана.

По результатам работы в полевых условиях Дагестана было высажено 8 популяции по 150-200 растений в каждой. Для каждой популяции был проведён микросателлитный анализ на небольшой выборке растений, который выявил популяции, без признаков контаминации посторонней пылью. Полученные гибридные популяции могут быть использованы для создания генетических карт и поиска генов-кандидатов хозяйственно-ценных признаков.

Таким образом, с применением современных методов генетики были изучены образцы коллекции винограда ВИР. Поскольку виноград является одной из вегетативно размножаемых культур, в целях надежного сохранения изученных образцов была поставлена задача апробации и усовершенствования методов культивирования ряда образцов в асептических условиях.

2.4 Результаты введения в культуру *in vitro* изученных образцов винограда

Методы микроклонального размножения апикальными меристемами основывается на способности растительной клетки, в частности, клеток зоны апикальной меристемы, к тотипотентности (Лутова, 2010). Апикальная меристема – конус активно делящихся клеток размерами до 0,2...0,4 мм обычно свободная от вирусов (Engelbrecht, 1979; Everent, 1978; Garre, 1979). В связи с маленькими размерами апикальной меристемы, собственно меристему бывает трудно вычленить без повреждений, поэтому часто отделяли вместе с ней один-два листовых примордия.

Для введения в культуру *in vitro* мы использовали ранее зарекомендовавшие питательные среды из литературных источников. На каждую питательную среду были введены по 10 шт. меристем 13 сортов, ранее изученных генетическими методами.

Таблица 9. Микроклональное размножение ампелографической коллекции филиала Дагестанская опытная станция ВИР (ДОС ВИР)

Сорт	В том числе на питательную среду					
	МС 0,5мг/л 6-БАП	МС 1 мг/л 6-БАП	МС 1,5 мг/л 6-БАП	МСFe*2+1 мг/л 6-БАП+0,5 мг/л ГК	МС 1 мг/л 6-БАП+0,2 мг/л ГК	МС 1 мг/л 6-БАП + 0,2 мг/л ИМК
Гимра	8	9	4	3	7	8
Семильон	6	8	6	4	7	7
Кишмиш Ваткана	7	6	4	6	6	7
Гюляби розовый	8	8	4	4	8	8
Серсиналь	7	7	5	4	6	8
Сафтадурмаз	6	8	7	5	4	7
Коз узюм	5	9	7	6	2	7
Хоцацибил	6	8	6	5	3	7
Баят капы	7	6	7	5	6	8
Алиготе	9	9	6	3	7	7
Рислинг	6	9	7	4	5	8
Бианка	6	7	7	3	4	10
Чолбер	5	8	6	6	9	7

Следовательно, на каждую питательную среду было введено 130 меристем, число выживших не пораженных меристем варьировало от 58 до 102 штук в зависимости от сорта.

Проведенные наблюдения в течение 2 недель показали, что на первом этапе выращивания часть меристем инфицировались и на некоторых питательных средах не проросли. Возможно, большой процент гибели и инфекции меристем винограда связан с механическими повреждениями при введении в культуру *in vitro*, составом питательных сред и генотипом растений.

Через месяц посадки, оставшиеся, не пораженные чистые меристемы после посадки развились в микрорастения размерами 2-2,5 мм. Эти микрорастения повторно пересаживали на такую же по составу питательную среду. В течение 45-55 дней после пересадки образовались микрорастения с размерами 6-10 см.

В наших исследованиях разрастание меристем было отмечено у всех изучаемых сортов. Рост и развитие апикальных меристем у испытуемых сортов винограда протекали неодинаково (табл. 10). На этапе введения в микроклональное размножение самая низкая жизнеспособность была выявлена на питательных средах МС Fe*2+1мг/л 6-БАП+0,5мг/л ГК 44% , а самые высокие показатели на питательных средах МС 1 мг/л 6-БАП 78%, МС 1 мг/л 6-БАП + 0,2 мг/л ИМК 76%. Средние величины жизнеспособности были отмечены на питательных среда МС 1 БАП+0,2 мг/л ГК 57%, МС 1,5 мг/л БАП 58% с небольшим увеличением на среде МС 0,5 мг/л БАП 66%.

Таблица 10. Процент прижившихся эксплантов при введении в культуру *in vitro*

	В том числе на питательную среду					
	МС 0,5мг/л 6-БАП	МС 1 мг/л 6-БАП	МС 1,5 мг/л 6-БАП	МС Fe*2+ 1 мг/л 6-БАП+0,5 мг/л ГК	МС 1 мг/л 6-БАП+0,2 мг/л ГК	МС 1 мг/л 6-БАП + 0,2 мг/л ИМК
Общее количество прижившихся меристем шт.	86	102	76	58	74	99
%, прижившихся	66	78	58	44	57	76

Степень жизнеспособности при микроклональном размножении больше зависит от наличия регуляторов роста и от генотипических особенностей сорта. При этом процесс ризогенеза при дальнейшем культивировании отмечали у всех сортов.

Подсчёт коэффициента микроразмножения – в процессе обработки.

Выводы

1. С помощью 8 микросателлитных локусов генотипированы 72 образца винограда. Установлен высокий полиморфизм некоторых микросателлитных локусов. Полученные данные свидетельствует о перспективности применения протестированных маркеров для оценки генетического разнообразия винограда, а также при разработке методов идентификации и паспортизации сортов.
2. По результатам фенотипических исследований выделен образец с хозяйственно-ценными признаками. Проведены скрещивания и создан научно-исследовательский ресурс в виде картирующих популяций гибридов F1, полученных от контролируемого скрещивания растения.
3. Предложен первый вариант сборки генома *Vitis rotundifolia* с использованием секвенирования третьего поколения. Более 1,6 млн высококачественных прочтений длиной ~5 тыс. пн, составивших в общей сложности более 10 млрд пн, были депонированы в базы данных NCBI, SRA, ENA и доступны для использования. Помимо депонированных ‘сырых’ прочтений, также была создана и опубликована в NCBI версия полногеномной сборки *V. rotundifolia*, выполненная ‘гибридным’ методом, с комбинированием длинных прочтений, полученных с MinION, и коротких ридов Illumina, доступных из баз данных. Созданный исследовательский ресурс может быть использован для молекулярно – генетической идентификации генов устойчивости к болезням и вредителям винограда, донором которых является этот североамериканский вид.
4. Показана возможность введения в культуру *in vitro* образцов винограда на питательную среду МС с добавлением 1 мг/л 6-БАП.

Список литературы

- Агаханов М. М.* и др. Полиморфизм микросателлитных локусов в коллекции винограда дагестанского филиала ВИР //Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2019. – Т. 179. – №. 3. – С. 224-234.
- Бутенко Р.Г.* Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений М.,1964.
- Дорошенко Н.П.* Производство базисного посадочного материала // Виноград и вино России. - 2001. - № 2. - С. 23-25.
- Дорошенко Н. П.* Оптимизация условий клонального микроразмножения винограда //Сельскохозяйственная биология. – 1996. – №. 5. – С. 28.
- Ухатова Ю. В.* Совершенствование методов криоконсервации и оздоровления от вирусных болезней образцов вегетативно размножаемых культур :дис. – –СПб.: ВИР.–2017.–137 с, 2017.
- Холодова В.П.* Рост и метаболизм углеводов в культуре ткани растений. Культура клеток растений М., 1981.
- Agakhanov M. M., Volkov V. A., Potokina E. K.* Genetic structure of the ampelographic collection maintained in the Dagestan experimental station of VIR revealed by microsatellite analysis //Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology. – 2019. – Т. 24. – С. 42.
- Bi W. L. et al.* Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.)—a review //In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2017. – Т. 53. – №. 5. – С. 449-460.
- Engelbrecht D.J., Schwerdtfeger U.* In vitro grafting of grapevine shoot apices as an aid to the recovery of virus-free clones // Phytolactica. – 1979. – U 11. – P. 183-185.
- Everent N.P., Wang T.L. Street H.E.* Hormone regulation of cell growth and development in vitro // Trontiers of Plant Tissue Culture / University of Calgary. – 1978. – P. 307-316.
- Garre M., Martin-Tanguy J., Mussillon P.* La cultur de meristemes et la multilplication Végétative in Vitro au service de la pepiniere // Bulletin Petits Fruit. – 1979. – U 14. – P. 7-65
- Akkaya M. S., Bhagwat A. A., Cregan P. B.* Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean // Genetics, 1992, vol. 132. pp.1131–1139.
- Bowers J. E., Dangl G. S., Meredith C. P.* Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape //American Journal of Enology and Viticulture, 1999, vol. 50,no. 3. pp. 243–246.
- Dokupilová I., Šturdíka E., Mihálik D.* Characterization of vine varieties by SSR markers // Acta Chimica Slovaca, 2013, vol. 6, no. 2, pp. 227–234.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J.* Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study // Mol. Ecol., 2005, vol. 14. pp.2611–2620.
- Guidelines for DNA-Profiling: Molecular Marker Selection and Database Construction* (“BMTGuidelines”)UPOV/INF/17/1. http://www.upov.int/en/publications/information_documents_index.htm

Labra M., Moriondo G., Schneider A., Grassi F., Failla O., Scienza A., Sala F. Biodiversity of grapevines (*Vitis vinifera* L.) grown in the Aosta Valley // *Vitis*, 2002, vol. 41 (2), pp. 89–92.

Moreno-Sanz P., Loureiro M. D., Suárez B. Microsatellite characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic diversity in Asturias (Northern Spain) // *Sci. Hortic.*, 2011, vol. 129, pp. 433–440.

Peakall R. O. D., Smouse P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Molecular ecology notes*. – 2006. – T. 6. – №. 1. – C. 288–295.

Powell W., Machray G. C., Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats // *Trends Plant. Sci.*, 1996, vol. 1, pp. 215–221.

Pritchard J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics*. 2000, vol. 155, pp. 945–959.

Rahimah A. B. et al. Freeze-drying of oil palm (*Elaeis guineensis*) leaf and its effect on the quality of extractable DNA // *J. Oil Palm Res.*, 2006, vol. 18., pp. 296–304.

Röder M. S., Plaschke J., König S. U., Börner A., Sorrells M. E., Tanksley S. D., Ganai M. W. Abundance, variability and chromosome location of microsatellites in wheat // *Mol. Gen. Genet.*, 1995, vol. 246, pp. 327–333.

Thomas M. R., Matsumoto S., Cain P., Scott N. S. Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification // *Theoretical and Applied Genetics*, 1993a, vol. 86, pp. 173–180.

Thomas M. R., Scott N. S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs) // *Theoretical and Applied Genetics*, 1993b, vol. 86, no. 8, pp. 985–990.

Troggio M. et al. A dense single-nucleotide polymorphism based genetic linkage map of grapevine *Vitis vinifera* L. anchoring Pinot Noir bacterial artificial chromosome contig // *Genetics*, 2007, vol. 176, pp. 2637–2650.

Scott, K., Egger, P., Seaton, G. et al. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theor Appl Genet* 100, 723–726 (2000).

J. E. Bowers, G. S. Dangl, R. Vignani, and C. P. Meredith. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*. 39(4): 628–633.

Merdinoglu, D., Butterlin, G., Bevilacqua, L. et al. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. *Mol Breeding* 15, 349–366 (2005).

Di Gaspero, G., Cipriani, G., Marrazzo, M.T. et al. Isolation of (AC)_n-microsatellites in *Vitis vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection. *Mol Breeding* 15, 11–20 (2005).

Antipov D., Hartwick N., Shen M., Raiko M., Lapidus A., Pevzner P. A. Plasmid SPAdes: assembling plasmids from whole genome sequencing data // *Bioinformatics*. – 2016. – T. 32. – №. 22. – C. 3380–3387. doi 10.1093/bioinformatics/btv688

Barker C. L., Donald T., Pauquet J., Ratnaparkhe M. B., Bouquet A., Adam-Blondon A.-F., Thomas M. R., Dry I. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery

mildew resistance gene, Run1, using a bacterial artificial chromosome library //Theoretical and applied genetics. – 2005. – T. 111. – №. 2. – C. 370-377. doi.org/10.1007/s00122-005-2030-8

Canaguier A., Grimplet J., Di Gaspero G., Scalabrin S., Duchêne E., Choisne N., Mohellibi N., Guichard C., Rombauts S., Le Clainche I., Bérard A., Chauveau A., Bounon R., Rustenholz C., Morgante M., Le Paslier M.-C., Brunel D., Adam-Blondon A.-F. A new version of the grapevine reference genome assembly (12X.v2) and of its annotation (VCost.v3) //Genomics data. – 2017. – T. 14. – C. 56. doi 10.1016/j.gdata.2017.09.002

Cochetel N., Minio A., Massonnet M., Vondras A., Figueroa-Balderas R., Cantu D. Diploid chromosome-scale assembly of the *Muscadinia rotundifolia* genome supports chromosome fusion and disease resistance gene expansion during *Vitis* and *Muscadinia* divergence //G3. – 2021. – T. 11. – №. 4. – C. jkab033. doi.org/10.1093/g3journal/jkab033

De Coster W., D'Hert S., Schultz D. T., Cruts M., Van Broeckhoven Ch. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data //Bioinformatics. – 2018. – T. 34. – №. 15. – C. 2666-2669. doi 10.1093/bioinformatics/bty149

De Maio N., Shaw L. P., Hubbard A., George S., Sanderson N. D., Swann J., Wick R., AbuOun M., Stubberfield E., Hoosdally S. J., Crook D. W., Peto T.E., Sheppard A. E., Bailey M. J., Read D. S., Anjum M. F., Walker A. S., Stoesser N. Comparison of long-read sequencing technologies in the hybrid assembly of complex bacterial genomes //Microbial genomics. – 2019. – T. 5. – №. 9. doi 10.1099/mgen.0.000294

Ewing B., Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities //Genomeresearch. – 1998. – T. 8. – №. 3. – C. 186-194. doi:10.1101/gr.8.3.186

Grigoreva E., Ulianich P., Ben C., Gentzbittel L., Potokina E. First Insights into the Guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) Genome of the 'Vavilovskij 130' Accession, Using Second and Third-Generation Sequencing Technologies //Russian Journal of Genetics. – 2019. – T. 55. – №. 11. – C. 1406-1416. doi 10.1134/S102279541911005X

Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies //Bioinformatics. – 2013. – T. 29. – №. 8. – C. 1072-1075. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086

Leger A., Leonardi T. PycoQC, interactive quality control for Oxford Nanopore Sequencing //Journal of Open Source Software. – 2019. – T. 4. – №. 34. – C. 1236. DOI: 10.21105/joss.01236

Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences //Bioinformatics. – 2018. – T. 34. – №. 18. – C. 3094-3100. doi 10.1093/bioinformatics/bty191

Li H. Minimap and miniasm: fast mapping and denovo assembly for noisy long sequences //Bioinformatics. – 2016. – T. 32. – №. 14. – C. 2103-2110. doi 10.1093/bioinformatics/btw152

Loman N. J., Quinlan A. R. Poretools: a toolkit for analyzing nanopore sequence data //Bioinformatics. – 2014. – T. 30. – №. 23. – C. 3399-3401. doi 10.1093/bioinformatics/btu555

- Seppy M., Manni M., Zdobnov E. M.* BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness //Gene Prediction. – Humana, New York, NY, 2019. – С. 227-245. doi 10.1007/978-1-4939-9173-0_14
- Simao F. A., Waterhouse R. M., Ioannidis P., Kriventseva E. V., Zdobnov E. M.* BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs //Bioinformatics. – 2015. – Т. 31. – №. 19. – С. 3210-3212. doi 10.1093/bioinformatics/btv351
- Stanke M., Keller O., Gunduz I., Hayes A., Waack S., Morgenstern B.* AUGUSTUS: ab initio prediction of alternative transcripts //Nucleic acids research. – 2006. – Т. 34. – №. suppl_2. – С. W435-W439. doi 10.1093/nar/gkl200
- Tarailo-Graovac M., Chen N.* Using Repeat Masker to identify repetitive elements in genomic sequences //Current protocols in bioinformatics. – 2009. – Т. 25. – №. 1. – С. 4.10. 1-4.10. 14. doi 10.1002/0471250953.bi0410s25
- Vaser R., Sović I., Nagarajan N., Šikić M.* Fast and accurate denovo genome assembly from long uncorrected reads //Genome research. – 2017. – Т. 27. – №. 5. – С. 737-746. doi 10.1101/gr.214270.116
- Volynkin V. A., Zlenko V. A., Polulyakh A. A., Oleinikov N. P., Likhovskoy V. V.* Results of experimental studies of the formation of genetic diversity in the vitaceae grape family in the process of natural evolution// Viticulture and winemaking. – 2010. – Т. 40. – С. 12-16. [in Russian] (Волынкин В. А. и др. Результаты экспериментальных исследований формирования генетического разнообразия у семейства винограда Vitaceae в процессе естественной эволюции //Виноградарство и виноделие. – 2010. – Т. 40. – С. 12-16).
- Walker B. J., Abeel Th., Shea T., Priest M., Abouelliel A., Sakthikumar Sh., Cuomo Ch. A., Zeng Q., Wortman J., Young S. K., Earl A. M.* Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement //PloS one. – 2014. – Т. 9. – №. 11. – С. e112963. doi 10.1371/journal.pone.0112963
- Wick R. R., Judd L. M., Holt K. E.* Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing //Genome biology. – 2019. – Т. 20. – №. 1. – С. 129. doi 10.1186/s13059-019-1727-y
- Zini E., Dolzani Ch., Stefanini M., Gratl V., Bettinelli P., Nicolini D., Betta G., Dorigatti C., Velasco R., Letschka Th., Vezzulli S.* R-Loci arrangement versus downy and powdery mildew resistance level: a Vitis Hybrid Survey //International journal of molecular sciences. – 2019. – Т. 20. – №. 14. – С. 3526. doi.org/10.3390/ijms20143526
- Basecalling. Available from: <https://denbi-nanopore-training-course.readthedocs.io/en/latest/basecalling/index.html> [accessed 2019].
- Vitis rotundifolia* Michx. whole genome sequencing and assembly using nanopore technology (Oxford Nanopore Technologies). Russian Federation; Accession: PRJNA649974. ID: 649974; Registration date: 10-Nov-2020. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA649974>

В журналах ВАК:

1. **АГАХАНОВ М.М.,** ВОЛКОВ В.А., УЛЬЯНИЧ П.С., АБДУЛЛАЕВ К.М., КИСЛИН Е.Н. Полиморфизм микросателлитных локусов в коллекции винограда дагестанского филиала ВИР //Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2019 – Т. 179 – №. 3 – С. 224-234. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2018-3-224-234>
2. ВОЛКОВ ВЛАДИМИР АЛЕКСАНДРОВИЧ, ГРИГОРЬЕВА ЕЛИЗАВЕТА АЛЕКСАНДРОВНА, **АГАХАНОВ МАГАМЕДГУСЕЙН МАГАМЕДГАНИФОВИЧ** ВОЗМОЖНОСТИ ТЕХНОЛОГИЙ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕТИЛОМА ВИНОГРАДА//Наука и практика 2020», посвященной 100-летию П.Я. Голодриги. -2020. –С24-26
3. **Агаханов М.М.,** Ульянич П.С. К вопросу о полногеномном секвенировании иммунного к грибным заболеваниям вида *Vitis rotundifolia* Michx //Наука и практика 2020», посвященной 100-летию П.Я. Голодриги. -2020. –С18-20
4. **АГАХАНОВ М. М.,** ГРИГОРЬЕВА Е. А., ПОТОКИНА Е. К., УЛЬЯНИЧ П. С., УХАТОВА Ю. В. Сборка генома *Vitis rotundifolia* Michx. с использованием методов секвенирования третьего поколения (Oxford Nanopore Technologies) //Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2021. DOI: 10.30901/2227-8834-2021-2-1-9

В других изданиях:

2. Григорьева Е. А., **Агаханов М.М.,** Александрова И.В., Волков В.А. Полногеномное секвенирование природных и дикорастущих форм винограда (*Vitis vinifera* L.). Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;5(1):13-18 DOI 10.18699/Letters2019-5-2

СПИСОК НАУЧНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ, НА КОТОРЫХ ДОКЛАДЫВАЛИСЬ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

- 1.**Агаханов М.М.,** Волков В.В., Кислин Е.Н. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА АМПЕЛОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ ДАГЕСТАНСКОЙ ОПЫТНОЙ СТАНЦИИ ВИР ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА // VII СЪЕЗД ВАВИЛОВСКОГО ОБЩЕСТВА ГЕНЕТИКОВ И СЕЛЕКЦИОНЕРОВ, ПОСВЯЩЕННЫЙ 100-ЛЕТИЮ КАФЕДРЫ ГЕНЕТИКИ СПБГУ, И АССОЦИИРОВАННЫЕ СИМПОЗИУМЫ Санкт-Петербург, 18–22 июня 2019 года
- 2.**Агаханов М.М.,** Ухатова Ю.В. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА ПРИ ВВЕДЕНИИ ВИНОГРАДА В КУЛЬТУРУ IN VITRO // МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ "125 ЛЕТ ПРИКЛАДНОЙ БОТАНИКИ В РОССИИ" Санкт-Петербург, 25–28 ноября 2019 года
3. AGAKHANOV M.M., VOLKOV V.A., POTOIKINA E.K. GENETIC STRUCTURE OF THE AMPELOGRAPHIC COLLECTION MAINTAINED IN THE DAGESTAN EXPERIMENTAL

STATION OF VIR REVEALED BY MICROSATELLITE ANALYSIS // PLANT GENETICS, GENOMICS, BIOINFORMATICS, AND BIOTECHNOLOGY (PLANTGEN2019) Novosibirsk, 24–29 июня 2019 года

4. **АГАХАНОВ М.М.**, УЛЬЯНИЧ П.С. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ SSR-МАРКЕРОВ В СИСТЕМАТИКЕ И ФИЛОГЕНИИ РОДА VITIS L. // БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ, ЖИВОТНОВОДСТВЕ И СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ Москва, 15–16 апреля 2019 года

5. ВОЛКОВ В.А., ГРИГОРЬЕВА Е.А., **АГАХАНОВ М.М.**, УЛЬЯНИЧ П.С., ПОТОКИНА Е.К. ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ВИНОГРАДА НА ПЛАТФОРМЕ MINION И ПОИСК CRG-САЙТОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ // МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ "125 ЛЕТ ПРИКЛАДНОЙ БОТАНИКИ В РОССИИ" Санкт-Петербург, 25–28 ноября 2019 года

6. **АГАХАНОВ М.М.**, УЛЬЯНИЧ П.С., ПОТОКИНА Е.К., ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ КОЛЛЕКЦИИ ВИНОГРАДА ДАГЕСТАНСКОГО ФИЛИАЛА ВИР ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА // МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ "125 ЛЕТ ПРИКЛАДНОЙ БОТАНИКИ В РОССИИ" Санкт-Петербург, 25–28 ноября 2019 года

7. ВОЛКОВ В.А., ГРИГОРЬЕВА Е.А., **АГАХАНОВ М.М.** ВОЗМОЖНОСТИ ТЕХНОЛОГИЙ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕТИЛОМА ВИНОГРАДА // Международной научно-практической конференции «Магарач». Наука и практика 2020», посвященной 100-летию П.Я. Голодриги, которая состоится 26-30 октября 2020 г.

8. **АГАХАНОВ М.М.**, УЛЬЯНИЧ П.С. К ВОПРОСУ О ПОЛНОГЕНОМНОМ СЕКВЕНИРОВАНИИ ИММУННОГО К ГРИБНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ ВИДА VITIS ROTUNDIFOLIA MICNХ. // Международной научно-практической конференции «Магарач». Наука и практика 2020», посвященной 100-летию П.Я. Голодриги, которая состоится 26-30 октября 2020 г.

9. **АГАХАНОВ М.М.**, УЛЬЯНИЧ П.С., НОСУЛЬЧАК В.А., УХАТОВА Ю.В. К ВОПРОСУ О ПОЛНОГЕНОМНОМ СЕКВЕНИРОВАНИИ ИММУННОГО К ГРИБНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ ВИДА VITIS ROTUNDIFOLIA MICNAUX // СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОИНФОРМАТИКА Ялта, Севастополь, 14–20 сентября 2020 года

10. **Агаханов М.М.**, Ульянич П.С. СОЗДАНИЕ КАРТИРУЮЩИХ ПОПУЛЯЦИЙ ВИНОГРАДА ГИБРИДОВ F1 (VITIS VINIFERA L.) // I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Геномика и современные биотехнологии в размножении, селекции и сохранении растений» (GenBio 2020) г. Ялта, Республика Крым, Россия 27 – 31 октября 2020 г