

На правах рукописи

Агаханов

Магамедгусейн Магамедганифович

**«Генетическое разнообразие и селекционная ценность
образцов ампелографической коллекции ВИР»**

Специальность: 06.01.05 – Селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений

Диссертация

**на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Санкт-Петербург

2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СОКРАЩЕНИЯ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Ботаническая классификация винограда	10
1.2. Генетическое разнообразие образцов винограда в коллекциях России и мира.....	13
1.2.1. История и современное состояние ампелографической коллекции винограда ВИР	16
1.3 Наиболее распространенные болезни винограда.....	23
1.3.1. Милдью= ложная мучнистая роса (ЛМР) =Downy Mildew (DM)	23
1.3.2. Оидиум=настоящая мучнистая роса (МР)= Powdery Mildew (PM).....	27
1.3.3. Виноградная филлоксера= <i>Daktulosphaira vitifoliae</i> (DV).....	30
1.4 Молекулярные методы в изучении винограда	34
1.4.1 Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP)	36
1.4.2 Случайно амплифицированные полиморфные фрагменты ДНК (RAPD).....	37
1.4.3 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	37
1.4.4 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)	38
1.4.5 SSR-маркеры (Simple-sequence Repeats)	39
1.4.6 Полногеномный анализ <i>de novo</i>	40
1.5. Сохранение образцов винограда в дублетных коллекциях	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	47
2.1 Материал исследований	47
2.2 Фенологические наблюдения образцов винограда.....	47
2.3 Оценка образцов коллекции по устойчивости к грибным заболеваниям.....	47
2.4. Получение и описание гибридов	48
2.5 Молекулярно-генетические исследования	49
2.5.1 Генотипирование образцов <i>V. vinifera</i>	49
2.5.1.1 Выделение ДНК.....	50
2.5.1.2 Постановка ПЦР	51
2.5.1.3 Проведение электрофореза в агарозном геле	54
2.5.1.4 Анализ размеров амплифицированных фрагментов	54
2.5.2 Полногеномное секвенирование с использованием нанопорового секвенатора MinION (Oxford Nanopore Technologies)	55
2.5.2.1 Выделение ДНК для полногеномного секвенирования. Проверка качества и концентраций выделенной ДНК.....	56
2.5.2.2 Подготовка библиотек для секвенирования на платформе MinION.....	56
2.5.2.3 Процедура секвенирования на MinION и биоинформатическая обработка данных.....	56

2.5.2.4 Полногеномная сборка образца вида <i>V. rotundifolia</i> – сорта ‘Dixie’ – методом <i>de novo</i> для данных ONT и сборка гибридным методом	57
2.5.2.5 Оценка качества полногеномной сборки <i>V. rotundifolia</i>	59
2.5.2.6. Молекулярно-генетический анализ гибридов	60
2.6 Изучение винограда в культуре <i>in vitro</i>	60
2.7 Статистическая обработка результатов	62
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	63
3.1 Фенологические исследования	63
3.2 Оценка устойчивости к болезням	64
3.3 Описание гибридных популяций	74
3.4 Результаты изучения генетического разнообразия коллекции винограда	82
3.5 Полногеномное секвенирование <i>V. rotundifolia</i> (сорт ‘Dixie’)	88
3.6 Влияние фитогормонов при введении в культуру <i>in vitro</i> винограда	99
Заключение	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	106
Приложение 1 – Характеристика изученного материала	139
Приложение 2 – Крупнейшие держатели коллекций генофонда винограда в мире	143
Приложение 3 – Характеристики групп образцов различного происхождения, баллы	145
Приложение 4 – Устойчивость гибридов F ₁ к грибным заболеваниям	146
Приложение 5 – Различия между сборкой генома <i>V. rotundifolia</i> и <i>V. vinifera</i> на хромосоме 12	149
Приложение 6 – Характеристика сортов по хозяйственно-ценным признакам и вегетационному периоду на фоне погодных условий	150
Приложение 7 – Пошаговый протокол выделения ДНК и сборки библиотеки	156

СОКРАЩЕНИЯ

- БАП – 6-бензиламинопурин
- ГК – гиббереллиновая кислота
- ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДНК-маркеры – молекулярно-генетические маркеры
- ИМК – индолил-3-масляная кислота
- ЛМР – ложная мучнистая роса
- НУК – альфа-нафтилуксусная кислота
- ПЦР – полимеразно-цепная реакция
- СД-450 – стандартный размерный
- AFLP – полиморфизм длин амплифицированных фрагментов
- AGBT – Достижения в области биологии и технологии генома
- BUSCO – Сравнительный анализ результатов универсальных однокопийных ортологов
- dNTP – дезоксинуклеозид трифосфат
- DV – виноградная филлоксеры
- ENA – Европейский архив последовательностей секвенирования
- ETI – эффекторно-триггерный иммунитет
- IPM – интегрированная борьба с вредителями
- ISSR – межмикросателлитные последовательности
- LRR – повторы богатые лейцином
- MS-ISSR – чувствительные к метилированию межмикросателлитные последовательности
- NB-LRR* – семейство генов *R*
- NBS – сайт связывания нуклеотидов
- NGS – секвенирование нового поколения
- ONT – нанопоровое секвенирование
- PCD – апоптоз (запрограммированная гибель клеток)
- PIC – коэффициент полиморфизма
- PM – настоящая мучнистая роса
- PVP – Поливинилпирролидон
- RAPD – случайно амплифицированные полиморфные фрагменты
- RFLP – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
- SMRT, ONT – секвенирование единичных молекул в реальном времени
- SNP – однонуклеотидный полиморфизм
- SRA – Архив последовательностей секвенирования

SSR – микросателлитные маркеры

Toll/интерлейкина-1 – внутриклеточный сигнальный домен

VIVC – Международный каталог сортов *Vitis*

WGS – полногеномное секвенирование

Научные организации

ВАСХНИЛ – Всесоюзная академия сельскохозяйственных наук имени Ленина

ВИР – ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова», Санкт Петербург, Россия

ВНИИВиВ Магарац – ФГБНУ «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «МАГАРАЧ» РАН», Ялта, Россия

ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия имени Я. И. Потапенко», Новочеркасск, Россия

ДагСОСиО – Дагестанская селекционная опытная станция виноградарства и овощеводства, Дагестан, Россия

ДОС ВИР – Дагестанская опытная станция – филиал ВИР

ДВОС ВИР – Дальневосточная опытная станция – филиал ВИР

КрОСС ВИР – Крымская опытно-селекционная станция – филиал ВИР

СКФНЦСВВ – ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства и виноделия», Краснодар, Россия

ТОС ВИР – Туркменская опытная станция ВИР

ФАО – Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН

CREA – Совет по исследованиям в области сельского хозяйства и анализу сельскохозяйственной экономики

IASMA – Аграрный институт Сан-Микеле-аль'Адидже, Италия

IPGRI – Международный институт генетических ресурсов растений, Италия

NAGREF – Национальный фонд сельскохозяйственных исследований, Греция

NCBI – Национальный центр биотехнологической информации, США

OIV, MOVB – Международная организация винограда и вина

USDA-ARS – Служба сельскохозяйственных исследований США

UPOV – Международный союз по защите достижений растениеводства

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Виноград является одной из экономически важных сельскохозяйственных культур, площадь его возделывания составляет более 7,2 млн га, а по общему производству виноград занимает третье место среди плодовых культур (ФАО, 2019). В декабре 2019 г. принят Федеральный Закон №468 «О виноградарстве и виноделии в Российской Федерации», направленный на повышение качества продукции виноградарства и продукции виноделия, производство и оборот которых осуществляются на территории Российской Федерации (статья 4, п. 2.2). В этой связи получение высококачественного посадочного материала и создание нового исходного материала с комплексом хозяйственно-ценных признаков является крайне актуальной и необходимой для выполнения задач для дальнейшего развития селекции культуры.

В ботаническом отношении согласно А.М. Негрулю (Негруль, 1979) род *Vitis* L. делится на два подрода: *Euvitis* Planch. и *Muscadinia* Planch. Большинство коммерческих сортов созданы на основе полиморфного восприимчивого к болезням европейско-азиатского вида *V. vinifera* L. Однако для селекции большой интерес представляют устойчивые к фитопатогенам представители подрода *Euvitis*, включающего 28 американских видов, 39 восточно-азиатских видов и один европейско-азиатский вид *Vitis vinifera* L. (Zecca et al., 2012), а также входящий в состав подрода *Muscadinia* устойчивый к грибным заболеваниям вид *V. rotundifolia* Michx. (Лиховской, 2018; Волынкин, 2021).

Известно, что виноград поражают более 80 фитопатогенов (Porotikova et al., 2021), включая вирусы, грибы и бактерии (Pearson, Goheen, 1988; Carisse, 2016; Calonnec et al., 2016; Лиховской, 2018). Однако, наибольшие потери урожая вызывают милдью (ложная мучнистая роса, возбудитель *Plasmopara viticola* Berl. et de Toni.) – до 100 % и оидиум (мучнистая роса, возбудитель *Uncinula necator* Burill.) – до 65 % (Thind et al., 2014). Поэтому современная селекция ставит задачи по поиску и подбору генотипов, которые могут быть использованы в качестве доноров устойчивости к данным заболеваниям (Töpfer et al., 2011).

Ампелографическая коллекция ВИР насчитывает 1247 образцов, собранных со всего мира (Kislin et al., 2015). Её изучение и поддержание открывает возможности выполнения поставленных задач в рамках доктрины обеспечения продовольственной безопасности Российской Федерации (Указ Президента Российской Федерации от 21 января 2020 г. №20).

Цель работы:

Изучение и анализ генетического разнообразия коллекции генетических ресурсов винограда ВИР для последующего использования идентифицированного генофонда в селекции.

Задачи работы:

1. проведение фенологических наблюдений за образцами ампелографической коллекции ВИР, сохраняемой в условиях Дагестанской опытной станции – филиала ВИР (далее – ДОС ВИР);
2. выявление источников устойчивости к грибным заболеваниям винограда, среди образцов ампелографической коллекции сохраняемой в условиях ДОС ВИР;
3. проведение скрещиваний с участием выявленных источников устойчивости для получения гибридных популяций как вновь созданного материала для исследований;
4. анализ генетического разнообразия образцов коллекции ВИР по результатам генотипирования с использованием SSR-маркеров;
5. секвенирование генома устойчивого к оидиуму и милдью образца вида *V. rotundifolia* – сорта ‘Dixie’;
6. анализ образцов винограда по эффективности введения в культуру *in vitro* и микроразмножения.

Научная новизна

Впервые в условиях Северного Кавказа изучено по биологическим признакам большое разнообразие образцов винограда из коллекции ВИР; выявлен образец винограда, показывающий устойчивость к грибным болезням на высоком инфекционном фоне; получена и с помощью микросателлитных маркеров генотипирована серия гибридов от скрещиваний устойчивых к болезням генотипов; выполнено высокопроизводительное секвенирование и предложен первый вариант сборки генома устойчивого к грибным заболеваниям сорта ‘Dixie’ – образца вида *V. rotundifolia*, оценены по эффективности введения в культуру *in vitro* образцы винограда.

Актуальность исследований и значимость результатов подтверждается поддержкой работ фондом РФФИ (гранты №№ 19-316-90007, 20-316-80059).

Теоретическая и практическая значимость

- В ходе трехлетних полевых наблюдений были генотипированы образцы из ампелографической коллекции ВИР по признакам устойчивости к грибным заболеваниям и фенологическим фазам. Выявлен автохтонный образец, выделившийся по признаку абсолютной устойчивости к грибным заболеваниям на высоком инфекционном фоне ‘Кара яй изюм’. Проведенные с ним скрещивания создали генетический материал для дальнейших исследований генетики признака. Получены перспективные гибриды для использования в селекции.

- Данные о генотипической структуре коллекции винограда ВИР востребованы селекционерами при подборе пар для скрещиваний, а полученные автором гибридные популяции F_1 являются основой для поиска генов-кандидатов хозяйственно ценных признаков, в том числе – устойчивости к болезням.
- Важное теоретическое значение имеют представленные в работе результаты секвенирования генома образца вида *V. rotundifolia*. Созданный в ходе исследования и депонированный в биоинформатическую базу данных NCBI вариант сборки генома образца ‘Dixie’ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/649974>) служит для исследователей надежным инструментом при идентификации генов устойчивости, а также поиске интрогрессированных фрагментов в геномах отдаленных гибридов.
- Проведенный анализ генотипов винограда по способности к микроразмножению и культивирования *in vitro* выявил наиболее перспективные образцы для ускоренного микроклонального размножения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Высокий уровень аллельного разнообразия поддерживаемой в условиях ДОС ВИР коллекции винограда ВИР, выявленный при помощи микросателлитного анализа (PIC варьируется от 0,61 до 0,81), свидетельствует о богатом потенциале коллекции в виде источников генетического разнообразия для селекционных программ.
2. Коллекция винограда ВИР, поддерживаемая в условиях ДОС ВИР, отличается разнообразием потенциальных источников для селекции сортов с разными сроками созревания – от сверхранних до очень поздних.
3. Сорты винограда ‘Кара яй изюм’, ‘Виерул-59’, ‘Шоколадный’, ‘Грочанка’, ‘Ливадийский черный’, ‘Слава Дербента’, ‘Йорк Мадера’, ‘Варюшкин’, ‘Дунаевски лазур’ из коллекции ВИР могут использоваться как источники устойчивости к грибным заболеваниям.

Апробация результатов работы на международных и всероссийских конференциях: VII Съезде ВОГИС, посвященном 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы (Санкт-Петербург, 2019); Международной конференции «125 лет прикладной ботаники в России» (Санкт-Петербург, 2019); Международной конференции «Plant genetics, genomics, bioinformatics, and biotechnology» (Новосибирск, 2019); XIX Всероссийской научной конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (Москва, 2019); 12-ой Международной школе молодых ученых «Системная Биология и Биоинформатика» (Севастополь, 2020); Международной научно-

практической конференции «Магарач» (Ялта, 2020); XI международном форуме «Дни сада в Бирюлево: достижения науки в реализации доктрины продовольственной безопасности», (Москва, 2021); III Международном биотехнологическом симпозиуме «БИО-АЗИЯ АЛТАЙ 2021» (Барнаул, 2021); 64-ой Всероссийской научной конференции МФТИ «Биологическая и медицинская физика» (Москва, 2021).

Личный вклад автора. Основные результаты, изложенные в диссертации, получены автором самостоятельно. Автор лично осуществлял анализ литературных данных по теме работы, планирование экспериментов, проведение лабораторных исследований, обработку экспериментальных данных, подготовку статей и докладов на конференциях. Полевые опыты проводили совместно с сотрудниками Крымской ОСС и Дагестанской ОС – филиалов ВИР.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 5 статей, 2 из которых опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, а также 9 тезисов.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение и приложения. Работа изложена на 160 стр., содержит 23 таблицы, 32 рисунка и 7 приложений. Список литературы включает 367 наименования, из них 303 на иностранных языках, 7 электронных ресурсов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ботаническая классификация винограда

Изучение диких родичей винограда, составляющих ботаническое семейство *Vitaceae* L., приобретает в свете последних достижений генетики и селекции огромный практический интерес для улучшения существующих сортов. Ботаническое семейство *Vitaceae* (виноградные) насчитывает около 950 видов, принадлежащие к 16 родам (Süssenguth, 1953; Wen, 2007b). Род *Vitis* известен своими хозяйственно-ценными признаками (Wen, 2007; Gerrath et al., 2015; Wen et al., 2018), он включает в себя более 70 видов, входящих в состав двух подродов – *Euvitis* и *Muscadinia* (Негруль, 1979).

68 видов подрода *Euvitis* имеют диплоидный набор ($2n=19$) хромосом (Wen, 2007; Chen et al., 2007; Moore, Wen, 2016; Gerrath et al., 2017) и разделяются на 3 группы по эколого-географическому происхождению:

– восточно-азиатская группа (включает 39 видов, большинство из которых отличается повышенной морозоустойчивостью, особенно вид *Vitis amurensis* Rupr., и резистентностью к грибным заболеваниям);

– американская группа (включает 28 видов, некоторые из них имеют практическое значение благодаря повышенной резистентности к вредителям, болезням и морозоустойчивости, например, *Vitis riparia* Michx., *Vitis rupestris* Sheel., *Vitis berlandieri* Planc., *Vitis labrusca* L.);

– европейско-азиатская группа – включает один вид *V. vinifera* L., который делится на два подвида: дикий виноград subsp. *silvestris* Gmel. и культурный виноград subsp. *sativa* D.C. (Wen et al., 2018; Ампелография, 1946; Лиховской, 2018).

Виноград культурный включает много культивируемых сортов, характеризуется полиморфностью листа, грозди и ягод. Кроме того, *V. vinifera* не устойчив к грибным болезням, низким температурам и вредителям, но иногда встречаются сорта, показывающие относительную устойчивость на высоком инфекционном фоне. Плоды не имеют посторонних привкусов и по соотношению содержания сахара и кислотности, вкусу более пригодны для столового потребления и технической переработки. Все сорта вида *V. vinifera* согласно классификации Негруля (1979) разбиваются на 3 эколого-географические группы: восточная, группа бассейна Черного моря и западно-европейская группа сортов.

Подрод *Muscadinia* состоит из трех видов:

– *V. rotundifolia*, распространенный на юго-востоке США,

– *V. munsoniana*, полутропический вариант *V. rotundifolia*, произрастающий в южной Флориде,

– *Vitis popenoei*, тропический, произрастающий в южной Флориде (Fenall 1940; Conner, MacLean, 2013).

Виды подрода *Muscadinia* имеют диплоидный набор хромосом ($2n=20$), простые усики, более крупные плоды и семена с более длинными вентральными складками, чем у остальных видов *Vitis* (Chen, Manchester, 2011; Moore, Wen, 2016).

В отличие от других видов представители североамериканского вида *V. rotundifolia* являются уникальным источником генов устойчивости к грибным заболеваниям и к повреждению вредителями. Однако использовать этот ценный источник генов устойчивости в селекции европейских сортов винограда затруднительно (Агаханов и др., 2021).

Если виды подрода *Euvitis* Planch легко скрещиваются между собой, то получить гибриды между *V. vinifera* (подрод *Euvitis*, 38 хромосом) и *V. rotundifolia* (подрод *Muscadinia*, 40 хромосом) ранее удавалось с большим трудом, при этом гибридные сеянцы становились фертильными только после их полиплоидизации (Волинкин и др., 2010). Возможность получения отдалённых гибридов между культурным виноградом и дикорастущим носителем генов иммунитета *V. rotundifolia* вызывает большой интерес, однако во всех ранее проведенных опытах наблюдали генетическую несовместимость, не позволяющую получить потомство (Patel, Olmo, 1995). Тем не менее, принципиальная возможность получения таких гибридов была доказана ранее (Patel, Olmo, 1995). Длительный период времени в результате отдаленной гибридизации с этими видами фертильные потомства не были получены. Так, в начале XX века в США был выведен первый плодоносящий отдаленный гибрид F_1 от скрещивания *V. vinifera* ($2n=38$) с *V. rotundifolia* ($2n=40$), который был назван F_1 (N.C. 6-15) и имел $2n=39$ (Dunstan, 1962). В 1962 году Dunstan, скрещивая сеянцы формы N.C. 6-15 с видом *V. vinifera*, получил гибрид F_2 , названный DRX-55, что означает: Dunstan; *Rotundifolia*; номер скрещивания. По внешним признакам гибрид DRX-55 отличается силой роста и представляет собой мощное растение. По количеству хромосом гибрид DRX-55 идентифицирован (определен) как диплоидно-аллотетраплоидная цитохимера. В дальнейшем селекционер R.T. Dunstan получил формы DRX 58-5 и DRX 60-24, которые были интродуцированы во Францию. Однако очевидно, что ни созданный ранее селекционный гибридный материал с участием *V. rotundifolia*, ни материал, полученный вновь с целью идентификации генов устойчивости к оидиуму, милдью и филлоксере, не удастся идентифицировать без информации о геноме донора генов устойчивости – представителя вида *V. rotundifolia*.

Коллекционные образцы *V. rotundifolia* содержатся в полевых условиях КрОСС ВИР под кураторством известного ампелографа В.А. Носульчака, который лично интродуцировал в 1992 г. сорт 'Dixie' в коллекцию ВИР, что позволяет не сомневаться в его аутентичности (рис. 1).

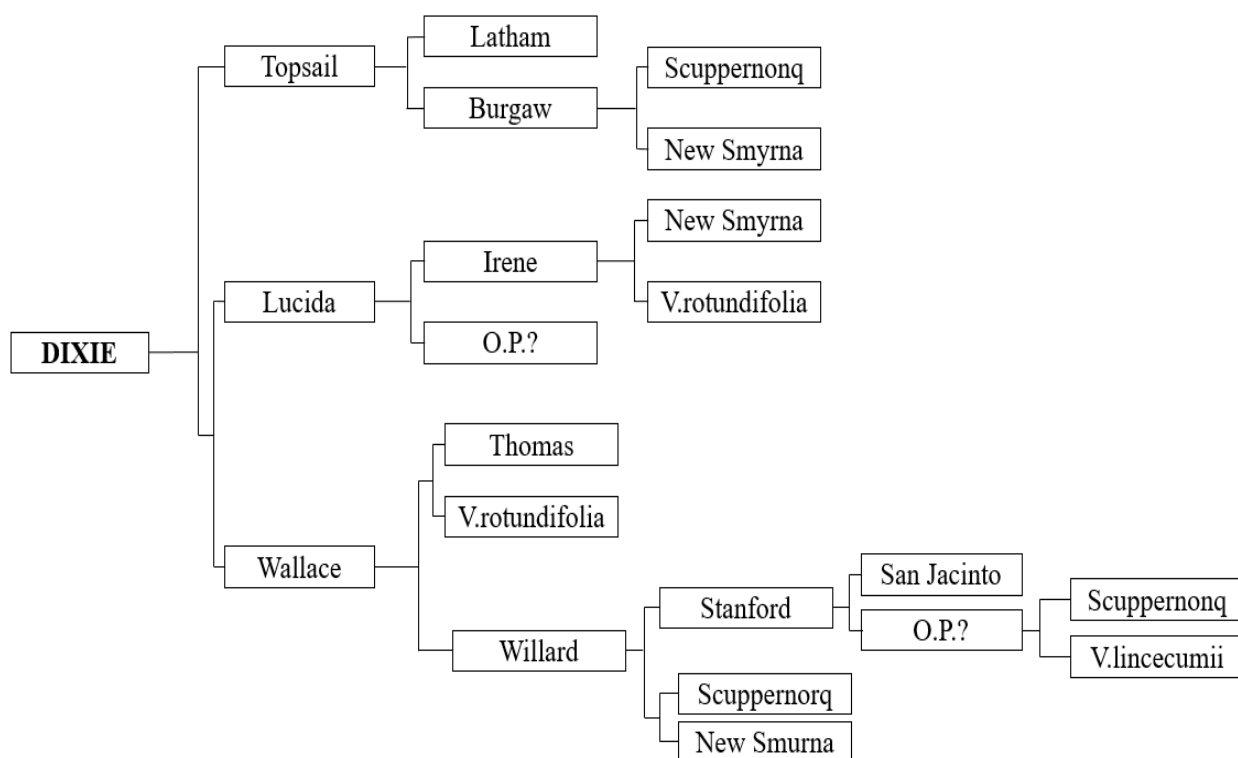


Рисунок 1 – Родословная устойчивого к грибным заболеваниям сорта ‘Dixie’ – образца вида *V. rotundifolia* Michx.

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 КрОСС ВИР, где и были высажены в коллекцию. Согласно составленной нами родословной, в происхождении сорта ‘Dixie’ участвовало 20 сортов *V. rotundifolia*, которые отличаются типом цветка (мужским и женским), окраской (белая, черная), сроками созревания ягод. В настоящее время известно более 80 гибридов и сортов этого вида американского происхождения. Было несколько попыток интродуцировать разнообразные сорта *V. rotundifolia*. В 1999 году по заявке ВИР было получено по 1 черенку 33 сортов винограда данного вида в отдел биотехнологии КрОСС ВИР. Однако, укоренение черенков этих сортов не увенчалось успехом. В отличие от других видов *Vitis*, у представителей *V. rotundifolia* очень низкая (почти нулевая) приживаемость одревесневших черенков. Кроме того, использовать вид *V. rotundifolia* в качестве филлоксероустойчивого подвоя для европейских сортов винограда также невозможно, так как прививки не дают срастания из-за различия в анатомическом строении вторичного луба (Бузин и др., 1937).

Большинство коммерческих сортов винограда относятся к виду *V. vinifera*, и являются восприимчивыми ко многим фитопатогенам. Образцы устойчивого вида *V. rotundifolia* плохо скрещиваются с представителями других видов. Таким образом, важно искать устойчивые формы среди *V. vinifera* и включать их в селекционные программы, а также изучить геном

V. rotundifolia. Также необходимо искать пути преодоления нескрещиваемости либо формы, которые способны хорошо скрещиваться.

1.2. Генетическое разнообразие образцов винограда в коллекциях России и мира

В настоящее время острой проблемой остается совершенствование отечественного виноградарства для создания адаптивных виноградных насаждений, устойчивых к нестабильным погодным условиям и патогенам. Поэтому изучение, сохранение генетических ресурсов с целью их вовлечения в селекционный процесс для решения важнейших народно-хозяйственных задач является актуальной задачей (Конарев и др., 2009).

Прикладное значение коллекции связано с обеспечением фундаментальных исследований, выделением источников ценных признаков для использования в комбинативной селекции в качестве родительских форм, сортов для адаптивного, хозяйственно-биологического испытания и применения в промышленном производстве. Во всем мире (США, Германия, Франция, Китай, Индия, Испания, Италия, Словакия) изучению, сохранению и приумножению генетического потенциала культурных растений уделяется особое внимание (He et al., 2011; Jung, Fischer, 2011; Pospisilova, 2011; Авидзба и др., 2015). Сорта винограда разного эколого-географического происхождения показывают неодинаковый уровень реализации потенциала хозяйственной продуктивности. Наибольший потенциал хозяйственной продуктивности в агроэкологических условиях юга России проявляют автохтонные сорта и сорта местной селекции (Кислин и др., 2015).

В настоящее время в мире насчитывается восемь больших ампелографических коллекций, размещенных в различных научно-исследовательских организациях разных стран мира (рис. 2, приложение 2).

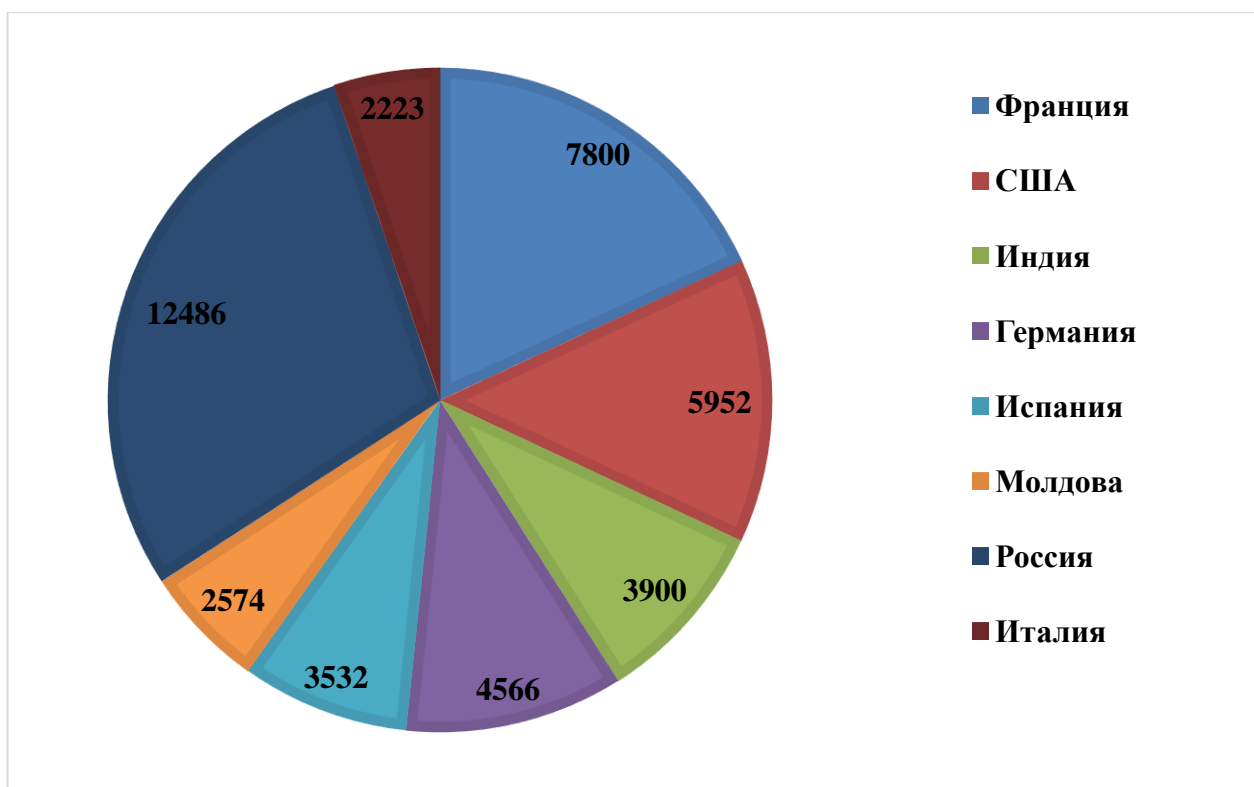


Рисунок 2 – Крупнейшие держатели коллекций генофонда винограда в мире на 2022 год (более подробная информация в приложении 2). Примечание: Франция – INRA, Montpellier (7800), США – Agrarian University of Florida (5952), Индия – Agrarian Institute, Bangalore (3900), Германия – Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof (4566), Испания – IMIDRA (3532), Молдова – Institut National de la Vigne et du Vin (2574), Россия – 12486 (СКФНЦСВВ, ВНИИВиВ Магарач, ВИР им. Н.И. Вавилова, ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко, ДагСОСнО)

В Российскую ампелографическую коллекцию в настоящее время входит 4 больших коллекции – Анапская ампелографическая коллекция, ампелографическая коллекция «Магарач», Донская ампелографическая коллекция им. Я.И. Потапенко, ампелографическая коллекция ВИР; общее количество сортообразцов составляет около 12500 образцов винограда. Самые крупные – Анапская ампелографическая коллекция (входит в состав СКФНЦСВВ) (<https://azosviv.info/>) в которой насчитывается 5001 образец и ампелографическая коллекция «Магарач» – 4620 образцов (Egorov, 2021), что делает их крупнейшими в мире после подобных коллекций Франции, США (рис. 3).

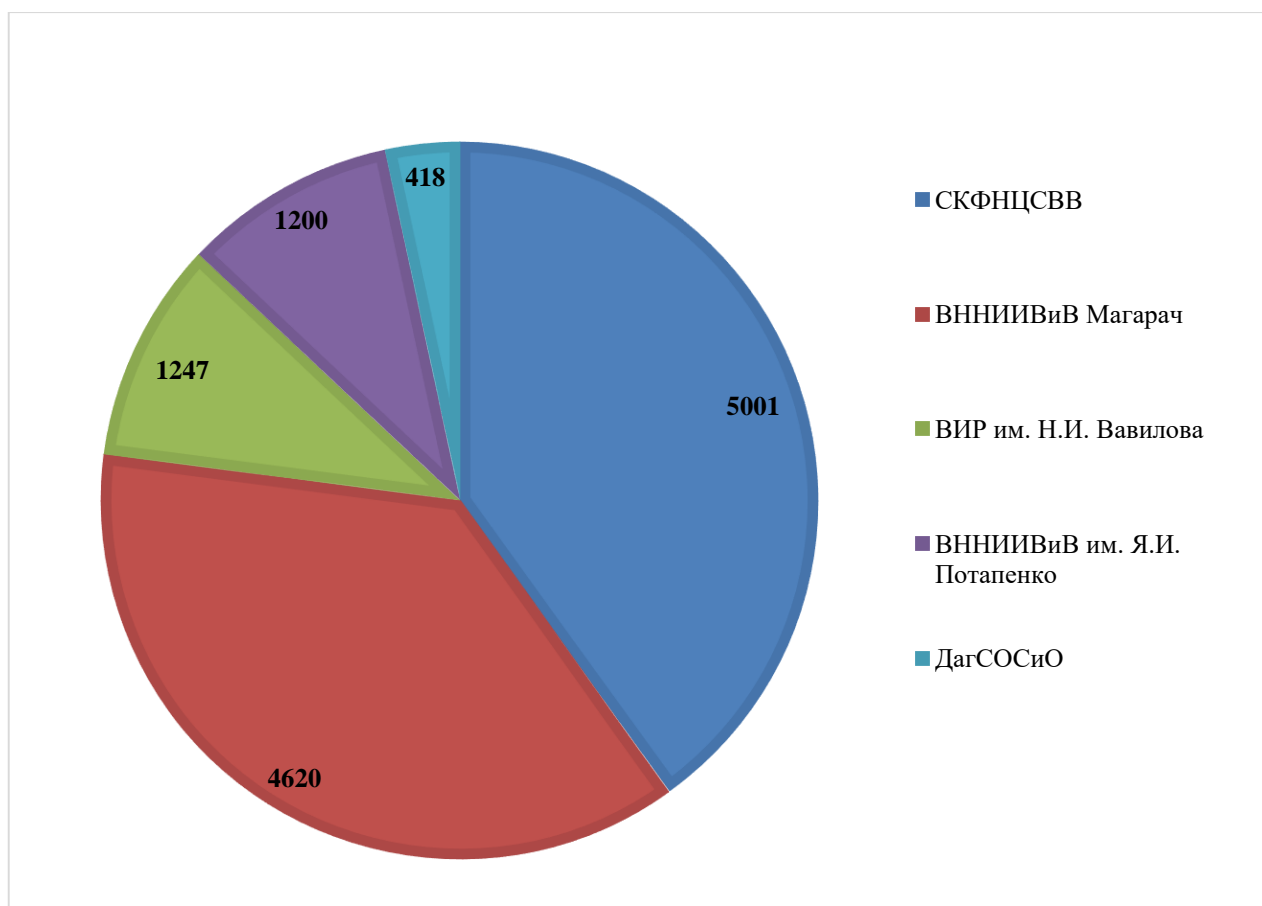


Рисунок 3 – Держатели коллекций винограда в России (более подробная информация в приложении 2). Примечание: СКФНЦСВВ – Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства и виноделия; ВНИИВиВ Магараç – Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «МАГАРАÇ» РАН; ВИР им. Н.И. Вавилова – Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова; ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко – Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия имени Я. И. Потапенко; ДагСОСиО – Дагестанская селекционная опытная станция виноградарства и овощеводства

Образцы винограда в настоящее время активно изучают и включают в селекционные программы как с применением классических методов селекции (Волынкин и др., 2021), так и с использованием современных генетических технологий: от ДНК-паспортизации (Ильницкая, Макарина, 2016) до включения в программы по генетическому редактированию (проект РФФ № 21-66-00012 «Создание с использованием генетических технологий и изучение новых линий растений, адаптированных к меняющимся условиям окружающей среды, обладающих повышенной продуктивностью и диетической ценностью» (<https://www.rscf.ru/project/21-66-00012/>)).

1.2.1. История и современное состояние ампелографической коллекции винограда ВИР

Ампелографическая коллекция ВИР им. Н.И. Вавилова до 1991 года включала 3270 образцов винограда, а после вычета дублетных образцов 2840 генотипов. В бывшем СССР ВИР по количеству и разнообразию сортов и форм винограда не уступал крупнейшим ампелографическим коллекциям Грузии, Крыма, Молдавии, причем отличался размещением ампелографических коллекций в контрастных природно-климатических условиях: Дагестан, Краснодарский край, Приморский край, Туркменистан, Узбекистан, что позволяло более объективно оценивать реакцию генотипов на изменяющиеся условия внешней пока непредсказуемой среды (Савин, 1990; Ампелография, 1984). Самая крупная ампелографическая коллекция была в Среднеазиатском филиале ВИР – 1625 сортов и форм винограда, Туркменская опытная станция ВИР (ТОС ВИР) насчитывала 1040 образцов винограда, ДВОС ВИР – 800 сортов винограда, ДОС ВИР – 450 образцов винограда, КрОСС ВИР – 600 образцов винограда (Кислин и др., 2015).

После распада СССР в системе ВИР им. Н.И. Вавилова, который является официальным держателем и хранителем коллекций мировых генетических ресурсов сельскохозяйственных культур и их диких сородичей, осталось две коллекции винограда – в Южном Дагестане и Приморском крае, поскольку ампелографические коллекции ТОС ВИР и Среднеазиатский филиал ВИР оказались за пределами России. Генофонд винограда на двух опытных станциях ВИР остался на уровне 600 образцов (Кислин и др., 2015).

В 2015 году Крымская ОСС вновь стала структурным подразделением ВИР и по данным 2021 года насчитывает 329 сортов винограда (отчет КрОСС, 2021). В формировании и пополнении ампелографической коллекции КрОСС активное участие принимали научно-исследовательские и образовательные организации России. К примеру, из Анапской зональной опытной станции виноградарства и виноделия, которая входит в состав Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия (СКФНЦСВВ), было получено свыше 300 сортообразцов.

В таблице 2 представлено генетическое разнообразие образцов винограда, которое сохраняется на КрОСС, ДОС, ДВОС станциях ВИР. В настоящее время на 3 станциях сохраняется более 1247 сортов винограда, из них более 50 сортов разных видов, 200 сортов неизвестного происхождения, около 510 межвидовых гибридов и 25 дикорастущих форм (табл. 1). В межвидовой группе наибольшая доля приходится на сорта, полученные с участием *V. vinifera* L. × гибриды ‘Seyve-Villard’, *V. vinifera* × *V. labrusca* L., *V. vinifera* L. × *V. amurensis* Rupr. и *V. vinifera* L. × *V. amurensis* Rupr. × гибриды ‘Seyve-Villard’.

Таблица 1 – Генетическое разнообразие коллекции винограда ВИР (отчет ВИР, 2021)

Виды, генетические группы	Количество образцов					
	Крымская ОСС		Дагестанская ОС		Дальневосточн ая ОС	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Сорта <i>V. vinifera</i>, всего	181	26	218	63	7	3
Местные	56		136		7	
Гибридные	125		82		0	
Сорта других видов <i>Vitis</i>, всего	34	5	7	2	11	5
<i>V. labrusca</i>	32		7		3	
<i>V. rupestris</i>	1		0		0	
<i>V. riparia</i>	1		0		2	
<i>V. amurensis</i>	0		0		6	
Межвидовые сорта, всего	304	44	74	20	131	61
<i>V. vinifera</i> × <i>V. amurensis</i>	37		19		81	
<i>V. vinifera</i> × <i>V. riparia</i>	1		0		2	
<i>V. riparia</i> × <i>V. amurensis</i>	0		0		2	
<i>V. vinifera</i> × <i>V. labrusca</i>	77		4		33	
<i>V. riparia</i> × <i>V. labrusca</i>	2		0		3	
<i>V. vinifera</i> × <i>V. rupestris</i>	2		0		0	
<i>V. vinifera</i> × <i>V. amurensis</i> × <i>V. labrusca</i>	6		3		1	
<i>V. vinifera</i> × <i>V. amurensis</i> × гибриды 'Seyve-Villard' × <i>V. berlandieri</i>	1		0		0	
<i>V. labrusca</i> × <i>V. vinifera</i> × <i>V. riparia</i>	9		0		0	
<i>V. labrusca</i> × <i>V. vinifera</i> × <i>V. lincecumii</i>	1		0		0	
<i>V. vinifera</i> × гибриды 'Seyve-Villard'	118		35		9	
<i>V. vinifera</i> × <i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i>	2		0		0	
<i>V. vinifera</i> × <i>V. amurensis</i> × гибриды 'Seyve-Villard'	42		0		0	
<i>V. labrusca l.</i> × <i>V. vinifera</i> × гибриды 'Seyve-Villard'	4		13		0	
<i>V. labrusca l.</i> × <i>V. vinifera</i> × <i>V. riparia</i> × гибриды 'Seyve-Villard'	1		0		0	
Гибриды 'Seyve-Villard' × <i>V. riparia</i>	1		0		0	
Неизвестного происхождения	169	25	28	8	65	31
Другие образцы (клоновая селекция, гибридные формы, дикорастущие формы и пр.)	0		25	7	0	
Всего:	688	100	345	100	214	100

Сохранение межвидовых гибридов и культурного винограда особенно ценно, т.к. они являются источниками хозяйственно ценных признаков. В частности, межвидовые гибриды и некоторые виды несут гены устойчивости к наиболее опасным вредителям и болезням.

Генотипы, происходящие из Северной Америки (*V. riparia*, *V. rupestris*, *V. aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. cinerea* Engelm, *V. rotundifolia*, *V. labrusca*) и Азии (*V. amurensis*, *V. bashinica* P.C. He, *V. davidii* Foex., *V. liubanensis*, *V. piasezkii* Maxim., *V. romanetii* Rom. Caill.), показывают генетическую устойчивость к оидиуму и милдью (Alleweldt, Possingham, 1988; Wan et al., 2007). В генотипах этих видов винограда были идентифицированы локусы резистентности к патогенам, им были присвоены символы *Run* (устойчивость к *Uncinula necator*), *Ren* (*Erysiphe necator*) и *Rpv* (*Plasmopara viticola*). Поэтому сохранение и изучение американских и азиатских видов имеет особое значение для селекции.

Сорта винограда *V. vinifera* в основном восприимчивы к милдью (Staudt, Kassemeyer, 1995; Cadle-Davidson, 2008), за редким исключением: например, в геноме сорта 'Шардоне' был выявлен локус *Rpv11* (Bellin et al., 2009). Поиск источников устойчивости к данному заболеванию в коллекции ВИР актуален для селекционной работы.

Крымская опытно-селекционная станция – филиал ВИР. На Крымской ОСС за 1991 год по отчетным данным насчитывалось 290 образцов винограда. Состояние коллекции ухудшалось с каждым годом, и к 1994 году количество образцов сократилось до 40%. Было принято решение о раскорчевке коллекции и ее восстановлении в новом современном варианте с ближайшей перспективой (Носульчак и др., 2006; Кислин и др., 2015).

Сложившаяся ситуация с национальным генофондом винограда требовала решительных действий не только по сбору и сохранению имеющихся образцов в России, но и по увеличению их количества и расширению генетического разнообразия. В связи с этим в 1995 году была организована «Проблемная генетико-ампелографическая лаборатория» при Северо-Кавказском зональном НИИ садоводства и виноградарства СКЗНИИСиВ и Анапский опорный пункт ВИРа при Крымской ОСС. В дальнейшем были проведены работы по интродукции образцов винограда с бывших опытных станций ВИР (Узбекистан, Туркменистан) в ныне действующие (Дагестан, Приморский край) (Носульчак др., 2006). В настоящее время (2021 год) на Крымской опытной станции сохраняется 688 образцов, относящиеся к разным эколого-географическим группам (рис. 4). Наибольший интерес для селекции представляют образцы, несущие в своем геноме гены устойчивости к оидиуму и к милдью, интрогрессированные от вида *V. rotundifolia*.



Рисунок 4 – Хранитель коллекции винограда, ведущий научный сотрудник отдела генетических ресурсов и селекции плодово-ягодных культур и винограда Крымской опытно-селекционной станции филиала ВИР, кандидат сельскохозяйственных наук, ампелограф Василий Андрианович Носульчак на ампелографической коллекции ВИР (КрОСС ВИР)

На КрОСС образцы винограда от вида *V. rotundifolia* представлены несколькими популяциями (F₁-F₃), полученными от самоопыления (инцухт), так как в коллекции нет других представителей вида *V. rotundifolia*, а опыление пылью *V. vinifera* или межвидовыми гибридами исключается из-за разного числа хромосом (*V. rotundifolia* 40, *V. vinifera* 38). За много лет образцы винограда от вида *V. rotundifolia* на КрОСС изучены по ряду показателей: от фенологических наблюдений (сокодвижение, распускание почек, цветение, созревание ягод, потребительская зрелость ягод) до оценки механического состава гроздей и ягод винограда (средняя масса грозди, число ягод в грозди, масса ягоды, удельный вес гребней, кожицы с твердыми остатками мякоти, семян, гребни + семена, масса 100 семян, число семян в ягоде, сахаристость сока (Отчет КрОСС, 2021 г.)).

Дагестанская опытная станция – филиал ВИР. ДОС ВИР была основана в 1969 г. Станция расположена на берегу Каспийского моря, недалеко от г. Дербент. Станция является важной базой как для проведения экспедиционных исследований растительных ресурсов

Северного Кавказа и Закавказья, так и для ботанико-систематических исследований (рис. 5) (Отчеты ДОС ВИР, 2014 г.).



Рисунок 5 – Ампелографическая коллекция в полевых условиях Дагестанской опытной станции – филиала ВИР (ДОС ВИР). Май, 2021

В апреле 1974 года на ДОС ВИР была организована рабочая группа по изучению винограда. Работы проводились по тематике: «Мобилизация и изучение мировых растительных ресурсов для использования их в народном хозяйстве». Ранее, на станции имелось два коллекционных участка. Один участок закладки 1957 года – насчитывал более 100 в основном аборигенных сортов, относящихся к восточной группе. Другой (1967 года) – 80 дагестанских и среднеазиатских сортов винограда (Отчет ДОС за 1975 г.). На территории второго участка заложена новая ампелографическая коллекция в 1975 году при участии П.М. Пирмагомедова (Агаханов и др., 2018).

В связи с этим для пополнения вновь созданной коллекции в 1976 году были организованы две экспедиции в период цветения винограда (с 20 июня по 3 июля) и в период полной зрелости ягод (с 20 сентября по 27 октября 1976 года) (Агаханов и др., 2018). Во время экспедиций был проведен сбор как гербарных образцов листьев, побегов, так и семян, посадочного материала (черенки) по районам Азербайджанской ССР (Губинский, Дивичинский, Ленкоранский,

Астаринский, Физулинский, Зангелакский районы), Армянской ССР (Мегринский, Инджеванский районы), Грузинский ССР (Душетский, Сухумский, Гудаутский, Гагринский районы), кроме того образцы были собраны по республикам и краям Северного Кавказа (Дагестанской АССР, Краснодарскому, Ставропольскому краям). В ходе экспедиций по Кавказу было собрано 700 образцов, из них 300 дикорастущих и 400 культурных сортов винограда (Агаханов и др., 2018).

Весной 1976 года были привлечены 18 сортов из Армении и 12 сортов из Туркмении. Кроме того, был произведен посев семян 50 форм дикорастущего винограда, собранных в 1975 году в различных районах Кавказа.

Ампелографическая коллекция ДОО ВИР сегодня одна из крупных не только в системе ВИР, но и во всем Дагестане. Заложенная в 1975-1976 гг. коллекция, в связи с физиологическим старением кустов была перезаложена в 1999 году однолетними корнесобственными саженцами. В настоящее время в ампелографической коллекции Дагестанской опытной станции ВИР собрано и изучается 345 образцов, в том числе культурных форм сорто – 320, из которых 82 сорта являются автохтонными, 25 – дикорастущих форм (Отчет ДОО ВИР, 2021 г.).

Важная особенность коллекции винограда на Дагестанской ОС – поддержание в виде корнесобственной культуры, что особенно значимо для оценки устойчивости образцов к филлоксере. Часть коллекции ВИР продублирована в полевой коллекции ВНИИВ «Магарач», где она сохраняется в виде привитой культуры (Авидза и др., 2015; Полулях и др., 2017). Уникальный генофонд коллекции, представленный автохтонными сортами, требует надежного сохранения и комплексного изучения, в том числе – современными молекулярно-генетическими методами.

Дальневосточная опытная станция – филиал ВИР (ДВОС ВИР). 30 декабря 1929 года Н.И. Вавиловым на основании приказа Президиума ВАСХНИЛ было организовано Дальневосточное отделение ВИР, перед которым были поставлены следующие цели и задачи: изучение растительных ресурсов Дальнего Востока и Восточной Азии, сбор материала и изучение по хозяйственно-ценным признакам для Приморья с последующим их размножением и передачей производству (Кислин и др., 2015).

При инициативе А.М. Негруля в 1935 году на ДВОС ВИР начались исследования по винограду. В советское время в Приморском крае площади под виноградниками достигали 1860 га (Кислин и др., 2015).

С 1935 по 1985 гг. на ДВОС ВИР было изучено более 800 сортов европейского, североамериканского и дальневосточного происхождения. Интродуцированный в 1937 году из г. Сочи сорт ‘Альфа’ американского происхождения получил наибольшее распространение и был утвержден в качестве сорта для Приморского края (Отчет ДВОС ВИР, 1989 г.).

Кроме того, проводили работы по введению дикого амурского винограда в культуру. Были обследованы районы Приморского края, Уссурийской и Хабаровской областей и проведен отбор наиболее хозяйственно ценных, перспективных форм для Приморья.

Таким образом, была создана ампелографическая коллекция из 108 сортов винограда, включавшая 19 мичуринских, 61 сорт американского происхождения, 17 – среднеазиатского, 35 – франко-американского и 4 гибрида с амурским виноградом. Выделены наиболее ценные формы: ‘Амурский обоеполый’, ‘Амурский 230’. Кроме того, особой популярностью пользуется сорта местного происхождения: ‘Хасанский Боуса’, ‘Хасанский Сладкий’, и выращиваются в не укрывной культуре. Среди сортов европейско-азиатского происхождения в крае популярен сорт ‘Алешенькин’. В настоящее время ампелографическая коллекция ДВОС ВИР составляет 214 сортообразцов винограда (рис. 6) (Отчеты ДВОС ВИР, 2021 г.).



Рисунок 6 – Урожайный образец винограда амурского *V. amurensis* (окрестности п. Калиновка Партизанского района Приморского края (отчет ДВОС ВИР 2021)

В полевой коллекции, сохраняемой в условиях Приморья, наиболее интересны образцы *V. amurensis*, которые обладают широким адаптационным потенциалом и могут выращиваться в различных климатических условиях. Для предотвращения потери генотипов, защиты от болезней

и вирусов генофонд винограда ВИР сохраняют не только в полевых генных банках, но и начаты работы по дублированию в *in vitro* и крио коллекциях.

1.3 Наиболее распространенные болезни винограда

Виноград (*Vitis* spp.) является одной из наиболее важных культур в мире. Количество вирусов и других патогенов, поражающих виноград, намного превышает количество вирусов-патогенов других многолетних растений (Bouamama-Gzara et al., 2017). Известно, что виноград поражают грибы, бактерии, вирусы, вироиды, фитоплазмы и вредители. Однако, получение большого и качественного урожая напрямую зависит от фитосанитарного состояния насаждения. Среди грибных болезней наиболее опасными считаются: милдью оидиум, серая гниль, фомопсис, антракноз и среди вредителей самый опасный карантинный вредитель – виноградная филлоксеры.

1.3.1. Милдью= ложная мучнистая роса (ЛМР) =Downy Mildew (DM)

Возбудитель милдью – гриб *Plasmopara viticola* – принадлежит к отряду Peronosporales, является облигатным биотрофным патогеном-оомицетом виноградной лозы и вызывает ложную мучнистую росу (Gessler et al., 2011; Fawke et al., 2015; Kassemeyer et al., 2015). Это одно из самых серьезных заболеваний виноградных лоз во всем мире (Kamoun et al. 2015; Gessler et al., 2011).

С тех пор и до настоящего времени милдью уносит ежегодно огромную долю урожая во всех виноградных районах мира за исключением среднеазиатских стран, где она не может развиваться вследствие сухости климата (Бузин др., 1937). Болезнь поражает все зеленые части лозы: листья, зеленые побеги, бутоны, цветки, зеленые ягоды. При этом молодые ткани особенно восприимчивы к заражению (Kennelly et al., 2007).). Цикл заболевания может длиться от 5 до 18 дней в зависимости от температуры, влажности и сортовой восприимчивости (Agrios, 2005; Gessler et al., 2011). Первые признаки милдью заметны на листьях вначале в виде маслянистых пятен, а затем, после увлажнения, появляется выступающий из этих пятен с нижней стороны листа белый мучнистый налет – конидиеносцы (Ingram et al., 1981). Пораженные места постепенно засыхают, при сильном поражении листья опадают. На бутонах, цветках и молодых ягодах показываются вначале конидиеносцы в виде мучнистого налета, а затем бутоны буреют и засыхают; то же самое происходит с цветками и с молодыми завязями (Lafon et al., 1981). На более крупных ягодах белый налет (конидиеносцы) уже не выступает, ягоды сморщиваются, засыхают и постепенно опадают (Langcake, Lovell, 1980).

Поэтому ложная мучнистая роса по-прежнему наиболее разрушительна в Европе и в восточной части США, где год за годом она может вызывать серьезные эпифитотии (Agrios, 2005; Madden et al., 1995). При благоприятной погоде и отсутствии защиты от болезни ложная

мучнистая роса может легко уничтожить до 75% урожая за один сезон (Madden et al., 2000; Rossi, Tito, 2012). Для борьбы с ложной мучнистой росой в основном применяется химические методы (Lalancette et al., 1987; Rossi et al., 2009, 2013; Vercesi et al., 2010).

Применение тяжелых химикатов противоречит требованиям Европейской директивы 2009/128/ЕС (Parliament, 2009). В основу данной директивы положено «достижение экологически устойчивого применения пестицидов», путем продвижения интегрированной борьбы с вредителями (IPM) (Kamoun et al., 2015), включающие в себя внутренний карантин, организационно-хозяйственные мероприятия, оптимизацию посевных площадей и насаждений, пространственную изоляцию, использование устойчивых сортов и гибридов, мелиорацию земель, биологическое уничтожение, провокацию вредных организмов к жизнедеятельности, механическое уничтожение, химическое уничтожение и комплексное уничтожение. Интегрированная защита растений рассматривается как один из неотъемлемых элементов современных технологий возделывания сельскохозяйственных культур, в которых каждое мероприятие по борьбе с вредными организмами должно быть биологически, экологически и экономически обоснованным (Баздырев и др., 2014).

Таким образом, перед современной селекцией ставится задача по поиску и подбору генотипов, обладающих естественной устойчивостью к инфекции, которые могут быть донорами этих хозяйственно-ценных признаков (Töpfer et al., 2011).

Сорта винограда *V. vinifera* в основном восприимчивы к милдью (Staudt, Kassemeyer, 1995; Cadle-Davidson, 2008), за редким исключением: например, в геноме сорта 'Шардоне' был выявлен локус *Rpv11* (Bellin et al., 2009). Известно, что виды виноградной лозы различаются по восприимчивости к ложной мучнистой росе (Boso, Kassemeyer, 2008; Boso et al., 2006; Cadle-Davidson, 2008; Boso et al., 2011a). В геномах видов Северной Америки и Азии (*V. riparia*, *V. rupestris*, *V. aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. cinerea*, *V. rotundifolia*, *V. amurensis*), отмечена высокая резистентность к милдью (Alleweldt, Possingham, 1988; Wan et al., 2007), чем *V. vinifera*, возможно, из-за их более длительной коэволюции с патогеном. К данному времени у винограда идентифицированы уже несколько генов устойчивости к заболеваниям (табл. 2).

Таблица 2 – Гены устойчивости винограда к ложной мучнистой росе (база VIVC, дата обращения 10.02.2022)

Патоген	Локус	Хромосома	Источник устойчивости	Сцепленный ДНК-маркер
<i>Plasmopara viticola</i>	<i>Rpv1</i>	12	<i>V. rotundifolia</i>	VVIb32
	<i>Rpv2</i>	18	<i>V. rotundifolia</i>	
	<i>Rpv3</i>	18	<i>V. vinifera</i>	UDV-112
			(<i>V. vinifera</i> x 'Seyve Villard')	UDV-305 VMC7f2
			<i>V. vinifera</i>	VMC7f2
	<i>Rpv3-1</i> (=Rpv3 ₂₉₉₋₂₇₉)	18	<i>V. rupestris</i>	UDV-305 UDV-737
			<i>V. rupestris</i>	GF18-06 GF18-08
	<i>Rpv3-2</i> (=Rpv3 _{null-297})	18	<i>V. rupestris</i> <i>V. lincecumii</i>	UDV-305 UDV-737 GF18-06 GF18-08
	<i>Rpv3-3</i> (=Rpv3 _{null-271})	18	<i>V. labrusca</i> <i>V. riparia</i>	UDV-305 UDV-737
	<i>Rpv3 321-312</i>	18	<i>V. labrusca</i> <i>V. riparia</i>	UDV-305 UDV-737
	<i>Rpv3 361-299</i>	18	<i>V. rupestris</i>	UDV-305 UDV-737
	<i>Rpv3 299-314</i>	18	<i>V. rupestris</i>	UDV-305 UDV-737
	<i>Rpv3 null-287</i>	18	<i>V. rupestris</i> <i>V. labrusca</i>	UDV-305 UDV-737
	<i>Rpv4</i>	4	<i>V. vinifera</i>	VMC7h3 VMCNg2e1
	<i>Rpv5</i>	9	<i>V. riparia</i>	VVIo52b
	<i>Rpv6</i>	12	<i>V. riparia</i>	VMC8G9
	<i>Rpv7</i>	7	'Бianка'	UDV097
	<i>Rpv8</i>	14	<i>V. amurensis</i>	Chr14V015
	<i>Rpv9</i>	7	<i>V. riparia</i>	CCoAOMT
	<i>Rpv10</i>	9	<i>V. amurensis</i>	GF09-46
	<i>Rpv11</i>	5	<i>V. vinifera</i>	VVMD27
			<i>V. vinifera</i>	CS1E104J11F
			<i>V. vinifera</i>	VCHR05C
	<i>Rpv12</i>	14	<i>V. amurensis</i>	UDV014
			<i>V. amurensis</i>	UDV304
	<i>Rpv13</i>	12	<i>V. riparia</i>	VMC1G3.2
<i>Rpv14</i>	5	<i>V. cinerea</i>	GF05-13	
<i>Rpv25</i>	15	<i>V. amurensis</i>	Marker561375 Marker549779	
<i>Rpv26</i>	15	<i>V. amurensis</i>	Marker525926 Marker526446	
<i>Rpv27</i>	18	Не установлено	VVCS1H077H16R1-1 UDV737	

В таблице 3 представлены описанные в настоящее время различные гены устойчивости к *Plasmopara viticola*, локализованные на хромосомах 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 18 (<https://bit.ly/2L1k6KX>; Ильницкая, Макарина, 2016). M. Sargolzaei et al. (2021), ссылаясь на ряд исследований, сообщают: «Локусы количественных признаков были обнаружены у видов *Vitis*: *Rpv1* и *Rpv2* у *Muscadinia rotundifolia* Michaux (Merdinoglu et al., 2002; Wiedemann-Merdinoglu et al., 2006); *Rpv3* и *Rpv19* у *V. rupestris* Scheele (Welter et al., 2007; Bellin et al., 2009; Divilov et al., 2018; Vezzulli et al., 2019; Foria et al., 2020); *Rpv4*, *Rpv7*, *Rpv11*, *Rpv17*, *Rpv18*, *Rpv20* и *Rpv21*, у неопределенных американских видов (Fischer et al., 2004; Welter et al., 2007; Bellin et al., 2009; Divilov et al., 2018); *Rpv5*, *Rpv6*, *Rpv9*, и *Rpv13* у *V. riparia* (Marguerit et al., 2009; Moreira et al., 2011); *Rpv8*, *Rpv10*, *Rpv12*, *Rpv22*, *Rpv23*, *Rpv24*, *Rpv25*, и *Rpv26* у *V. amurensis* (Blasi et al., 2011; Schwander et al., 2012; Venuti et al., 2013; Song et al., 2018; Lin et al., 2019); *Rpv14* у *V. cinerea* (Ochssner et al., 2016); *Rpv15* и *Rpv16* у *V. piasezkii* Maxim. (Divilov et al., 2018); *Rpv27* у *V. aestivalis* Michx. (Sapkota et al., 2015, 2019). Однако устойчивость, детерминированная отдельными локусами, может быть преодолена в процессе адаптации патогена (Kast et al., 2000; Peressotti et al., 2010). Е.Т. Ильницкая и М.В. Макарина (2016), ссылаясь на ряд исследований, сообщают: «Первым картированным геном устойчивости к милдью был *Rpv1*, расположенный на хромосоме 12 и происходящий от *V. rotundifolia*. От *V. rotundifolia* в хромосому 18 *V. vinifera* был интрогрессирован и другой ген, *Rpv2*. Позднее в хромосоме 18 в районе локализации гена *Rpv2* был картирован ген *Rpv3*. Однако впоследствии было показано, что и гены устойчивости *Rpv2* и *Rpv3* находятся в различных районах хромосомы. Исследование устойчивых сортов среди североамериканских представителей рода *Vitis*, обладающих геном *Rpv3*, выявило наличие семи консервативных гаплотипов» (Ильницкая, Макарина, 2016). Американские и азиатские виды *Vitis*, принадлежащие к подроду *Euvitis* или подроду *Muscadinia*, проявляют различные уровни устойчивости к *P. viticola*, от умеренной устойчивости, например, у *V. rupestris*, до высокой устойчивости, например, у *V. rubra*, *V. candicans*, *V. amurensis*, *V. riparia*, *V. cinerea* или *V. rotundifolia* (Boubals, 1959; Olmo, 1986; Staudt, Kassemeyer, 1995; Cadle-Davidson, 2008; Diez-Navajas et al., 2008).

Использование в селекции устойчивых американских и азиатских видов начали в XIX веке, сначала в Соединенных Штатах, а затем в Европе (Eibach, Töpfer, 2015; Migicovsky et al., 2016; Merdinoglu et al., 2018; Yobrégat, 2018). В настоящее время доступны многочисленные межвидовые гибриды, сочетающие в себе качественные признаки *V. vinifera* и устойчивость американских и азиатских видов (Reynolds et al., 2015). Например, межвидовой сложный гибрид 'Бианка', полученный скрещиванием восприимчивого к грибным заболеваниям *V. vinifera* сорта 'Bouvier' с устойчивым межвидовым гибридом 'Villard Blanc' (SEIBEL 6468 × SUBEREUX) (Sotolář R. 2007) вместе с сортами 'Regent' и 'Solaris' является

одним из немногих культивируемых гибридов, устойчивых к *P. viticola*. Генетический фон межвидового гибрида 'Бианка' состоит из многочисленных форм: *V. vinifera* (78,09%), а также из североамериканских видов *V. rupestris* (14,58%), *V. berlandieri* Planch. (3,13%), *V. lincecumii* Buckl. (2,64%) и *V. labrusca* (1,56%) (Di Gaspero, Cipriani, 2002). QTL-анализ показал, что резистентность у гибрида 'Бианка' контролируется одним доминантным аллелем в локусе *Rpv3* на хромосоме18, что объясняет большую часть фенотипической дисперсии резистентности к ложной мучнистой росе (Bellin et al., 2009). Кроме того, наблюдаются уникальные случаи устойчивости к возбудителю ложной мучнистой росы у *V. vinifera* (Bitsadze et al., 2015; Toffolatti et al., 2016), происходящему из первого очага одомашнивания вида: Грузия, Южный Кавказ (Imazio et al., 2013). Механизм резистентности одного из этих устойчивых сортов, названного 'Мгалоблишвили', был подробно изучен (Toffolatti et al., 2018a; Toffolatti et al., 2020).

Таким образом, к настоящему времени известны некоторые гены устойчивости к милдью, известен ряд устойчивых форм, однако поиск новых источников устойчивости продолжается.

1.3.2. Оидиум=настоящая мучнистая роса (MP)= Powdery Mildew (PM)

Оидиум. Оидиум вызывает гриб *Erysiphe necator* (ранее *Uncinula necator*), который является облигатным паразитом американского происхождения. Исторические записи подтверждают гипотезу о том, что источником распространения инфекции является восточная часть Северной Америки (Weltzien, 1978).

Мучнистая роса была описана на винограде в Северной Америке в 1834 г., до ее открытия в Европе в 1845 г. (Large et al., 1940). Восточная часть Северной Америки является центром происхождения многих диких видов *Vitis*, обладающих относительно высоким уровнем устойчивости ко многим болезням и вредителям винограда, в том числе к мучнистой росе (Leppik, 1970; Lenne, Wood, 1991). После распространения в Европе в 1859 году мучнистая роса винограда наблюдалась во всех винодельческих регионах мира (Бузин и др., 1937). *E. necator*, скорее всего, распространился на большие расстояния за счет перемещения виноградной лозы, которой часто торговали между континентами в середине 1800-х годов и позже. *E. necator* остается в состоянии покоя в виде мицелия в спящих почках или в виде половых спор в клейстотециях коры виноградных лоз (Pearson et al., 1985).

Оидиум поражает все зеленые части лозы, вначале на листьях появляются небольшие светлые пятна, которые потом сливаются в более крупные и могут прикрыть весь лист пепельным налетом, после чего лист скручивается и опадает. Молодые побеги тоже поражаются, что вызывает прекращение роста. На бутонах и цветках оидиум развивается менее интенсивно, чем на ягодах, что объясняется более низкими температурами в период цветения (Large et al., 1940).

Пораженные молодые ягоды покрываются обильным налетом, остающимся на кистях до осени, прекращается рост плодов. При заражении оидиумом более крупных ягод последние дают трещины кожицы и выпячивание семян, и при сильном развитии грибка чувствуется запах гнилой рыбы. Поскольку инфекция поражает все зеленые части винограда и обычно требует на коммерческих виноградниках значительного использования фунгицидов, подбор альтернативного современного, более экологичного метода преодоления инфекции является актуальной задачей селекционеров (Weltzien, 1978).

Генотипы, происходящие из Северной Америки (*V. riparia* Michx., *V. rupestris* Scheele, *V. aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. cinerea*, *V. rotundifolia*, *V. labrusca*) и Азии (*V. amurensis* Rupr.), *V. bashinica*, *V. davidii*, *V. liubanensis*, *V. piasezkii* и *V. romanetii*), показывают генетическую устойчивость к оидиуму (Alleweldt, Possingham, 1988; Wan et al., 2007).

В генотипах этих видов винограда были идентифицированы локусы резистентности к патогену, им были присвоены символы *Run* (устойчивость к *Uncinula necator*) и *Ren* (*Erysiphe necator*) (Ильницкая и др., 2016). В таблице 3 представлены гены, контролирующие устойчивость к оидиуму винограда.

RUN1 является одним из трех локусов устойчивости к милдью, которые были идентифицированы у различных образцов дикого североамериканского вида *V. rotundifolia* (табл. 3) (Feechan et al., 2013). Wenping Qiu et al. (2015) в своих исследованиях сообщают: «Большинство *R*-генов кодируют белки, содержащие сайт связывания нуклеотидов (*NBS*) и повторов (*LRR*) богатые лейцином. Белки *NB-LRR* во время инфекции специфически распознают патогены и включается эффекторно-триггерный иммунитет (ETI), который очень эффективен против биотрофных патогенов, таких как оидиум». Геном виноградной лозы кодирует большое семейство генов *NB-LRR* и они группированы в тандемные повторы в геномных регионах (Velasco, 2007; Moroldo et al., 2008).

Тандемные повторяющиеся и паралогичные (ортологичные) *R*-гены активизируются, когда возникает необходимость в борьбе с вторгающимися патогенами. Среди образцов диких видов *Vitis* отмечено значительное генетическое разнообразие, в том числе, – по локусам генов устойчивости. В настоящее время идентифицировано девять локусов у различных видов винограда, произрастающих в Северной Америке, Китае и Центральной Азии, которые содержат *R*-гены, что и придает им высокую устойчивость к *E. necator*.

Таблица 3 – Гены, контролирующие устойчивость к оидиуму винограда, их расположение на хромосомах и ДНК-маркеры (база VIVC, дата обращения 10.02.2022)

Патоген	Локус	Хромосома	Источник устойчивости	Сцепленный ДНК-маркер
<i>Erysiphe necator</i>	<i>Ren1</i>	13	<i>V. vinifera</i>	UDV-020, VMC9h4-2, VMCNg4e10.1
	<i>Ren2</i>	14	Межвидовой гибрид (<i>V. rupestris</i> B38 x <i>V. cinerea</i> B9)	CS25
	<i>Ren3</i>	15	<i>V. vinifera</i>	UDV-015b, VVIv67, ScORA7-760, VChr15CenGen02, GF15-28 / VVIv67, GF15-28 / VVIv67
	<i>Ren4</i>	18	<i>V. romanetii</i>	VMC7f2, SNPs
	<i>Ren5</i>	14	<i>V. rotundifolia</i>	VMC9c1
	<i>Ren6</i>	9	<i>V. piasezkii</i>	PN9-057, PN9-068
	<i>Ren7</i>	19	<i>V. piasezkii</i>	VVIp17.1, VMC9a2.1
	<i>Ren8</i>	18	Межвидовой гибрид (<i>V. vinifera</i> x 'Villard blanc')	
	<i>Ren9</i>	15	<i>V. vinifera</i>	CenGen6
	<i>Ren10</i>	2	Межвидовой гибрид (<i>V. vinifera</i> x 'Seyval blanc')	S2_17854965
	<i>Run1</i>	12	<i>V. rotundifolia</i>	VMC4f3.1, VMC8g9, 49MRP1.P2, CB53.54
	<i>Run2</i> (<i>Run2.1</i> , <i>Run2.2</i>)	18	<i>V. rotundifolia</i>	VMC7f2, VMCNg1e3, VVIIn16
	<i>Sen1</i>	9	<i>V. vinifera</i>	S8_19258484

Секвенирование локуса *RUN1 / RPVI* показало, что он содержит семейство из семи предполагаемых *R*-генов рецептора Toll/интерлейкина-1 (*TIR*)-*NB-LRR*-типа. Из генов кандидатов *TIR-NB-LRR* был обнаружен *MrRUN1* в локусе (*MrRGA10*), который кодирует повышенную устойчивость к оидиуму. Этот ген показывает полную устойчивость к изолятам из Австралии, Северной Америки и Франции, вызывая PCD апоптоз (запрограммированная гибель клеток) (Feechan et al., 2013) и этим предотвращая рост и спороношение гифов *E. necator*. Кроме того, был собран изолят оидиума (*Musc4*) из юго-восточного региона Северной Америки, которая является родиной *V. rotundifolia* (Brewer, Milgroom, 2010), способный преодолеть устойчивость, детерминированную *MrRUN1* (Feechan et al., 2013). Это говорит о том, что эффектор распознавания белка *MrRUN1* был мутирован, либо полностью потерян (Qiu, 2015).

S. Riaz с коллегами (2011, 2013) определили несколько локусов на хромосоме 18 в различных донорах устойчивости: *Run2.1* (*V. rotundifolia* ‘Magnolia’), *Run2.2* (*V. rotundifolia* ‘Trayshed’). Гены *RUN2*, *Run2.1* и *Run2.2* были унаследованы от *V. rotundifolia*, но аллели, связанные с двумя фланкирующими маркерами, отличаются для сортов ‘Trayshed’ и ‘Magnolia’ и находятся на 18 хромосоме. Гены *RUN2*, *RUN2.1* и *RUN2.2* на 18 хромосоме были идентифицированы в сортах *V. rotundifolia* ‘Magnolia’ и ‘Trayshed’ (Riaz, 2013). Хотя ген *RUN2.1* имеет не настолько сильную резистентность к настоящей мучнистой росе как у *RUN1*, однако она не разрушается изолятом *Musc4*, что делает его потенциальным кандидатом на пирамидирование с *RUN1* (Feechan et al., 2015).

D. Ramming с коллегами (2011) в своих исследованиях сообщают, что дикие китайские виды *Vitis* тоже представляют особый селекционно-исследовательский интерес и являются важным источником основных доминантных *R*-генов устойчивости к оидиуму. Ген *REN4* был успешно интрогрессирован в *V. vinifera* от китайского вида *V. romanetii*. Показано, что он является доминантным аллелем единичного локуса *R*, определяющего быстрое развитие реакции неспецифической устойчивости. Кроме того, дикие китайские виды виноградной лозы *V. piasezkii* тоже содержат локусы устойчивости к оидиуму, обозначенные *REN6* и *REN7* и расположенные на хромосомах 9 и 19. W. Qiu с коллегами (2015) в своих исследованиях сообщают, что сравнение реакций устойчивости локусов *REN6*, *REN4* и *RUN1* против одного и того же австралийского изолята *E. necator* на том же генетическом фоне показало, что инициация PCD происходит наиболее быстро в клетках, содержащих ген *REN6*. При этом менее 5% апресорий продуцируют вторичную гифу в сравнении с 15-30% у виноградных лоз, содержащих гены *REN4* или *RUN1*.

1.3.3. Виноградная филлоксера=*Daktulosphaira vitifoliae* (DV)

Виноградная филлоксера *Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch 1855) (семейство Phylloxeridae) представляет собой небольшое инвазивное сосущее насекомое, которое оказывает существенное физическое и экономическое влияние на возделывание винограда (Benheim et al., 2012).

Филлоксера впервые была обнаружена на диких лозах в 1854 году в бассейне реки Миссисипи в восточной части США (Wapshere, Helm, 1987), а затем на американских подвоях была завезена в крупные винодельческие центры Европы (Gale, 2002).

В Европе филлоксера впервые была обнаружена в оранжерее в Лондоне 1863 году, затем во Франции в 1868 году, ее описал Планшон. В течение 30 лет французские виноградники были поражены этим вредителем более чем на 90% (Powell, 2008).

Из Франции филлоксера распространилась по Европе и другим виноградарским регионам, в значительной степени уничтожив европейский виноград (*V. vinifera*) (Bignon et al., 2012; Banerjee, 2007).

Филлоксерой поражаются листья и корни винограда. При поражении филлоксера вызывает образование галлов и желваков (Forneck, Huber, 2009).

В.К. Котляр и Е.Т. Ильницкая (2021), ссылаясь на ряд исследований, сообщают: «Насекомое питается, вставляя игольчатый стилет в ткани листа или корня, в зависимости от стадии жизни, хозяина и генотипа. Виноградная филлоксера неоднократно зондирует ткани растений в поисках оптимального места для питания, таким образом нанося обширные повреждения. Взрослые особи размножаются партеногенетически, а молодые насекомые мигрируют локально, образуя новые очаги заражения. Нимфы и взрослые особи питаются листьями, что приводит к образованию кармановидных галлов. У восприимчивых растений галлы можно обнаружить на листьях (обычно на пластинках, но также и на черешках), усиках и побегах». При заражении листовой формой филлоксеры происходит ухудшение функционирования листьев, замедляется рост растений, происходит усыхание рукавов, снижается образование плодородных побегов, они не вызревают и не достигают стандартной толщины (Granett et al., 2001; Powell et al., 2013; Jackson, 2014).

На пораженных филлоксерой кустах винограда происходит снижение урожая на 20- 30% и более, а содержания сахара в соке – на 15% и более. (Бужин и др., 1937) Листовая форма вредителя наиболее быстро распространяется и способствует появлению ее новых очагов (Granett et al., 2001).

При поражении корневой филлоксерой наблюдается наибольший ущерб и в зависимости от сорта/подвоя это приводит к увяданию и гибели растений (Omer et al., 1995; Edwards et al., 2007), что частично объясняется вторичными грибными инфекциями (Pouget, 1990).

Под воздействием секретов слюны корневой филлоксеры на корнях образуются клювообразные галлы (Powell, 2012; Smith et al., 2018), далее происходит гидролиз органических соединений, превращающий их в легкоусваиваемую филлоксерой форму (Митюшев, 2013). Корневая форма филлоксеры особенно вредоносна для европейских и азиатских сортов. Корни растрескиваются и быстро загнивают в результате проникновения в них микроорганизмов (Бужин др., 1937), прекращается их рост и развитие, что в конечном итоге приводит к гибели зараженных лоз (Powell, 2008).

В настоящее время в борьбе против филлоксеры применяют различные методы: карантинно–профилактические (Powell et al., 2013; Jackson, 2014; Tello, Forneck, 2019), агроэкологические, включающие ведение культуры винограда на песках и других

бесструктурных почвах и на филлоксероустойчивых подвоях, производимых путем скрещивания сортов и видов *Vitis*; применение системных инсектицидов, которые необходимо применять постоянно (Митюшев, 2013).

Наиболее устойчивыми формами к корневой филлоксере являются американские сорта (Митюшев, 2013), но они неустойчивы или недостаточно устойчивы к листовой форме. В местах питания корневой филлоксеры образуется пробковый слой, изолирующий поврежденный участок и препятствующий проникновению патогенной микрофлоры к здоровым тканям (Митюшев, 2013).

После обнаружения филлоксеры в Европе было решено использовать дикие американские лозы для выведения устойчивых форм при помощи скрещивания их с европейскими сортами и в качестве подвоев для европейских сортов (Бузин и др., 1937).

В начале XIX века были предприняты первые попытки классифицировать виноградную лозу в отношении филлоксероустойчивости (Viala, Ravaz, 1908).

По этой шкале европейские лозы показали себя как самые неустойчивые формы – от 0 до 1, *V. labruska* 5 баллов, *V. solonis* 15 баллов, у видов *V. berlandieri*, *V. rupestris*, *V. cordifolia* устойчивость варьировалась от 18 до 19,5 баллов, а абсолютная устойчивость была у американского вида *V. rotundifolia* (Бузин и др., 1937).

До настоящего времени основным решением проблемы корневой филлоксеры является использование привитой культуры (Powell et al., 2008). Однако, при переходе на привитую культуру сталкиваются с множеством проблем. Основной из них является несовместимость привойно-подвойных комбинациях (Бузин и др., 1937).

Внедрение подвоев в борьбе с филлоксерой создало новый источник генетического разнообразия в XIX веке. Однако генетическое разнообразие подвоев используется плохо. Например, только пять подвоев (SO4, 110R, 3309C, 41B и 110Ru) составляют более 75 % насаждений во Франции (Ollat et al., 2016; Delrot et al., 2020).

В таблице 4 представлены описанные в настоящее время 8 различных локусов и гены, кодирующие устойчивость к филлоксере, локализованные на хромосомах 13, 14, 4, 5, 7, 3, 10. Например, у сорта 'Börner', был картирован ген *Rdv1*, расположенный на хромосоме 13. Исследование при помощи SSR-маркеров доказало, что источником гена устойчивости *Rdv1* является *V. cinerea* (Hausmann et al., 2011). В 2018 году в гибриде от *V. cinerea* был идентифицирован ген *Rdv2*. После проведения SNP-анализа картирование показало, что ген устойчивости *Rdv2* локализован на 14 хромосоме (Smith et al., 2018).

Таблица 4 – Гены, контролирующие устойчивость к виноградной филлоксере, и их расположение в хромосомах и ДНК-маркеры (база VIVC, дата обращения 10.02.2022)

Патоген	Локус	Хромосомы	Источник устойчивости	Сцепленный ДНК-маркер
<i>Daktulosphaira vitifoliae</i>	<i>Rdv1</i>	13	<i>V. cinerea</i>	Gf13_9, VMC8e6 GF13-1, GF13-7
	<i>Rdv2</i>	14	<i>V. cinerea</i>	S14_4921219
	<i>Rdv3</i>	14	Не установлен	S14_5049399
	<i>Rdv4</i>	4	Не установлен	
	<i>Rdv5</i>	5	Не установлен	
	<i>Rdv6</i>	7	<i>V. rotundifolia</i>	3_5494608
	<i>Rdv7</i>	3	<i>V. rotundifolia</i>	
	<i>Rdv8</i>	10	<i>V. rotundifolia</i>	

Впервые в 1964 U. X. Davidis и H. P. Olmo выдвинули гипотезу о том, что устойчивость образца к *V. rotundifolia* контролируется более чем одним локусом (Davidis, Olmo, 1964). Позже, Буке предположил, что устойчивость к филлоксере винограда может быть опосредована полудоминантным аллелем, регулируемым тремя генетическими модификаторами (Bouquet, 1983). D. Boubals, ссылаясь на ряд исследований, приходит к выводу, что у межвидовых гибридов, полученных с участием различных видов *Vitis* (*V. berlandieri*, *V. cinerea* и *V. rubra*) и *V. rotundifolia* (Boubals, 1966), устойчивость контролируется несколькими локусами. В настоящее время у *Vitis* spp. известно 4 гена устойчивости к корневой филлоксере (Rubio et al., 2020).

Кларк и его коллеги в 2018 году проводили идентификацию генов устойчивости к филлоксере, которые впоследствии были обозначены как *Rdv3* и *Rdv4*, обеспечивающие устойчивость к листовой филлоксере. Эти гены картированы в гибриде MN1264, из-за сложной родословной которого затруднительно точно определить, какой именно вид винограда является донором устойчивости (Clark et al., 2018; Котляр, Ильницкая, 2021).

Кроме того, Кларком был обнаружен и картирован ген, контролирующий резистентность к корневому типу филлоксеры, названный *Rdv5*. Однако, его изначальный донор также не установлен (Clark et al., 2018)

В. Rubio (2020), и его коллеги в виде *V. rotundifolia* идентифицировали гены устойчивости к корневой филлоксере *Rdv6*, *Rdv7*, *Rdv8*, расположенные на хромосомах 7, 3, 10. Эти исследования нам открывают перспективы направленного подбора родительских форм для создания селекционного материала, обладающего устойчивостью к филлоксере (Rubio et al., 2020).

1.4 Молекулярные методы в изучении винограда

Для создания новых устойчивых форм растений в последнее время все чаще используют достижения биохимии, молекулярной генетики, геномики, биотехнологии. При этом первым шагом изучения эволюционных путей, степени родства таксонов и т.п. является паспортизация образцов с апробированным минимальным числом маркеров разного типа.

Биохимические маркеры основаны на изучении белков, которые отражают генетическую структуру и выявляются с помощью электрофореза. С конца 1960 года были созданы высокоразрешающие методы электрофореза белков, этот метод начал активно применяться (Алтухов, 2003). Как известно, генотипы одной популяции могут отличаться друг от друга особенностями строения определенных белков, и такие отличия могут передаются неизменными от родителей потомкам (Трифоновна, 2018). С помощью биохимических маркеров можно изучить генетическое межвидовое и внутривидовое разнообразие. Данный метод используется для исследования запасных белки семян, поэтому его применение для анализа вегетативно размножаемых культур затруднено.

Источником генетического разнообразия растений, как и других живых существ, является полиморфизм нуклеотидной последовательности молекул ДНК, который уникален для любого индивидуума. Наиболее используемыми являются ДНК-маркеры, перечисленные на рисунке 7 (Хлесткина, 2013). Для анализа генетического разнообразия у растений используются различные типы ДНК-маркеров: от классических RFLP, RAPD, AFLP, SSR до новейших маркеров, основанных на методах секвенирования нового поколения (NGS – next generation sequencing) (Камнев и др., 2020). Нуклеотидные вставки и делеции, а также точечные мутации определяют разнообразие аллелей большинства генов. Превосходство молекулярных маркеров над ампелометрией для характеристики сортов винограда хорошо известно. В изучении образцов винограда молекулярные маркеры, такие как RFLP (Bourquin et al., 1993), RAPD (Jean Jaques et al., 1993; Grando et al., 1995; Vidal et al., 1999; Luo, He, 2001; Tamhankar et al., 2001), микросателлитные SSR (Bowers et al., 1993; Bowers et al., 1999; Thomas, Scott, 1993; Cipriani et al., 1994; Scott et al., 2000; Shiferaw et al., 2012; Emanuelli et al., 2013; Ren et al., 2014; Агаханов др., 2018; Agakhanov et al. 2019; Shirasawa et al., 2013; Olmstead et al., 2008; Lu et al., 2012, 2013; Lamoureux et al. 2006; Costantini et al., 2007; De Mattia et al., 2007; Cipriani et al., 2008; Bocharova et al., 2009; Riaz et al., 2009) и AFLP (Labra et al., 1999; Cervera et al., 2000; Martinez et al., 2003) широко используются для характеристики сортов, анализа происхождения, идентификации клонов, установления генетического родства и молекулярного картирования.

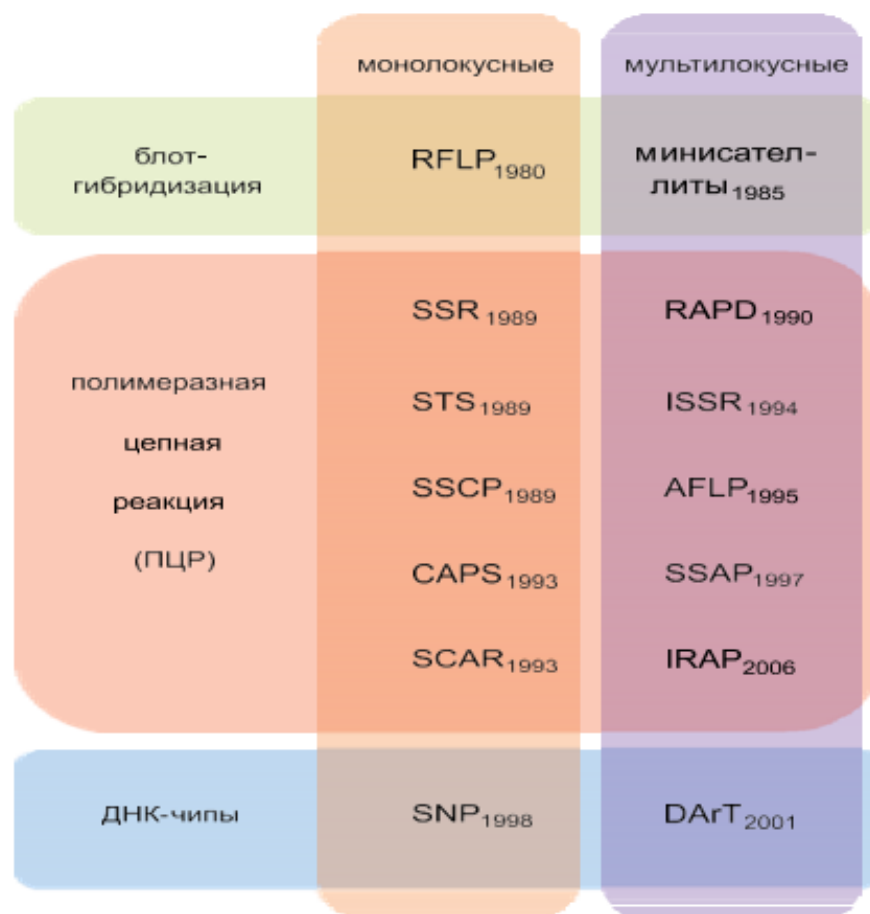


Рисунок 7 – Схематическая классификация молекулярных маркеров и год их первого упоминания в публикациях (Хлесткина, 2015)

ДНК-маркеры дают возможность охарактеризовать генотипы, выявить генетические взаимоотношения и измерить генетическое разнообразие более точно, чем другие маркеры (Soller, Beckmann, 1983). Для адекватного подбора маркеров с целью решения той или иной генетической задачи необходимо учитывать такие критерии, как цель использования, возможность сопоставления полученных результатов с данными других исследователей, материальные и временные затраты, необходимые для проведения исследования с выбранной группой маркеров, уровень полиморфизма и возможность автоматизации процесса (рис. 8).

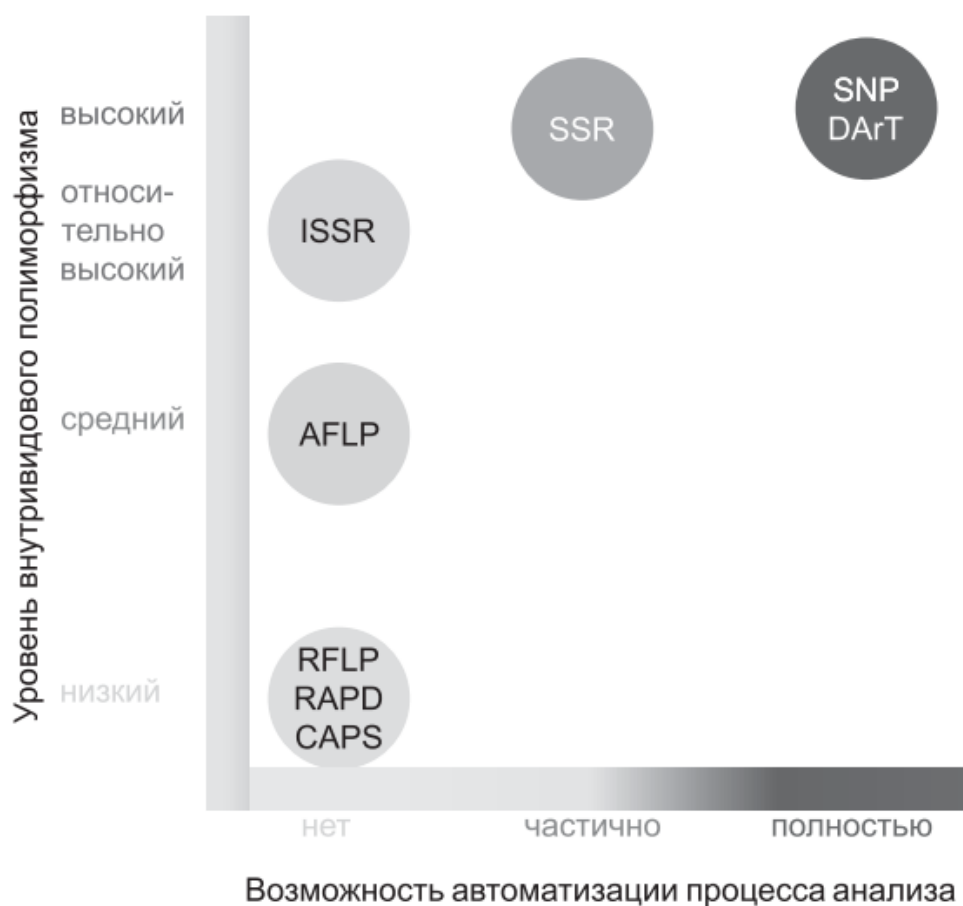


Рисунок 8 – Уровень внутривидового полиморфизма и возможность автоматизации анализа различных типов ДНК-маркеров (Хлесткина, 2011)

1.4.1 Полиморфизм длин рестриционных фрагментов (RFLP)

Полиморфизм длин рестриционных фрагментов – RFLP – позволяет идентифицировать генетическое разнообразие на основе уникальных паттернов разрезания в определенных областях ДНК ферментами рестрикции (рестриктазами). Разрезание генома ДНК рестриционным ферментом позволяет получить набор фрагментов ДНК различной, но строго определенной длины. Любая точечная мутация в сайте рестрикции, так же как вставки и делеции, приводят к изменению длины рестриционного фрагмента и фиксируется по изменению спектра рестриционных фрагментов на агарозном геле в процессе электрофореза, позволяя визуализировать ДНК полиморфизм между различными генотипами (RFLP) (Потокина, 2008). Например, с помощью RFLP-маркеров была проведена оценка генетического разнообразия подвоя *Vitis* (Bourquin et al., 1993), который использовался для генетической характеристики технических сортов *V. vinifera* и одного межвидового гибрида, а также для понимания филогенетических и межвидовых отношений (Bowers et al., 1996).

1.4.2 Случайно амплифицированные полиморфные фрагменты ДНК (RAPD)

Метод случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD) используется как простой, недорогой и эффективный метод для анализа геномного полиморфизма среди родственных организмов. Этот метод позволяет амплифицировать фрагменты нуклеотидной последовательности любого участка генома, представляющие интерес для исследователя, и анализировать их полиморфизм. В 1990 году две группы ученых (Williams et al., 1990; Welch, McClelland, 1990) независимо друг от друга пришли к заключению, что фрагменты ДНК могут быть амплифицированы (размножены) из геномной ДНК с использованием одного короткого (обычно 10 нуклеотидов) праймера произвольной последовательности (Потокина, 2008). В техническом исполнении методика RAPD-маркеров проста и не требуется знаний о последовательности ДНК (Гостимский и др., 2005), что особенно актуально при работе с малоизученными видами, для выявления генетического полиморфизма. Маркеры RAPD использовались для идентификации сортов и для оценки генетического разнообразия среди сортов нескольких сельскохозяйственных культур, таких как фасоль (Skroch et al., 1992), вигна (Mignouna et al., 1998), горох (Hoey et al., 1996), *Ceratopis* (Kaaga et al., 1996), маш (Santalla et al., 1998; Lakhanpaul et al., 2000). С помощью RAPD-маркеров было проанализировано генетическое разнообразие редких видов растений *Solanum conocarpum* и *S. polygamum* с Виргинских островов (Stanford et al., 2013), природных популяций *Rauwolfia serpentina* L. (Nair et al., 2014), а также редкого вида *Euryale ferox*, собранных на территории Индии (Kumar et al., 2016). Кроме того, эти маркеры были использованы для изучения генетического разнообразия сортов и видов *Vitis* (Tamhankar et al., 2001; Moreno et al., 1995; Bellin, 2000; Bisztray et al., 2002; Faraj et al., 1998), разнообразия столового винограда (Leão et al., 2011; Ercisli et al., 2008), и различий между культурным видом винограда *V. vinifera* sp. и дикорастущим *V. vinifera* ssp. *silvestris* (Grando et al., 1995; Faraj et al., 1998).

1.4.3 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

AFLP маркеры были впервые предложены в 1995 (Vos et al., 1995). Этот метод используется для обнаружения полиморфизмов в ДНК, когда информация о геноме неизвестна. AFLP метод используется для обнаружения генетических изменений, вызванная точечными мутациями в сайтах рестрикции и небольшими инделями внутри рестрикционного фрагмента (Mueller, Wolfenbarger, 1999). С помощью AFLP-анализа было изучено генетическое разнообразие редких видов растений и степень их дифференциации. Например, в 2005 году с использованием данного метода было проанализировано генетическое разнообразие эндемика Новой Зеландии *Hebe speciosa* A.Cunn (Armstrong Lange, 2005), редких растений Китая

Cycas fairylakea (Jian et al., 2006) и *Disanthus cercidifolius* subsp. *longipes* (Yu et al., 2014), на Гавайях единственных оставшихся популяций *Phyllostegia stachyoides* и *Melicope zahlbruckneri* (Raji, Atkinson, 2013), редкого растения тропических лесов Мадагаскара *Bulbophyllum occultum* (Jaros et al., 2016). С помощью AFLP-маркеров был изучен полиморфизм амплифицированных фрагментов мутаций в 86 клонах рислинга *V. vinifera* (Anhalt, et al 2011) генотипированы 67 различных образцов виноградной лозы из коллекции DOCa Риоха в Испании (Cervera et al., 1998), 38 португальских сортов (Castro, et al. 2012), проведена оценка разнообразия сортов аргентинского винограда (*V. vinifera* L.) с использованием морфологических данных (Martínez et al., 2003). Кроме того, с помощью молекулярных маркеров AFLP было изучено генетическое разнообразие межвидовых гибридов (Theocharis et al., 2010), рода *Vitis* (Aradhya et al., 2013).

1.4.4 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)

ISSR (Inter Simple Sequence Repeats (Zietkiewicz et al., 1994)) – маркеры, основанные на межмикросателитных последовательностях с длиной фрагмента ДНК около 100- 3000 п.н. При ISSR анализе также, как и в RAPD используется один или несколько маркера длиной 15-24 п.н.

Известно, что ISSR генерирует большое количество полиморфных полос на внутривидовом уровне. Полосы генерируются с помощью реакции ПЦР с одним праймером, где праймер представляет собой повторение ди-, три- или тетрануклеотида, а амплифицированная область представляет собой часть генома между двумя идентичными микросателлитными праймерами с противоположной ориентацией на цепи ДНК. Эти последовательности праймеров широко распространены в геноме. Таким образом, метод ISSR-PCR позволяет быстро провести скрининг широкой части генома без предварительного знания последовательности ДНК.

Например, с помощью ISSR-маркеров было изучено генетическое разнообразие винограда (Seyedimoradi et al., 2012; Basheer-Salimia et al., 2019; Lisek, Lisek, 2019), проведена оценка генетической однородности регенерированных *in vitro* растений (Nookaraju, Agrawal, 2012), их также использовали для изучения внутрисортной генетической изменчивости сортов (Meneghetti, et al 2012). Кроме того, с помощью ISSR-маркеров можно провести анализ генетической стабильности. Например, Киселева и другие использовали метод MS-ISSR (methylation-sensitive ISSR) для оценки динамики профиля метилирования ДНК плодовых культур в результате криоконсервации. В результате было установлено метилирование в сорте черешни и груши и деметилирование в сорте яблони (Киселева и др., 2012).

1.4.5 SSR-маркеры (Simple-sequence Repeats)

SSR-маркеры (Simple-sequence Repeats) представляют собой короткие tandemные повторы нуклеотидных мотивов (Tautz, 1989; Litt, Luty, 1989), которые содержат от одного до десяти нуклеотидов в повторяющейся единице (Трифопова, 2018). В последнее время микросателлитные маркеры широко используются для анализа генетического разнообразия и для генотипирования (Dirlewanger et al., 2002; Hasnaoui et al., 2012; Shiferaw et al., 2012; Emanuelli et al., 2013; Ren et al., 2014; Агаханов и др., 2018; Agakhanov et al., 2019), определения генетического родства (Malysheva et al., 2003), идентификации видов (Shirasawa et al., 2013) и для картирования генетического сцепления (Temnykh et al., 2000; Olmstead et al., 2008; Lu et al., 2012, 2013), поскольку они являются высокоинформативными, кодоминантными, мультиаллельными генетическими маркерами, которые экспериментально воспроизводимы среди родственных видов (Mason, 2015).

Генотипирование и паспортизации рода *Vitis* с использованием SSR-маркеров широко описаны в литературе (Thomas, Scott., 1993; Bowers et al., 1996, 1999a, b; Sefc et al., 1998; Arroyo García et al., 2002; Di Gaspero et al., 2005, 2007; Merdinoglu et al., 2005; Lamoureux et al., 2006; Costantini et al., 2007; De Mattia et al., 2007; Cipriani et al., 2008; Bocharova et al., 2009; Riaz et al., 2009), маркеры успешно использованы для идентификации образцов *Vitis* (Lin, Walker, 1998; Tessier et al., 1999; Di Gaspero et al., 2000; Fernández et al., 2008). Кроме того, SSR-маркеры использовались для построения генетических карт винограда (Dalbò et al., 2000; Doligez et al., 2002; Grando et al., 2003; Adam-Blondon et al., 2004; Doucleff et al., 2004; Riaz et al., 2004, 2006; Lowe, Walker, 2006; Di Gaspero et al., 2007; Vezzulli et al., 2008).

Традиционно продукты ПЦР разделяют с помощью полиакриламидных гелей (Thiel et al., 2003) или агарозных гелей (Chani et al. 2002). Технология, основанная на электрофорезе, имеет низкую пропускную способность и иногда дает неточные размеры. Автоматическое капиллярное секвенирование с использованием флуоресцентно меченого праймера (Eujayl et al., 2002) обеспечивает более точные и воспроизводимые результаты генотипирования, но стоимость мечения красителем каждого прямого праймера высока.

ДНК-маркеры применяют в настоящее время повсеместно как простой и удобный способ паспортизации сортов винограда (SSR, RAPD-маркеры), а также для характеристики различных хозяйственно-ценных признаков образцов (устойчивость, урожайность, окраску ягод и т.п.). В настоящей работе мы использовали SSR-маркеры – для изучения генетического разнообразия и паспортизации ампелографической коллекции винограда ДОС ВИР и гибридов, полученных при скрещивании различных образцов.

1.4.6 Полногеномный анализ *de novo*

Современные методы секвенирования можно разделить на три поколения: секвенирование методом терминации цепи (метод Сэнгера), секвенирование синтезом (Illumina) и секвенирование единичных молекул в реальном времени (SMRT, ONT). Метод секвенирования по Сэнгеру был предложен в 1970-х годах (Sanger et al., 1977) и был применен для выявления состава нуклеиновых кислот генов и небольших геномов вирусов, далее в 1985 году был усовершенствован путем замены радиоактивной метки на нуклеотиды, конъюгированные с флуорохромами (Smith et al., 1986). Секвенирование по Сэнгеру является экономически выгодным методом, дает за один запуск в одном капилляре один фрагмент цепи ДНК при максимальной длине прочтения до 900 п.н. Использование этого метода для секвенирования целых геномов является дорогостоящим и трудоемким даже для геномов относительно небольшого размера.

Важным технологическим достижением стало внедрение секвенирования второго поколения – секвенирование нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS) (Vincent et al., 2017).

NGS позволяет выполнять массовое секвенирование с гораздо более высокой производительностью, чем метод Сэнгера. В настоящее время наиболее часто используют технологию NGS, включающую пиросеквенирование 454 (Roche Applied Science, Базель, Швейцария), анализатор генома Illumina/Solexa (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США), SOLiD (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США), HeliScope Single Molecule Sequencer (Helicos BioSciences, Кембридж, Массачусетс, США) и технологию Single Molecule Real Time (SMRT, Pacific Biosciences, Менло-Парк, Калифорния, США) (Siqueira et al., 2012).

Метод пиросеквенирования впервые был предложен в 1988 г. (Human, 1988), в его основе лежит механизм измерения пирофосфата, образующегося в результате реакции полимеризации ДНК.

Секвенаторы, основанные на такой технологии, имеют несколько большую производительность, однако не позволяют с высокой точностью определять нуклеотидный состав гомополимерных участков (Григорьева и др., 2019). Этот метод хорошо подходит для быстрого секвенирования ДНК и РНК. Кроме того, с помощью метода, основанного на пиросеквенировании, можно выявлять мутации (Montero et al., 2008). В настоящее время пиросеквенирование и секвенирование по Сэнгеру потеряли свою актуальность и уступили место более современным и дешевым методам, таким как секвенирование синтезом на Illumina.

Секвенаторы данной технологии используют секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников, в своих последних вариантах

позволяют получить до 6000 млрд нуклеотидов и до 20 млрд прочтений выходных данных, что существенно ускоряет работы по полногеномному секвенированию (Григорьева и др., 2019; Волков и др., 2020).

Например, с использованием технологии Illumina были секвенированы геномы нескольких видов *Vitis* (табл. 5).

Таблица 5 – Состояние полногеномного секвенирования винограда
(база NCBI, дата обращения 15.01.2022)

№	Название вида	Кол-во контигов	N50 (kb)	L50	Размер, Мб	Кол-во перекрытий	Оборудование	Год
1	<i>V. vinifera</i> , 'Чхавери'	8,976	112,052	1,132	427	68	Illumina HiSeq 2000	2007
2	<i>V. vinifera</i>	14,634	102,851	1,362	486	12	Illumina	2009
3	<i>V. aestivalis</i>	756 125	772	122 198	432	28	454; Illumina HiSeq	2015
4	<i>V. vinifera</i> , 'Шардоне'	852	935 792	145	489	105	PacBio	2016
5	<i>V. vinifera</i> , 'Meskhetian green'	8,976	112,385	1,132	427	50	Illumina HiSeq 2000	2017
6	<i>V. vinifera</i> , 'Саперави'	8,976	112,345	1,132	427	57	Illumina HiSeq 2000	2017
7	<i>V. vinifera</i> , 'Ркацители'	8,976	111,837	1,134	426	33	Illumina HiSeq 2000	2017
8	<i>V. riparia</i>	1,161	740,110	196	500	335	Illumina HiSeq; PacBio RSII; 10X Chromium Genomics	2018
9	<i>V. amurensis</i>	5,873	344,503	453	603	320	Illumina HiSeq; PacBio RSII	2019
10	<i>V. vinifera</i> , 'Шардоне'	1,457	1,240,368	120	605	58	PacBio RSII	2019
11	<i>V. labrusca</i>	39,288	26,099	5,100	570	216	Illumina	2020
12	<i>V. rupestris</i>	45,770	33,130	4,083	607	46	Illumina NextSeq	2020
13	<i>V. rotundifolia</i>	197,931	11,360	8,005	462	20	Oxford Nanopore MinION	2020 *
14	<i>V. cinerea</i>	39,902	42,129	2,928	497	39	Illumina NextSeq	2021
15	<i>V. doaniana</i>	36,373	44,957	2,866	545	47	Illumina NextSeq	2021
16	<i>V. vinifera</i>	128,093	5,096	19,747	531	38	Illumina NextSeq	2022

*Примечание: результаты получены в рамках выполнения диссертационного исследования при поддержке гранта РФФИ № 19-316-90007 Аспиранты

Стоит отметить, что первая полногеномная сборка винограда была осуществлена с использованием метода секвенирования по Сэнгеру с дополнением методом пиросеквенирования (454 Life Science). Библиотеки для секвенирования были подготовлены по методу дробовика (whole genome sequencing, WGS). При использовании этого метода ДНК фрагментируют на мелкие участки (100–300 п.н.) случайным образом, а затем секвенируют любым из методов.

Секвенаторы третьего поколения Oxford Nanopore Technologies (ONT) являются одним из самых последних дополнений к технологиям секвенирования следующего поколения. Нанопоровое секвенирование основано на пропускании молекул ДНК или РНК через белковую пору, встроенную в электрически устойчивую мембрану (Segerman, 2020). Когда молекула ДНК проходит через нанопору, она вызывает изменения ионного тока, которое можно использовать для определения последовательности, а также модификации оснований (Heather, Chain, 2016).

Идея использования нанопор восходит к концу 1980-х и началу 1990-х годов, к работам нескольких групп, опубликовавших ключевые исследования и патенты (Deamer et al., 2016). Впервые о MinION было объявлено на конференции Advances in Genome Biology and Technology (AGBT) во Флориде в феврале 2012 года. Однако, первый прототип MinION был выпущен в 2014 году (Bentley, 2014).

В настоящее время с использованием технологий нанопорового секвенирования был расшифрован геном *V. rotundifolia*. За два запуска было получено 10 млрд п.о., с общим количеством контигов 197,931 N50 11,360 и перекрытие составило 20x (Агаханов и др., 2021; Агаханов, Ульянич, 2020). В задачи настоящей работы входило полногеномное секвенирование с использованием нанопорового секвенатора Oxford Nanopore Technologies (ONT) MinION с использованием двух проточных ячеек типа R9.4.1. Кроме того, мы изучали генетическое родство гибридов F₁, генетическое разнообразие.

1.5. Сохранение образцов винограда в дублетных коллекциях

Виноград относится к вегетативно размножаемым культурам. В генбанках и научных организациях во всем мире принято сохранять агробиоразнообразие вегетативно размножаемых культур в виде трех типов коллекций: полевых (*ex situ*), *in vitro*, *cryo* – для надежного длительного хранения генофонда (Дунаева и др., 2012; Полулях и др., 2017; Батукаев и др., 2018; Батукаев, Шишхаева 2018; Дунаева и др., 2019).

Сохранение и поддержание *ex situ* образцов ампелографической коллекции представляет определенные трудности в связи дороговизной и сложным обслуживанием из-за различной степени устойчивости сортов к патогенам, вредителям и различными особенностями их физиологии, а также неодинаковой требовательностью к температурному режиму и почвам

(Elgelmann 1997; Pathirana et al., 2016; Gisbert, 2018). Например, выращивание сортов европейско-азиатского винограда восточной группы в условиях влажного климата Краснодарского края связано с сильными повреждениями из-за болезней и вредителей, а также низких зимних температур в этом регионе (Кислин и др., 2015). С другой стороны, содержание коллекции сортов, полученных при участии винограда амурского (*V. amurensis*), в южных регионах сопряжено с проблемой короткого периода покоя этого вида, в результате чего при постоянных зимних оттепелях почки таких растений начинают преждевременно прорастать и затем повреждаются возвратными заморозками (Кислин и др., 2015).

Более современным способом сохранения генофонда являются контролируемые условия. Например, в национальном хранилище клональной зародышевой плазмы плодовых и ореховых культур и винограда Министерства сельского хозяйства США и Службы сельскохозяйственных исследований (USDA-ARS) в Дэвисе (Калифорния, США) поддерживают коллекцию одного из самых разнообразных генофондов видов рода *Vitis* в мире, представленный 42 таксонами. Там сосредоточены 3649 уникальных образцов винограда, которые содержат в виде двух дублетов *ex situ* и *in vitro* (Prins et al., 2021).

Коллекции *in vitro* представляют собой альтернативу полевым коллекциям для кратковременного и среднесрочного хранения гермоплазмы (Maia et al., 2015; Hassanen et al., 2013; Hassan et al., 2013). Методы *in vitro* играют важную роль в стратегии сохранения *ex situ* исчезающих видов (Blakesley et al., 1996). Например, для сохранения бразильских редких видов, находящихся под угрозой исчезновения, были разработаны и апробированы методы проращивания семян в культуре *in vitro*, микроразмножения, соматического эмбриогенеза, культивирования соматических эмбрионов и каллуса (Pilatti et al., 2011).

Методы *in vitro*, используемые для достижения среднесрочного сохранения, позволяют хранить биологический материал от нескольких месяцев до 2–3 лет без пересадок, в зависимости от используемого метода и растительного материала (Cruz-Cruz et al., 2013).

Кроме того, этот метод позволяет получать оздоровленный материал. Известно, что виноград может поражаться различными фитопатогенами, такими как грибы, бактерии, вирусы, вириды и фитоплазмы. Наиболее опасными среди грибных патогенов являются: оидиум (*Uncinula necator* Burill.), милдью (*Plasmopara viticola* Berl.), гнили (*Botrytis cinerea* Pers., *Coniothyrium diplodiella* Sacc., *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* и др.), фомопсис (*Phomopsis viticola* Sacc.), фузариозы (*F. sporotrichioides* Sherb, *F. chlamydosporum* Woll. et Rein., *F. moniliforme* Sheld., *F. oxysporum* Schlecht.), антракноз (*Gloeosporium ampelophagum* Sacc.) (Úrbez-Torres et al., 2013). Особенности вызываемых ими заболеваний и существующей практики борьбы с ними представлены в ряде обзорных публикаций (Brum et al., 2012; Mondello et al., 2018).

Оздоровление и поддержание оздоровленного материала в условиях, свободных от грибных и бактериальных патогенов, вирусной инфекции, нематод и филлоксеры осуществляют с помощью различных методов: отбор и тестирование визуально здоровых растений, термотерапия, криотерапия, химиотерапия, комплексная терапия, также применяют метод культуры апикальных меристем (Panattoni et al., 2007; Panattoni, Triolo, 2007; Abdullahi et al., 2009; Křizan et al., 2009; Maliogka et al., 2009; Skiada et al., 2009). Однако, поддержание *in vitro* коллекции имеет ряд недостатков: этот метод трудоемок, требует профессиональных навыков, сопряжен с риском микробного загрязнения и генетической нестабильности (Дунаева и др., 2007; Kulus, Zalewska 2014; Dalla Costa et al., 2019; Panis et al., 2020).

В настоящее время стандартов культивирования *in vitro* винограда не разработано, однако поиски оптимальных условий микроразмножения продолжаются по всему миру: в Австралии (Barlass, Skene, 1980); Африке - Египет (Mostafa, 2015), Эфиопии (Kinfe et al., 2017; Kumsa, 2020); Европе – России (Батукаев, Эдиев 2013; Браткова, Цаценко 2015; Ребров, 2016; Пузырнова, 2021), Испании (San Pedro et al., 2017), Болгарии (Yancheva et al., 2018); Азии –Индия (Singh, Brar 1993; Said Ahmad et al., 2020), Казахстан (Kazybayeva et al., 2020); Америке – США (Gray, Benton, 1991). В таблице 6 представлены наиболее часто применяемые фитогормоны для введения в культуру *in vitro* на этапе размножения.

Таблица 6 – Варианты питательной среды для культивирования винограда *in vitro*

Вид	Число генотипов	Минеральная основа	Регуляторы роста, мг/л	% выживаемости	Ссылка
<i>V.vinifera</i>	10	МС	0,5 БАП	65-100	Ребров, 2016
<i>V.vinifera</i>	8	МС	1 БАП	40-60	Батукаев и Эдиев, 2013
<i>V. lubrasca / V.vinifera</i>	4	МС	1-2 БАП	85-87	Mostafa, 2015
			1-2 БАП+ 0,01НУК	89-93	
			1-2 кинетин	58-59	
			1-2 кинетин + 0,01НУК	63-64	
<i>V.vinifera</i>	7	МС	1 БАП+ 0,2 ИМК + 1 ГК	70	Kazybayeva et al., 2020
			1-1,5-2 БАП+0,2-0,1-0,5 ИМК	63	
		½ МС	0,1 БАП+0,1ИМК + 25 PVP	77	
			0,5БАП + 0,1ИМК	80	
		¾ МС -½ МС	0,5-1 БАП + 0,1-0,2ИМК	80-79	
<i>V.vinifera</i>	1	МС	0-0,5-1-1,5-2 БАП	37-78-96-89-85	Tarinejad, 2019
<i>V.vinifera</i>	10	МС1/Ялта-МС1/Крымс-МС1 жид.	-	21-44-44	Браткова, Цаценко, 2015
		МС1-1 мод.-	6-БАП 0,5 мг/л	23,6	
		МС1-2 мод.	0,1 мг/л ИУК и 1,5 мг/л БАП	45,2	

Как видно из таблицы, для введения в культуру *in vitro* и микроразмножения различных генотипов винограда большинство авторов применяют такие регуляторы роста, как БАП, ИМК, кинетин в разных сочетаниях в зависимости от генотипа.

В настоящее время в ВИР апробированы и усовершенствованы протоколы размножения и оздоровления вегетативно размножаемых культур: картофеля (Антонова и др., 2017; Ухатова, 2017; Беспалова и др., 2020) малины (Антонова и др., 2015; Ухатова, 2017), а с 2018 года начаты в рамках настоящего диссертационного исследования работы по инициации культуры *in vitro* винограда (Агаханов, Ухатова, 2019). В настоящее время *in vitro* коллекция ВИР является одной из самых крупных в Европе дублетных коллекций образцов плодовых вегетативно размножаемых культур и составляет более 1000 образцов, включая представителей родов *Rubus*, *Ribes*, *Fragaria*, *Lonicera*, *Sorbus*, *Cerasus*, *Prunus*. Кроме среднесрочного хранения в настоящее время используют метод длительного хранения – криоконсервацию, которая является

единственным доступным методом, обеспечивающим безопасное и рентабельное долгосрочное хранение зародышевой плазмы вегетативно размножаемых культур (Engelmann, 2011). Протоколы по длительному хранению разработаны и внедрены для многих коллекций вегетативно размножаемых культур в мире (Panis et al., 2020; Wang et al., 2018; Panis, 2019; Agrawal et al., 2019; Malik, Chaudhury, 2019; Jenderek, Reed, 2017; Keller et al., 2016; Kim et al., 2012; Vollmer et al., 2017), в том числе – для сохранения образцов коллекции ВИР. В настоящее время ВИРе проводится изучение посткриогенной жизнеспособности пыльцы (Орлова и др., 2019; Тихонова и др., 2020), черенков (Павлов и др., 2019), меристем (Ukhatova et al., 2017; Ухатова, 2017, Беспалова и др., 2019) показано, что криоконсервация является надежным способом длительного хранения вегетативно размножаемых культур (Ухатова, Гавриленко, 2019; Gavrilenko et al., 2019; Verzhuk et al., 2020; Ефремова и др., 2021).

Криоконсервация винограда была описана еще в 1990-х годах, однако криохранилище представителей рода *Vitis* было сложным и не получило широкого распространения в генных банках (Bi et al., 2018; Volk et al., 2018; Bettoni et al., 2019; Bettoni et al., 2019; Bettoni et al., 2019). Подробный обзор о криоконсервации образцов винограда с 1989 по 2021 год различными способами опубликован в 2021 г. (Bettoni et al., 2021). Из обзора следует, что в экспериментах по криоконсервации исследованы единичные генотипы винограда, при этом с 2013 года отмечен рост объемов выборок, криоконсервированных с применением метода капель-витрификации. Результативность микроразмножения образцов винограда в перспективе станет основой для создания криоколлекции.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материал исследований

Исходным материалом для исследований послужила выборка из 85 образцов винограда: 84 из ампелографической коллекции, сохраняемой в условиях ДОС ВИР и один образец североамериканского вида *V. rotundifolia* – сорт ‘Dixie’, поддерживаемый *ex situ* на КрОСС ВИР. Характеристика изученного материала представлена в приложении 1. Изученные образцы были любезно предоставлены куратором ампелографической коллекции к.с.-х.н. КрОСС ВИР В. А. Носульчаком и специалистом ДОС ВИР Н.К. Казаровым.

Фенологические и молекулярно-генетические исследования были проведены на выборке из 73 образцов ампелографической коллекции ДОС ВИР.

Для гибридизации использовали девять автохтонных сортов из ампелографической коллекции ДОС ВИР.

Полногеномный анализ был проведен на сорте ‘Dixie’ североамериканского вида *V. rotundifolia*.

Для инициации работ по созданию *in vitro* коллекции винограда использовали десять сортов *V. vinifera*.

2.2 Фенологические наблюдения образцов винограда

Фенологические наблюдения были проведены в 2018-2020 годах согласно методическим рекомендациям 1978 года Всероссийского научно-исследовательского института виноградарства и виноделия (ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко). В процессе фенологических исследований отмечали следующие фазы: начало сокодвижения, начало распускания почек, начало цветения, массовое цветение, конец цветения, начало созревания ягод, полную зрелость ягод, силу роста. Исследование проводили на 73 генотипах винограда (приложение 1), относящихся к разным эколого-географическим группам.

2.3 Оценка образцов коллекции по устойчивости к грибным заболеваниям

Оценку устойчивости проводили по девятибалльной шкале: 1 балл – очень низкая степень устойчивости; 3 балла – низкая степень устойчивости; 5 – средняя степень устойчивости; 7 баллов – высокая степень устойчивости; 9 баллов – абсолютная устойчивость (OIV). Методика разработана тремя организациями OIV (Международная организация винограда и вина), UPOV (Международный союз по защите достижений растениеводства) и IBPGR (Международная комиссия по генетическим ресурсам растений), переименованная впоследствии в IPGRI

(Международный институт генетических ресурсов растений). Кроме того, проводили расчет показателей тепло-влажностности межфазных периодов для изучаемых образцов в период активной вегетации: сумма активных температур выше 10°C, средняя температура, сумма осадков.

2.4. Получение и описание гибридов

Для проведения гибридологического анализа выполнены серии скрещиваний на ДОС ВИР. В таблице 7 представлена схема гибридизации. В качестве родительских форм были использованы: автохтонный образец ‘Кара яй изюм’ (♂), демонстрирующий устойчивость к обоим заболеваниям (милдью, оидиуму) на высоких инфекционных фонах, и выявленные в результате оценки образцов коллекции неустойчивые формы с женским типом цветка (♀).

Таблица 7 – Гибридные комбинации, включенные в изучение на ДОС ВИР в 2019 г.

Отцовская форма ♂	Материнская форма ♀
‘Кара яй изюм’	‘Альзуб’
‘Кара яй изюм’	‘Джунга’
‘Кара яй изюм’	‘Аг чакракар’
‘Кара яй изюм’	‘Коз узюм’
‘Кара яй изюм’	‘Чол бер’
‘Кара яй изюм’	‘Махбор цибил’
‘Кара яй изюм’	‘Гимра’
‘Кара яй изюм’	‘Ири тумут’

Опыление проводили при помощи кисточки в утренние часы – в интервале с 6 до 10 часов. Для гибридизации отбирали кусты с крупными соцветиями, затем на них надевали изоляторы из пергаментной бумаги с целью предотвращения случайного переопыления. Для скрещиваний использовали пыльцу от образца ♂ ‘Кара яй изюм’. Перед скрещиванием проводили нормировку или прореживание, оставляя до 50 процентов цветков в соцветии. Убирали из соцветия мелкие бутоны, располагающиеся на конце соцветия и наиболее крупные бутоны, близкие к цветению, затем надевали изолятор. Затем через 4-5 дней снимали изолятор и проверяли рыльца на принятие пыльцы, что узнается по выделению на них капелек, а также и по расцветанию бутонов некастрированных соцветий (Бужин, 1937; Ларькина и др., 2015). Полученные гибридные ягоды оставляли на кустах до полного вызревания семян. Перед посевом проводили стратификацию. Затем более 200 семян с каждого скрещивания равномерно укладывали на фильтровальную бумагу в чашке Петри, наливали по 5 мл дистиллированной воды 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. В конце апреля сеянцы с 3-5 настоящими листками были пересажены в открытый грунт, расстояние между бороздами - 30 см, между сеянцами – 15 см. В 2021 году проведена оценка устойчивости гибридов F₁ к грибным заболеваниям на естественных инфекционных фонах и SSR-анализ с использованием 10 микросателлитных праймеров. Проведение молекулярно-генетического анализа структуры популяции описано в разделе 2.4.2.6.

2.5 Молекулярно-генетические исследования

2.5.1 Генотипирование образцов *V. vinifera*

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*.

Для коллекции *ex situ* генетическая оценка разнообразия образцов важна, поскольку ранее для коллекции ВИР использовали для распознавания сортов винограда только традиционные методы, основанные на морфологической оценке признаков.

Задача исследования состояла в том, чтобы оценить уровень полиморфизма восьми микросателлитных локусов, ранее рекомендованных для целей сортовой идентификации у винограда, и включала 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 были использованы образцы из ампелографической коллекции филиала ДОС ВИР.

2.5.1.1 Выделение ДНК

ДНК выделяли 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 (Axygen, 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 течение 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 течение 15 мин при температуре 20°C и 10000 об/мин. После центрифугирования верхнюю водную фазу переносили в стерильные пробирки объемом 2 мл. ДНК осаждали из водной фазы добавлением 200 мкл ледяного изопропанола. Затем, пробирки охлаждали при – 20°C в морозильной камере в течение 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 TE буфера – 10 мМ трис- HCl (pH 8,0) и 1 мМ ЭДТА (pH 8,0). В раствор ДНК добавляли 0,2 мкл РНКазы (10 мг/мл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Далее, в раствор добавляли 80 мкл 7,5М ацетата аммония (pH 7,7) и охлаждали на льду в течение 20 мин. Смесь центрифугировали в течение 15 мин при 12000 об/мин и 4°C. После центрифугирования супернатант переносили в стерильные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и ДНК повторно осаждали 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 TE буфера. Полученную ДНК оценивали на нано-спектрофотометре Implen N60 (Германия). Качество проверяли электрофорезом в 1% -ном агарозном геле.

2.5.1.2 Постановка ПЦР

Для анализа филогенетических взаимоотношений видов *Vitis* и внутривидового разнообразия использовали восемь микросателлитных локусов: scu 11 vv, scu 15 vv, vvs 2, vvmd 27, vvmd 31, vvih 54, vvip 31, vvib 01 (табл. 8), с флуоресцентными метками на 5' концах прямых праймеров. Для каждой пары праймеров подбирался термальный режим с учетом их нуклеотидного состава в соответствии с рекомендациями разработчиков. Кроме того, была подобрана программа амплификации при помощи Syber Green (табл. 9). 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), содержащую 2 мкл 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, 0,5мкл Taq полимеразы (5 е.а./мкл), 18мкл ddH₂O (Диалат Лтд).

Таблица 8 – SSR-локусы, использованные для изучения генетического разнообразия винограда и гибридной популяции на наличие генетического засорения

Локус	5'–3' последовательность прямого праймера	5'–3' последовательность обратного праймера	Мотив	Размер аллелей	Расположе ние локуса (на хромосоме)	Ссылки
1	2	3	4	6	7	8
scu 10vv	TACCCACACA 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 CAGACCAAA AAC	TTGGAAGTAG CCAGCCCAAC CTTC	(CAA)n	174- 194	14	Scot et al., 2000
vvs 2	CAGCCCGTAA ATGTATCCAT C	AAATTCAAAA TTCTAATTCAA CTGG	(CA)n	129- 155	11	Thomas et al., 1993
vvs 3	CAGCCCGTAA ATGTATCCAT C	AAATTCAAAA TTCTAATTCAA CTGG	(GTAT) ₄ (G T) ₆	190- 448	2	Thomas et al., 1993
vvmd 5	CTAGAGCTAC GCCAATCCAA	TATACCAAAA ATCATATTCCT AAA	(CT)nAT(C T)nATAG(AT)n	239- 279	16	Bowers et al., 1996

vvmd 6	ATCTCTAACC CTAAAACCAT	CTGTGCTAAGA CGAAGAAGA	(CT) _n C(CT)) _n TTAG(C T)TAAT(C T) _n C(CT) _n C(CT) _n	180- 199	7	Bowers et al., 1996
vvmd 27	GTACCAGATC TGAATACATC CGTAAGT	ACGGGTATAG AGCAAACGGT GT	(CT) _n	173- 194	5	Bowers et al., 1999a
vvmd 31	CAGTGTTTT CTTAAAGTTT CAAGG	CTCTGTGAAAG AGGAAGAGAC GC	(CT) _n	196- 224	7	Bowers et al., 1999b
vvih 54	CCGCACTTGT GTTGAATTTC AG	CAAACCGTTTT TACACCAGCA G	(GA) _n	139- 177	13	Merdino glu et al., 2005
vvip 31	TATCCAAGAG ACAAATTCCC AC	TTCTCTTGTTT CCTGCAAATG G	(GA) _n	173- 196	19	Merdino glu et al., 2005
vvib 01	TGACCCTCGA CCTTAAAATC TT	TGGTGAGTGC AATGATAGTA GA	(CT) _n	294- 312	2	Merdino glu et al., 2005
vviv 67	TATAACTTCT CATAGGGTTT CC	TTGGAGTCCAT CAAATTCATCT	(CA) _n AT(C A) _n (GA) _n T T(GA) _n (AG) _n	352- 383	15	Merdino glu et al., 2005
udv 107	GGAAAAGGA CACAAAAGT AGCAA	CAGAATACCG CCAGTTGGTT	(CT) _n (CA) _n (TA) _n	146- 171	9	Di Gaspero et al., 2005

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле и окрашивали 0,05% раствором бромистого этидия. Гели документировали с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ (BioRad США) в ультрафиолетовом свете. Для оценки размера полученных фрагментов использовали ДНК-маркеры Gene Ruler 100 bp and 1kb DNA Ladders (Fermentas США).

Таблица 9 – Протоколы амплификации для использованных праймеров

Праймер	Программа	
vvmd 5	Денатурация	95°C – 5 мин
	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
	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
	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
	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 vvih 54 udv 107	Денатурация	95°C – 5 мин
	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 vvib 01	Денатурация	95°C – 5 мин
	Отжиг праймеров (30 циклов)	95°C – 1 мин 52°C – 1 мин 72°C – 30 сек
	Элонгация	72°C – 7 мин
	Охлаждение	4 °C – ∞
vvs 2	Денатурация	95°C – 5 мин
	Отжиг праймеров в режиме touchdown	94 °C – 50 сек 62–57°C с понижением температуры отжига на 1°C за каждый цикл 72 °C – 1 мин (5 циклов) 94 °C – 50 сек 57 °C – 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 – ∞

2.5.1.3 Проведение электрофореза в агарозном геле

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

2.5.1.4 Анализ размеров амплифицированных фрагментов

Анализ размеров амплифицированных фрагментов проводили на генетических анализаторах НАНОФОР 05 (ИАП РАН, Россия), Applied Biosystems 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 Ni-Di формамида (Thermo Fisher, США). Смесь денатурировали при 95 °С 5 мин и охлаждали во льду. Размеры фрагментов ДНК определяли с использованием аналитического программного обеспечения GeneScan™ версии 3.1 (Applied Biosystems) и PeakScanner Software 2.0.

Для обработки полученной информации о размерах локусов и анализа структуры популяций использовалось программное обеспечение Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), а также RStudio. Анализ в Structure 2.3.4 проводился с использованием следующих параметров: burn-inperiod 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, у всех проанализированных генотипов в выборке. Показатели

полиморфизма локусов в выборке определяли с использованием программы GenAlEx 6.2 (Peakall, Smouse, 2006).

2.5.2 Полногеномное секвенирование с использованием нанопорового секвенатора MinION (Oxford Nanopore Technologies)

Одним из уникальных источников генов устойчивости к оидиуму и милдью для селекции винограда является североамериканский вид *V. rotundifolia*, относящийся к подроду *Muscadinia*. Многие систематики рассматривают *Muscadinia* в качестве самостоятельного рода, соответственно, в литературе распространено альтернативное название вида – *Muscadinia rotundifolia*. 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 задачу работы входило полногеномное секвенирование и сборка нуклеотидных последовательностей для получения информации о геноме донора генов устойчивости – сорта 'Dixie' вида *V. rotundifolia*.

2.5.2.1 Выделение ДНК для полногеномного секвенирования. Проверка качества и концентраций выделенной ДНК

ДНК выделяли из молодых лиофилизированных листьев с использованием коммерческого набора DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Разрушение клеточной стенки в листьях осуществляли с использованием жидкого азота и гомогенизатора Tissue Lyser LT (Qiagen). Целостность выделенной ДНК оценивали в 1% агарозном геле, качество ДНК оценивали с использованием спектрофотометра NanoDrop One (Thermo FS). Концентрацию ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 4 (Thermo FS).

2.5.2.2 Подготовка библиотек для секвенирования на платформе MinION

Исследование проводили в лаборатории мониторинга генетической эрозии растительных ресурсов растений ВИР. Секвенирование производили 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, пошаговый протокол выделения ДНК и сборки библиотеки библиотеки (приложение 7). Ожидаемый размер фрагментов составил 10 000 пн и 12 000 пн для первой и второй библиотек соответственно. Запуск секвенатора MinION (Oxford Nanopore Technologies) осуществлялся с использованием двух проточных ячеек типа R9.4.1. Перед запуском проводили диагностику ячеек с целью контроля их качества.

2.5.2.3 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 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 ruseQC (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, определяемые по показателю Phred ≤ 8 , и чтения длиной менее 500 пн были отфильтрованы с помощью NanoFilt (De Coster et al., 2018).

2.5.2.4 Полногеномная сборка образца вида *V. rotundifolia* – сорта ‘Dixie’ – методом *de novo* для данных ONT и сборка гибридным методом

Для сборки генома методом *de novo* применялся алгоритм (pipeline) minimap2 - miniasm (Li, 2016), который является одним из наиболее широко используемых при сборке длинных прочтений, и подразумевает последовательное выполнение нескольких этапов (рис 6). Однако алгоритм minimap2 -miniasm не включает в себя шаг корректировки возможных ошибок прочтений, полученных с MinION. Кроме того, при использовании только чтений с MinION при сборке *de novo* 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 (Vaser et al., 2017) и Pilon (Walker et al., 2014) (рис. 9). 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 (*V. 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.

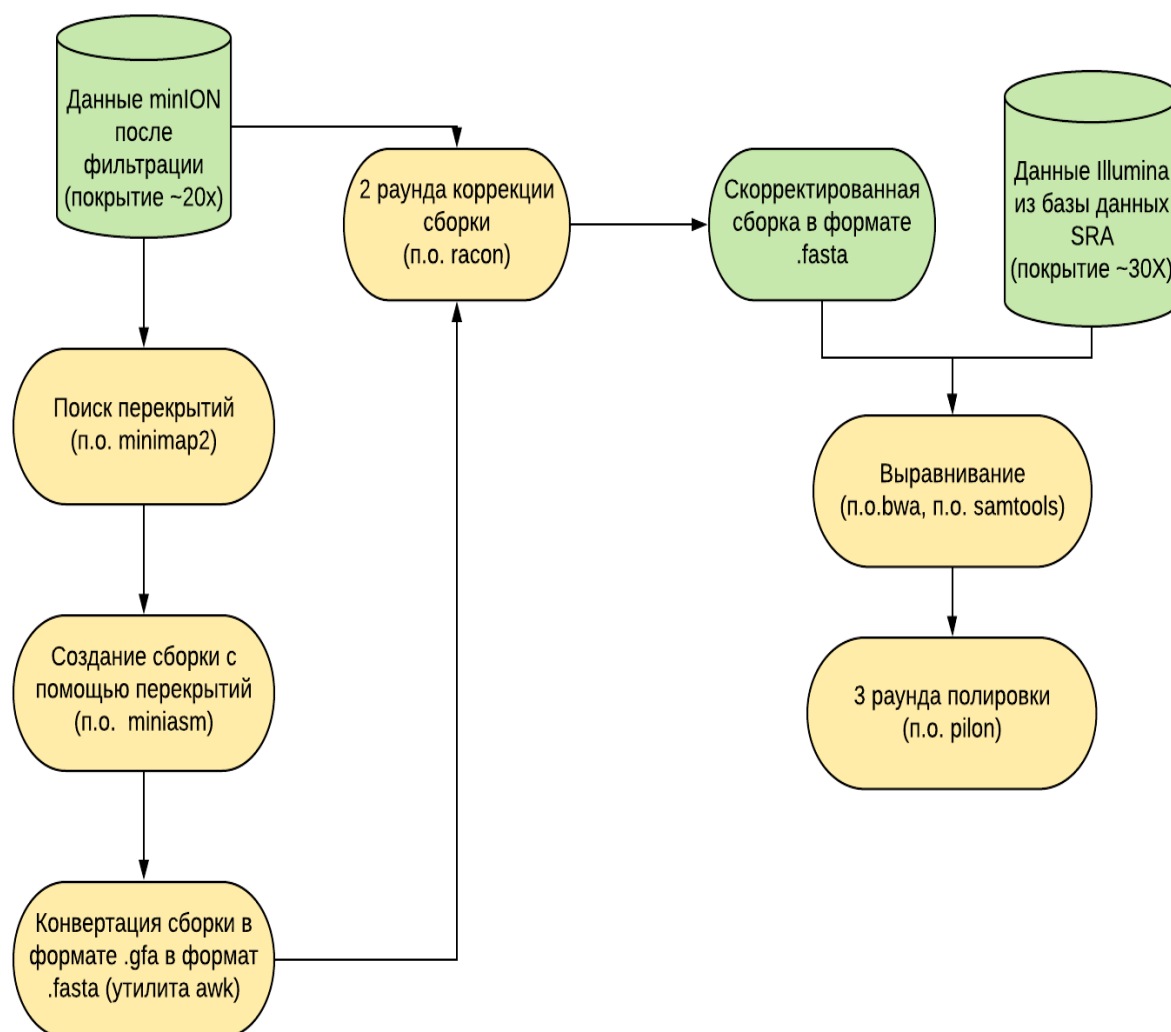


Рисунок 9 – Схема процесса (pipeline) сборки генома образца вида *V. rotundifolia* методом *de novo* по результатам секвенирования на MinION с использованием программы minimap2 – miniasm

Дополнительно был применен альтернативный подход к получению полногеномной сборки *de novo* образца вида *V. rotundifolia* – гибридным методом. Этот метод подразумевает изначальное комбинирование коротких и длинных прочтений, которое выполняет программа SPAdes (hybrid SPAdes) (Antipov et al., 2016). Как и в предыдущем случае, были использованы ранее опубликованные короткие риды с Illumina HiSeq2500, (SRX2868329: WGS of Muscadine Grape (*V. rotundifolia*)), 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).

2.5.2.5 Оценка качества полногеномной сборки *V. rotundifolia*

Для оценки качества сборки и ее фрагментированности полногеномная сборка образца вида *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» (Complete BUSCOs). 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.

2.5.2.6. Молекулярно-генетический анализ гибридов

Была проведена проверка 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). Полученную ДНК оценивали на наноспектрофотометре Implen N60 (Германия). Качество проверяли электрофорезом в 1% -ном агарозном геле.

Для амплификации использовали праймеры к десяти микросателлитным локусам scu 10vv, scu 11 vv, scu 15 vv, udv 107, vvib 01, vvip 31, vviv 67, vvs 3, vvmd5, vvmd6 (табл. 8), 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 таблице 9.

Продукты амплификации детектировали с помощью генетическом анализаторе Applied Biosystems 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- Di формамида (Thermo Fisher, 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.

2.6 Изучение винограда в культуре *in vitro*

Исследование проводили на 10 генотипах винограда Дагестанской ампелографической коллекции ДОС ВИР, у которых ранее была изучена генетическая структура происхождения (Агаханов и др., 2019). По происхождению эти сорта относятся к разным эколого-географическим группам и активно используются для промышленных насаждений и в селекции,

для создания высокопродуктивных и устойчивых сортов. Характеристика изученного материала представлена в приложении 1. В качестве физиологически активных веществ были выбраны регуляторы роста гиббереллиновая кислота (ГК), индолил-3-масляная кислота (ИМК), 6-бензиламинопурин (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 шейкере или периодически встряхивали вручную. Почки растений стерилизовали 15-20 минут (Ухатова, 2017). Затем под биноклем в ламинар-боксе вычленили меристемы в стерильных условиях. После отделения меристематической верхушки скальпелем ее на кончике иглы помещали на питательную среду таким образом, чтобы не нарушить полярность, а затем переносили в световую комнату с освещенностью 3000-4000 люкс, температурой 23 - 27°С, относительной влажностью воздуха 65 - 70%. Исследовали следующие концентрации и сочетания фитогормонов (табл. 10).

Таблица 10 – Состав изучаемых питательных сред для введения в культуру *in vitro* винограда

№	Питательная среда	Фитогормоны		
		БАП	Кинетин	ИМК
1	МС стандарт*	0,5 мг/л	-	-
2		1 мг/л	-	-
3		1,5 мг/л	-	0,2
4		-	1 мг/л	-
5		-	1,5 мг/л	0,1

*МС стандарт – базовый состав питательной среды по прописи Murashige, Scoog, 1962.

Для введения в культуру *in vitro* использовали питательную среду МС с добавлением гормонов БАП, кинетин, ИМК, которые ранее были рекомендованы (табл. 10)

2.7 Статистическая обработка результатов

Опыты проводили в трехкратной повторности. Статистическая обработка данных проведена с использованием пакетов прикладных программ MS Excel, Statistica 13. Связь показателей устойчивости исследована коэффициентом ранговой корреляции Спирмена. Влияние происхождения исследовано критерием Краскела-Уоллиса (непараметрический аналог дисперсионного анализа). Проведен анализ полиморфизма полевой выборки методом главных компонент (PCA). Сравнение морфометрических показателей образцов *in vitro* проводили методом дисперсионного анализа. В исследовании принят уровень значимости 5%.

Для обработки полученной информации о размерах локусов и анализа структуры популяций использовали программное обеспечение Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), а также RStudio. Анализ в Structure 2.3.4 проводили с использованием следующих параметров: burn-inperiod 100 000, MCMC 600 000, admixture model, вероятное количество кластеров указывалось от 2 до 15.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Фенологические исследования

В данном исследовании регистрировали: фенодаты, продолжительности феноинтервалов, сумма активных температур выше 10°C, устойчивость побегов и гроздей к милдью (балл), оидиуму (балл), силу роста (балл). При характеристике сортов за три года изучения взяты также значения устойчивости (табл. 11, приложение 6).

Таблица 11 – Изучение признаков устойчивости к грибным заболеваниям и фенологические наблюдения ампелографической коллекции ВИР за 3 года исследований

Показатель	Единица измерения	Mean 2018-2020	Minimum 2020	Maximum 2020
Сила роста	Балл	5.6	1.7	9.0
Оидиум/листьев	Балл	2.8	1.0	9.0
Оидиум/гроздей	Балл	3.5	1.0	9.0
Милдью	Балл	2.8	1.0	9.0
Милдью гроздей	Балл	4.3	1.7	9.0
Начало сокодвижения	Дата	25.03	16.03	04.04
Начало распускания почек	Дата	10.04	6.04	16.04.
Начало цветения:	Дата	02.06	25.05	7.06
Массовое цветение	Дата	04.06	27.05	06.06
Конец цветения	Дата	07.06	03.06	17.06
Начало созревания	Дата	12.08	03.07	30.08
Полное созревание	Дата	10.09	19.07	15.10.
Начало распускания почек - полная зрелость ягод	Количество дней	138.7	92.0	185.0
Суммы активных температур выше 10°C	Температура	3371.2	2057.8	3723.1

По продолжительности периода от начала распускания почек до полной зрелости ягод – от 96 до 185 сут., т.е. по (Code des caracteres descriptifs des varietes et especes de Vitis. – Paris: Office international de la vigne et dti vin (OIV), 1983. - 56 p.) представлены сорта всех сроков созревания – от сверхранних до очень поздних. В нашу выборку входили сверхранние сорта с продолжительностью созревания 95-105 дней, очень ранние (105-115 дней), ранние (115-120 дней), ранние-средние (120-125 дней), средние (125-135 дней), средние поздние (135-145 дней),

поздние от начала – до второй декады декабря (более 145 дней). Сумма активных температур выше 10°C варьировала от 2057.8 до 3723°C.

3.2 Оценка устойчивости к болезням

Анализ устойчивости, проявленной образцами за три года, показал, что 93% образцов изученной выборки восприимчивы к поражению милдью и оидиумом в средней и высокой степени, но были обнаружены устойчивые генотипы (рис. 10).

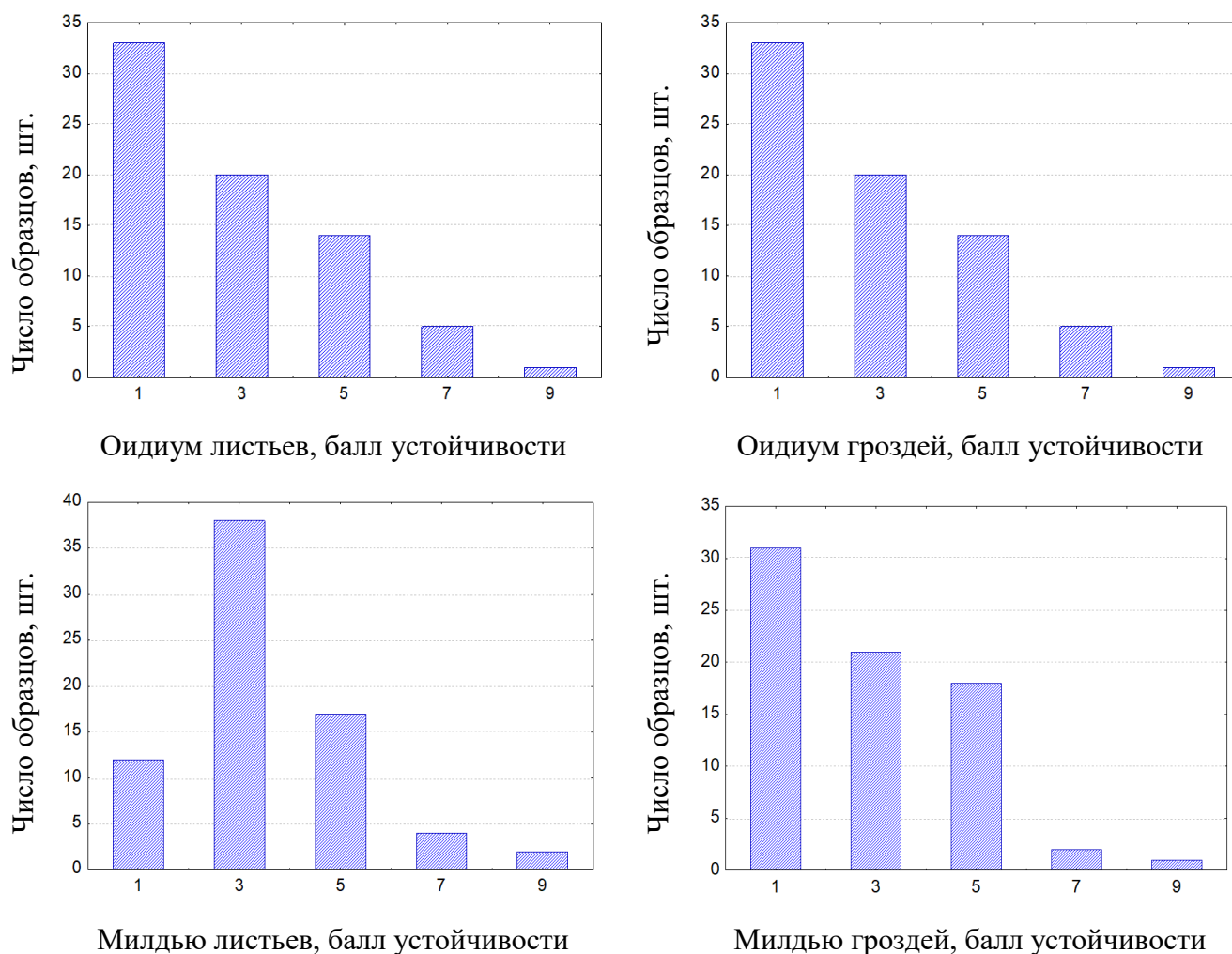


Рисунок 10 – Оценка устойчивости коллекционных образцов винограда к милдью и оидиуму ДОС ВИР, 2020г.

Примечание: по оси Y – число изученных образцов, ось X – балл оценки устойчивости (Согласно шкале OIV, 2009)

Анализ устойчивости ампелографической коллекции за три года показал:

- Очень сильное поражение (1 балл) к оидиуму листьев наблюдалась у 33 образцов (45,2%) оидиум листьев, оидиум гроздей 1 балл 29 образца (%), милдью листьев 12 образца (%), милдью гроздей у 31 образца (%).
- Сильное поражение (3 балла) к оидиуму листьев отмечено у 20 образцов (27%), оидиуму гроздей 23 образца (32%), милдью листьев 36 образцов (49 %), милдью гроздей у 21 образца (29%).
- Среднюю степень устойчивости (5 баллов) к оидиуму листьев проявили 14 сортов (19%), оидиуму гроздей у 15 сортов (21%), милдью листьев у 17 сортов (23 %), милдью гроздей у 18 сортов (25%)
- Высокая степень устойчивости (7 баллов) к оидиуму листьев наблюдалось у 5 сортов (7%), оидиуму гроздей 1 сорт, милдью листьев у 4 сортов (5 %), милдью гроздей у 3 сортов (4%).
- Абсолютную устойчивость (9 баллов) к грибным заболеваниям по всем показателям во все годы исследования отметили у сорта 'Кара яй изюм'.

В результате оценки выявлены высоко устойчивые к оидиуму листьев образцы ('Виерул-59', 'Шоколадный', 'Грочанка', 'Ливадийский черный', 'Слава Дербента') и сорт, устойчивый к оидиуму гроздей ('Шоколадный'). Кроме того, отмечены сорта с высокой степенью устойчивости к милдью листьев ('Йорк Мадера', 'Варюшкин', 'Шоколадный', 'Грочанка', 'Дунавезки лазул') и к милдью гроздей ('Грочанка', 'Дунавезки лазул').

Далее автохтонный устойчивый образец 'Кара яй изюм' был использован в качестве отцовской формы в скрещиваниях с неустойчивыми сортами с женским типом цветка с целью создания гибридных популяций F₁ в качестве нового исходного материала для последующего изучения и использования в селекции.

Из данного списка 73 образца был исключен один образец неизвестного происхождения. Сравнили силу роста и устойчивость групп различного происхождения (рис. 11, приложение 3). Критерий Краскела-Уоллиса показал, что между группами есть достоверные различия по силе роста и всем показателям устойчивости: сила роста ($p=0,004$), устойчивость листьев к оидиуму ($p=0,001$), устойчивость гроздей к оидиуму ($p=0,001$), устойчивость листьев к милдью ($p=0,002$), устойчивость гроздей к милдью ($p=0,000$).

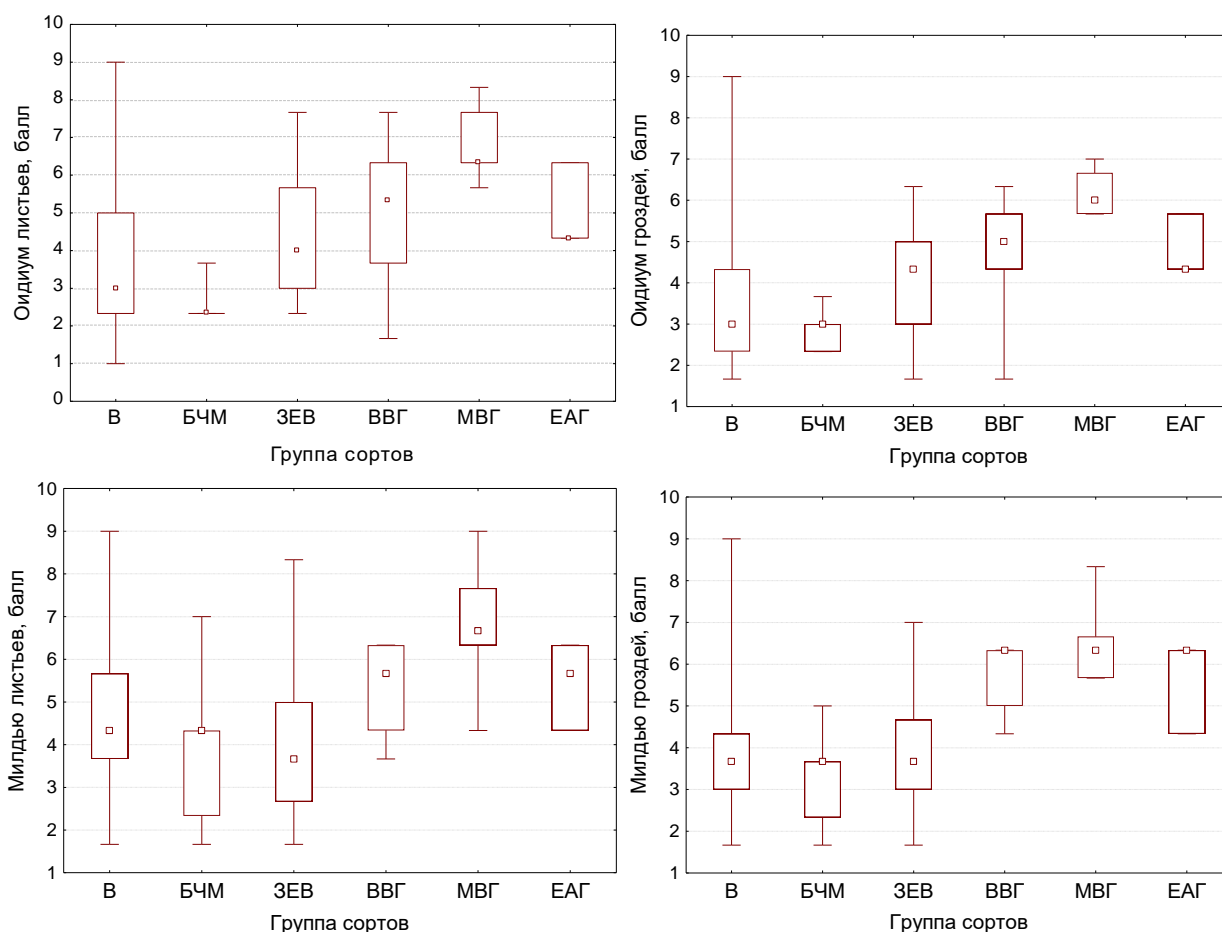


Рисунок 11 – Характеристики групп образцов различного происхождения, по устойчивости к оидиуму и милдью (баллы)

Примечание: данные получены для 72 сортов винограда. Группы сортов по происхождению: В – восточная группа, БЧМ – Бассейн черного моря, ЗЕВ – Западно-Европейская группа, ВВГ – внутривидовые гибриды, МВГ – межвидовые гибриды, ЕАГ – европейско-азиатские гибриды. Значения, отмеченные одинаковыми буквами, статистически достоверно не отличаются ($p < 0,05$)

Апостериорным анализом установлено, что наивысший балл устойчивости к оидиуму листьев имеет группа МВГ (6.8), достоверно ($p < 0,05$) превышая группы БЧМ (2.6) и В (3.8), по устойчивости оидиуму гроздей наибольшая устойчивость (6.2) у образцов из группы МВГ, достоверно ($p < 0,05$) превышает БЧМ (2,6), В (3.5) и ЗЕВ (4.4). К милдью листьев: наиболее устойчива также группа МВГ (6.8), достоверно превышающие устойчивость более чувствительных образцов из группы ЗЕВ (3.9). Милдью гроздей: наиболее устойчива группа МВГ (6.4), достоверно превышающая БЧМ (3.3), ЗЕВ (3.8), В (4.0). Таким образом, по комплексу признаков устойчивости (листья и грозди) наиболее сильно выделяются образцы группы МВГ ('Виерул-59', 'Юбилейный Магарача', 'Урожайный', 'Дунавски лазур', 'Йорк мадера', 'Шоколадный', 'Изабелла', 'Бианка', 'Мускат одесский').

Более высокие показатели «сила роста» (балл) имеют образцы из группы МВГ, чем образцы из группы ЗЕВ (4,3) и В (6,3) (рис. 10). Наиболее ранними сроками сокодвижения

отмечена группа ЗЕВ (17 марта), достоверно отличающаяся от групп с более поздними сроками – В (31 марта) и ВВГ (27 марта) (рис 12). Даты начала созревания ($p=0,245$), полного созревания ($p=0,185$), а также суммы активных температур ($p=0,186$) не различались для представителей всех групп.

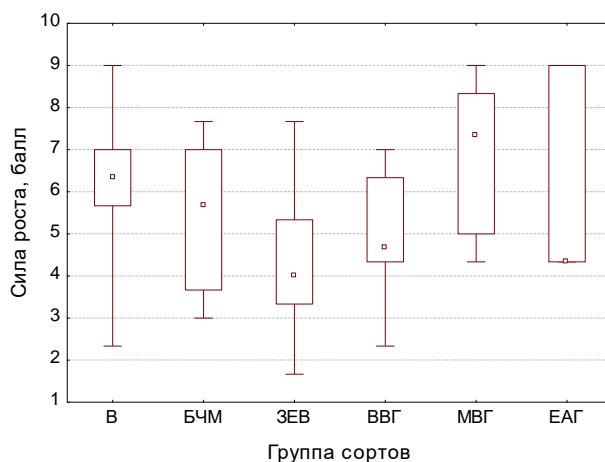


Рисунок 12 – Характеристика групп образцов винограда различного происхождения по силе роста

Обозначения: В-восточная группа сортов, БЧМ – группа сортов Бассейна Черного моря, ЗЕВ – западно-европейская группа сортов, ВВГ – внутри-видовые гибриды, МВГ – межвидовые комплексные гибриды с американскими видами, ЕАГ – европейско-азиатские гибриды.

В таблице 12 представлены данные изучения взаимосвязи между силой роста и степенью пораженностью грибными патогенами образцов. Сила роста не связана с устойчивостью ни к одному патогену. Устойчивость листьев к оидиуму коррелирует с устойчивостью гроздей к оидиуму (0,94), устойчивость листьев к милдью коррелирует с устойчивостью гроздей (0,88). Устойчивость к оидиуму и милдью коррелируют друг с другом с коэффициентами 0,60 ... 0,70.

Таблица 12 – Результаты анализа корреляционных связей между признаками устойчивости и силой роста образцов винограда

Основные показатели	Сила роста	Оидиум листьев	Оидиум гроздей	Милдью листьев	Милдью гроздей
Сила роста	1,00	-0,06	-0,04	0,06	-0,00
Оидиум/листья	-0,06	1,00	0,94	0,60	0,70
Оидиум/гроздей	-0,04	0,94	1,00	0,57	0,68
Милдью/листья	0,06	0,60	0,57	1,00	0,88
Милдью гроздей	-0,00	0,70	0,68	0,88	1,00

Примечание: достоверной корреляцией являются значения $r \geq 0,24$ на уровне значимости 5%

Таким образом, в результате фенотипирования выявлены ценные образцы по признакам устойчивости и темпам развития растений. Установлена корреляция признаков устойчивости. Критерий «каменистой осыпи» (рис. 13) показал, что достаточно двух первых компонент (факторов), который объясняют 85,9% дисперсии.

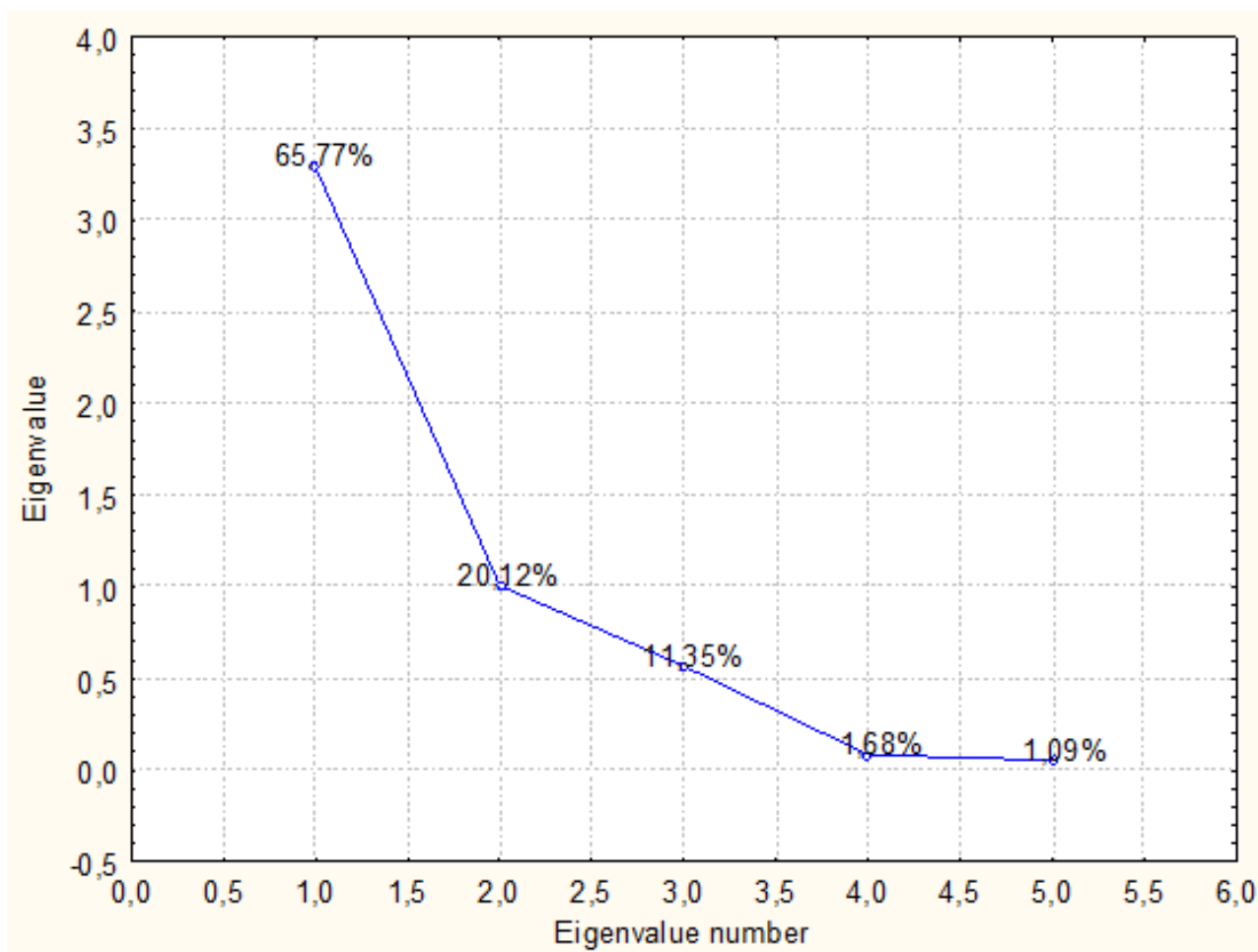


Рисунок 13 – Анализ вклада признаков устойчивости и силы роста в дисперсию изучаемой выборки винограда (критерий «каменистой осыпи»).

Примечание: по оси X – номера факторов, по оси Y – накопленная дисперсия

Анализ каменистой осыпи позволяло иллюстрировать накопление общей дисперсии от первого фактора к последнему. Первый фактор связан с устойчивостью к грибным заболеваниям (все 4 изученные устойчивости), второй – с физиологическими признаками (началом сокодвижения и силой роста), они несут независимую друг от друга информацию (табл. 13).

Таблица 13 – Факторный анализ физиологических показателей и степени пораженности образцов грибными патогенами

Показатель	Factor	Factor
	1	2
Сила роста	0.030	-0.730
Оидиум/листьев	0.913	0.161
Оидиум/гроздей	0.895	0.198
Милдью/листьев	0.878	-0.136
Милдью гроздей	0.933	-0.050
Начало сокодвижения – полная зрелость	-0.134	0.459
Начало сокодвижения	0.088	-0.849
Expl. Var	3.304	1.550
Prp. Totl	0.472	0.221

По совокупности показателей, высокой устойчивостью и силой роста выделяется группа МВГ (межвидовые комплексные гибриды с американскими видами) (рис. 14). В группе ЗЕВ (западно-европейская группа сортов), за некоторым исключением, высокая сила роста сочетается с низкой устойчивостью. В группе В (восточная группа сортов), за некоторым исключением (сорт 'Кара яй изюм', который в дальнейшем был использован в качестве опылителя в гибридологическом опыте), низкая сила роста сочетается с низкой устойчивостью. Остальные группы ЕАГ (европейско-азиатские гибриды), БЧМ (группа сортов бассейна Черного моря), ВВГ (внутри-видовые гибриды) по сочетанию признаков занимают промежуточные положения.

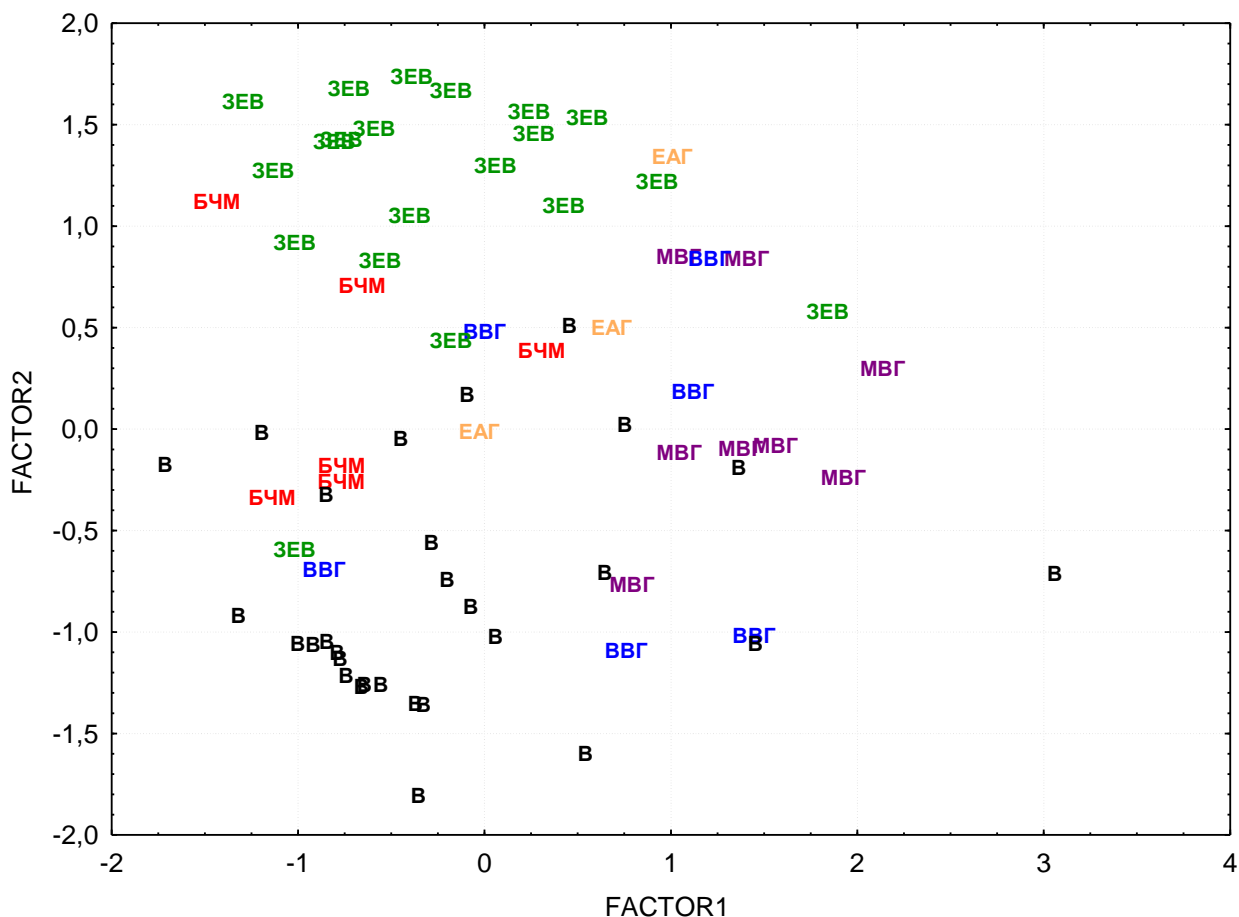


Рисунок 14 – Образцы винограда в пространстве двух первых факторов PCA

Обозначения: В – восточная группа сортов, БЧМ – группа сортов Бассейна Черного моря, ЗЕВ – западно-европейская группа сортов, ВВГ – внутри-видовые гибриды, МВГ – межвидовые комплексные гибриды с американскими видами, ЕАГ – европейско-азиатские гибриды.

Рассматривая выделившийся образец как возможный источник генов устойчивости, мы провели серию скрещиваний с неустойчивыми образцами (табл. 14) из различных групп происхождения с функционально-женским типом цветка – ‘Альзуб’, ‘Джунга’, ‘Аг чакракар’, ‘Коз узюм’, ‘Чол бер’, ‘Махбор цибил’, ‘Гимра’, ‘Ири тумут’ (рис. 15). В качестве контроля 1 был выбран сорт винограда – ‘Ахтамар’ проявляющий неустойчивость на высоком инфекционном фоне, контроль 2 – сорт винограда ‘Мускат одесский’, который проявлял устойчивость к грибным заболеваниям.



а) сорт ♂ ‘Кара яй изюм’



б) неустойчивые сорта с функционально-женским типом цветка

Рисунок 15 – Родительские формы гибридов на высоком инфекционном фоне, год 2019

Оценка устойчивости родителей гибридов F_1 к милдью, оидиуму была проведена в 2018 – 2020 годах. Регистрировали средние значения, для анализа брали минимальные значения. Устойчивость оценивали согласно методическим рекомендациям (OIV, 2009), по девятибалльной шкале: где 1 балл – очень низкая степень устойчивости; 3 балла – низкая степень устойчивости; 5 баллов – средняя степень устойчивости; 7 баллов – высокая степень устойчивости; 9 баллов – абсолютная устойчивость (OIV).

Таблица 14 – Устойчивость родительских форм к грибным заболеваниям

Родительский образец	Номер по каталогу ВИР	Группа происхождения	2018				2019				2020				Средняя за 3 года*		
			Оидиум		Милдью		Оидиум		Милдью		Оидиум		Милдью				
			Л	Г	Л	Г	Л	Г	Л	Г	Л	Г	Л	Г	Л	Г	Оидиум
‘Кара яй изюм	41647	В	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9,0±0,0	9,0±0,0
‘Альзуб’	41649	В	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1	1	1	1	3,7±1,3	3,7±1,3
‘Джунга’	41664	В	5	5	5	7	7	7	5	5	3	3	1	1	5,0±1,2	3,7±1,3	
‘Аг чакракар’	41669	В	5	5	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	3,0±1,2	2,3±0,7	
‘Коз узюм’	41686	БЧМхВ	3	3	5	5	3	3	5	5	1	1	3	1	2,3±0,7	4,3±0,7	
‘Чол бер’	41677	В	5	5	5	5	3	3	5	3	1	1	1	1	3,0±1,2	3,7±1,3	
‘Махбор цибил’	41694	В	5	5	5	5	5	3	3	3	1	1	1	1	3,7±1,3	3,0±1,2	
‘Гимра’	41686	БЧМхВ	5	5	5	5	3	3	5	7	1	1	3	3	3,0±1,2	4,3±0,7	
‘Ири тумут’	41681	БЧМ	5	5	3	3	5	5	3	3	1	1	1	1	3,7±1,3	2,3±0,7	
Контроль 1 ‘Ахтамар’	41758	В	1	1	5	3	1	1	5	7	1	1	3	3	1,0±0,0	4,4±0,7	
Контрроль 2 ‘Мускат одесский’	41936	СМКУГ	7	7	5	5	7	5	5	5	5	5	3	3	6,4±0,7	4,4±0,7	

Примечание: Л – листья; Г – грозди. * – приведены средние объединенные значение устойчивости к грибным заболеваниям по листьям и гроздьям. В – восточная группа сортов, СМКУГ – смешанно-комплексно-устойчивые гибриды, БЧМ – группа сортов бассейна Черного моря

Анализ устойчивости родителей гибридов F 1 за три года показал следующее (табл 14):

- Очень низкая степень устойчивости (1 балл) к оидиуму листьев и гроздья) наблюдалась в 2018 -2020 гг. в контроле – сорт ‘Ахтамар’. В 2020 году сильно поразились оидиумом листьев и гроздей сорта – ‘Альзуб’, ‘Аг чакракар’, ‘Коз узюм’, ‘Махбо цибил’, ‘Гимра’, ‘Ири тумут’. Милдью грозди поразились сорта – ‘Альзуб’, ‘Джунга’, ‘Аг чакракар’, ‘Чол бер’, ‘Махбор цибил’, ‘Ири тумут’, ‘Коз узюм’. Милдью листьев поразились сорта – ‘Альзуб’, ‘Джунга’, ‘Аг чакракар’, ‘Чол бер’, ‘Махбор цибил’, ‘Ири тумут’.

- Низкая степень устойчивости к оидиуму (3 балла) листьев и гроздей наблюдалась 2018 году у сорта – ‘Коз узюм’. Милдью листьев поразились сорта – ‘Аг чакракар’, ‘Ири тумут’. Милдью гроздей поразились сорта – ‘Аг чакракар’, ‘Ири тумут’ и в контроле сорт – ‘Ахтамар’. Милдью листьев наблюдались у сортов ‘Аг чакракар’, ‘Ири тумут’. 2019 году восприимчивость к оидиуму листьев наблюдались у сортов – ‘Аг чакракар’, ‘Коз узюм’, ‘Чол бер’, ‘Гимра’, к оидиуму гроздей поразились сорта – ‘Аг чакракар’, ‘Коз узюм’, ‘Чол бер’, ‘Махбор цибил’, ‘Гимра’. Восприимчивость милдью листьев наблюдались у сортов – ‘Аг чакракар’, ‘Махбор цибил’, ‘Ири тумут’, милдью гроздей у сортов – ‘Аг чакракар’, ‘Чол бер’, ‘Махбор цибил’, ‘Ири тумут’. В 2020 году восприимчивыми к оидиуму листьев и гроздей оказались сорта – ‘Джунга’. Восприимчивость листьев наблюдались у сортов – ‘Коз узюм’, ‘Гимра’, и в контролях – ‘Ахтамар’ и ‘Мускат одесский’, милдью гроздей у сортов – ‘Гимра’, и в контролях – ‘Ахтамар’, ‘Мускат одесский’.

- Средняя степень устойчивости (5 баллов), к оидиуму в 2018 году наблюдалась у сортов – ‘Джунга’, ‘Альзуб’, ‘Аг чакрак’, ‘Чол бер’, ‘Махбор цибил’, ‘Гимра’, ‘Ири тумут’. Средняя степень устойчивости к милдью листьев наблюдалась у сортов – ‘Альзуб’, ‘Джунга’, ‘Коз узюм’, ‘Чол бер’, ‘Махбор цибил’, ‘Гимра’, и в контролях – ‘Ахтамар’ и ‘Мускат одесский’, средняя степень устойчивости к милдью гроздей наблюдалась у сортов – ‘Альзуб’, ‘Коз узюм’, ‘Чол бер’, ‘Махбор цибил’, ‘Гимра’, и в контроле сорт – ‘Мускат одесский’. В 2019 году средняя степень устойчивости к оидиуму листьев наблюдалась у сортов – ‘Альзуб’, ‘Махбор цибил’ и ‘Ири тумут’, к оидиуму гроздей у сортов – ‘Альзуб’, ‘Ири тумут’ и в контроле ‘Мускат одесский’. Средняя степень устойчивости к милдью гроздей наблюдалась у сортов – ‘Альзуб’, ‘Джунга’, ‘Коз узюм’ и в контроле ‘Мускат одесский’, к милдью листьев у сортов – ‘Альзуб’, ‘Джунга’, ‘Коз узюм’, ‘Чол бер’, ‘Гимра’ и в контрольных сортах – ‘Ахтамар’, ‘Мускат одесский’.

- Высокая степень устойчивости (7 баллов) к оидиуму листьев и гроздья за 2018 год наблюдалась в контрольном сорте – ‘Мускат одесский’. Высокую устойчивость к милдью гроздей показал сорт ‘Джунга’. В 2019 году высокая устойчивость к оидиуму листьев наблюдалась у сортов – ‘Джунга’, ‘Мускат одесский’ (контроль), восприимчивость к оидиуму гроздей наблюдалась у сорта ‘Джунга’. За 2019 год высокая устойчивость к милдью гроздей наблюдалась у сортов – ‘Гимра’, ‘Ахтамар’.

- Абсолютную устойчивость по всем показателям (9 баллов) во все годы исследования показал сорт 'Кара яй изюм'.

3.3 Описание гибридных популяций

В результате скрещиваний сорта 'Кара яй изюм' с восприимчивыми сортами получены 80 гибридных растений винограда поколения F₁. В 2021 году был проведен анализ полевой устойчивости гибридов F₁ и SSR-анализ с использованием 10 микросателлитных праймеров.

Оценка устойчивости к болезням гибридов F₁, проведенная в 2021 году, позволила выявить гибридные сеянцы с иммунитетом (балл 9) и высокой устойчивостью (балл 7) к болезням. Баллом 1 оценивали очень сильное поражение оидиумом листьев 8-ми, оидиумом гроздей и милдью листьев 14-ти и милдью гроздей – 22-х гибридных сеянцев. Сильное поражение (балл 3) оидиумом листьев отмечено у 40, оидиумом гроздей у 34, милдью листьев у 27 и милдью гроздей – у 22 гибридных сеянцев. Среднюю степень устойчивости (балл 5) к оидиуму листьев проявили 14 гибридных сеянцев, к оидиуму гроздей – 20; к милдью листьев 13 и к милдью гроздей 18. Устойчивыми (балл 7) к оидиуму листьев были 16 сеянцев; к оидиуму гроздей 11, одновременно к милдью листьев и гроздей – 15. Отсутствие симптомов оидиума (балл 9) отмечено на листьях двух сеянцев и на гроздях только одного. У 4 гибридных сеянцев также отсутствовали симптомы милдью листьев.

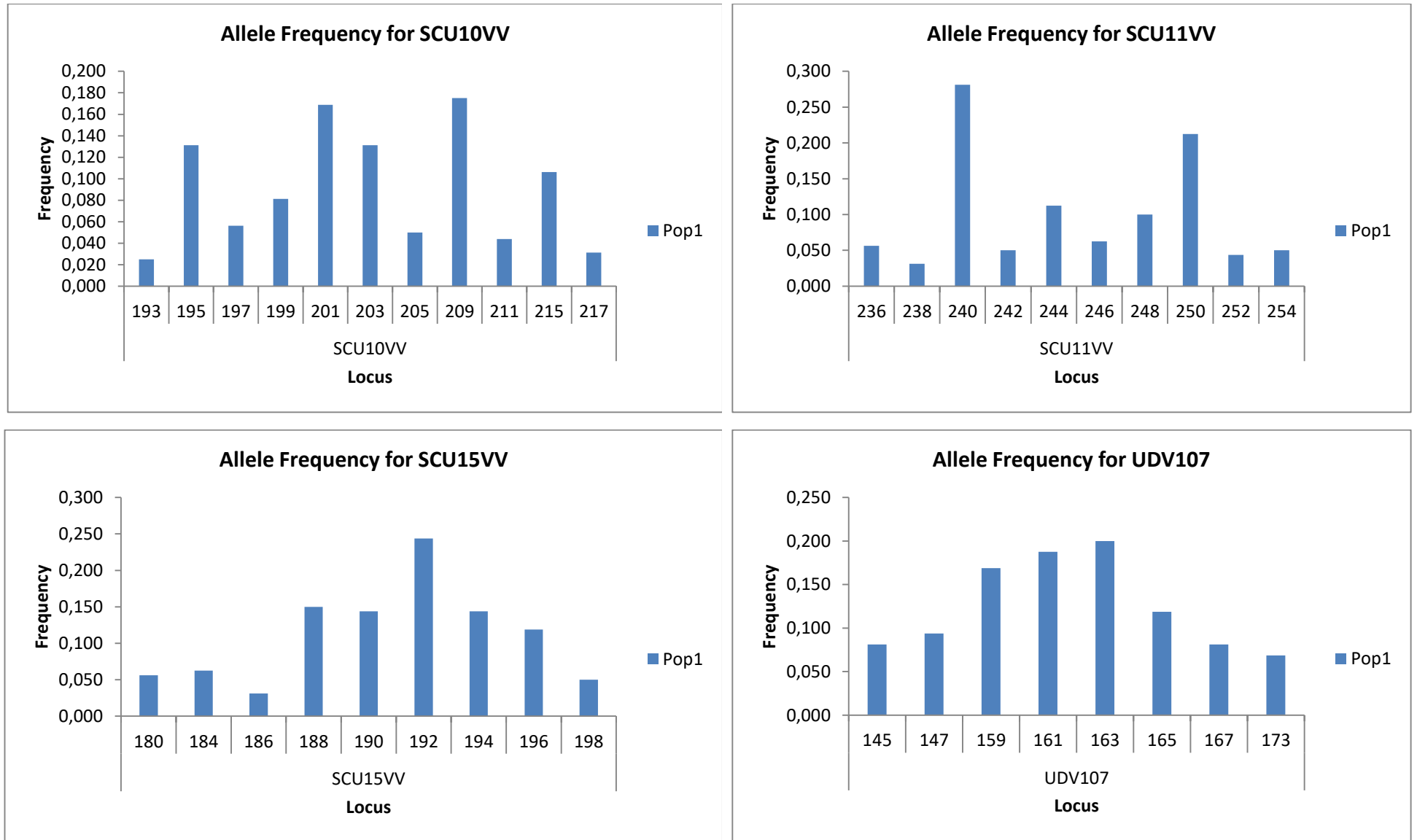
Гибриды от скрещивания винограда 'Кара яй изюм' с восприимчивыми сортами были проанализированы с использованием 10 микросателлитных праймеров. Число выявленных аллелей, гетерозиготность (процент выявленных гетерозигот к общему числу проанализированных растений) для каждого микросателлитного локуса представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Изменчивость микросателлитных локусов, по результатам генотипирования 80 растений, составивших сборную гибридную популяцию семян от скрещиваний ♂ ‘Кара яй изюм’ с неустойчивыми сортами с женским типом цветка

Локус	scu 10vv	scu 11vv	scu 15vv	udv 107	vvib01	vvip31	vviv67	vvmd5	vvmd6	vvs3
Число аллелей	11	10	9	8	8	13	8	11	6	9
Гетерозиготность	0,879	0,838	0,852	0,856	0,772	0,889	0,740	0,855	0,626	0,710
Размер фрагментов (пн)	193- 217	236- 254	180- 198	145- 173	289- 303	175- 221	358- 378	226- 250	190- 214	214- 250
РIS, Polymorphic Information Content	0,818	0,800	0,778	0,875	0,750	0,769	0,745	0,727	0,670	0,560

Примечание: scu10vv – хромосома 18, scu11vv – хромосома 19, scu15vv – хромосома 14 (Scot et al., 2000); udv107 – хромосома 9 (Di Gaspero et al., 2005); vvib01 – хромосома 2, vvip31 – хромосома 19, vviv67 – хромосома 15 (Merdinoglu et al., 2005); vvmd5 – хромосома 16, vvmd6 – хромосома 7 (Bowers et al., 1996); vvs 3 – хромосома 2 (Thomas et al., 1993).

Для 10 проанализированных микросателлитных маркеров было выявлено 93 аллеля. Кроме того, был рассчитан коэффициент информативности РIS для каждого маркера, значения которого были достаточно высоки и варьировали в пределах от 0.560 до 0.875. Частота встречаемости аллелей каждого локуса среди 80 растений винограда представлена на рис. 16.

Рисунок 16 – Частота встречаемости аллелей микросателлитных локусов у гибридов F₁

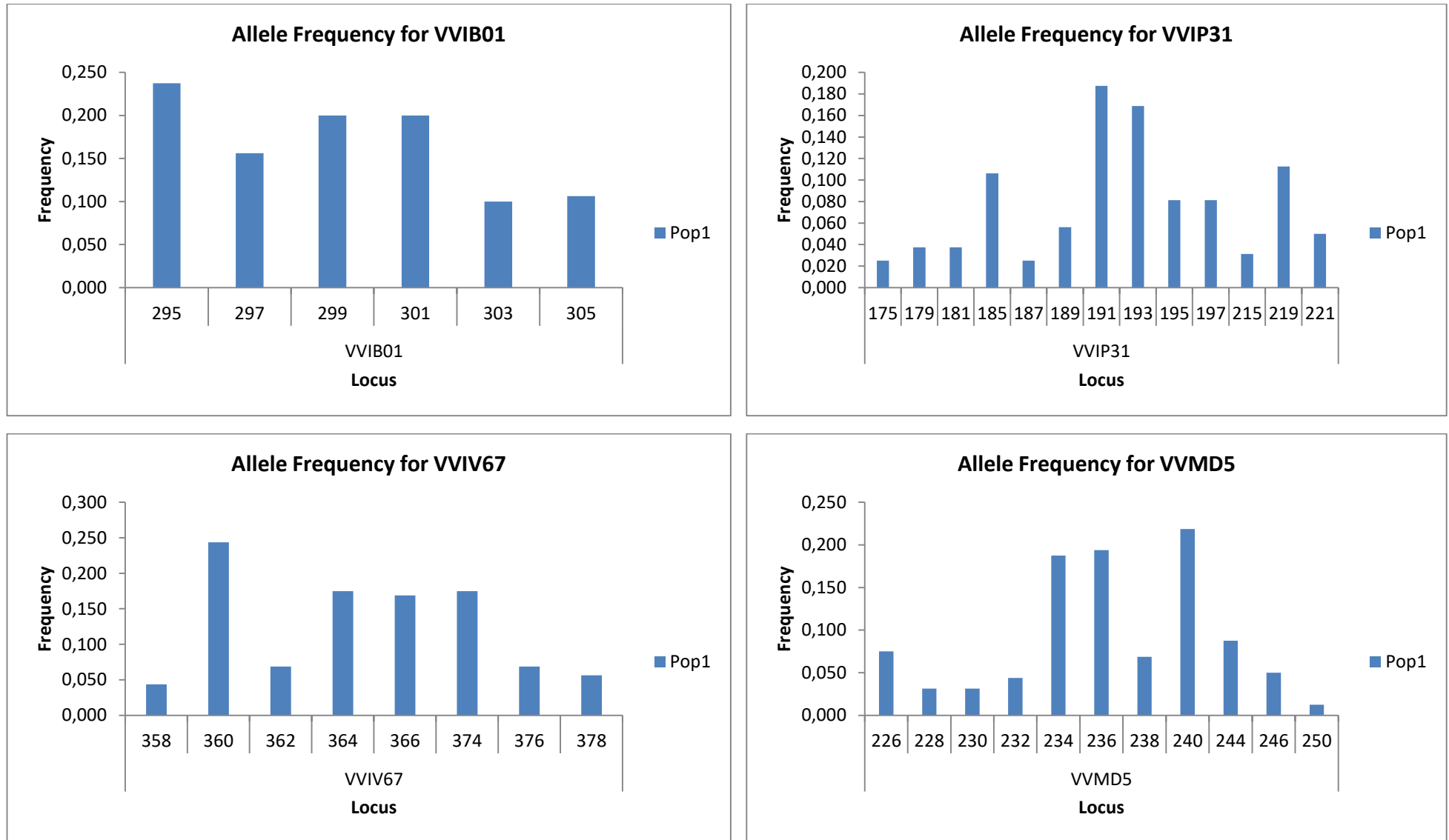


Рисунок 16– Частота встречаемости аллелей микросателлитных локусов у гибридов F_1

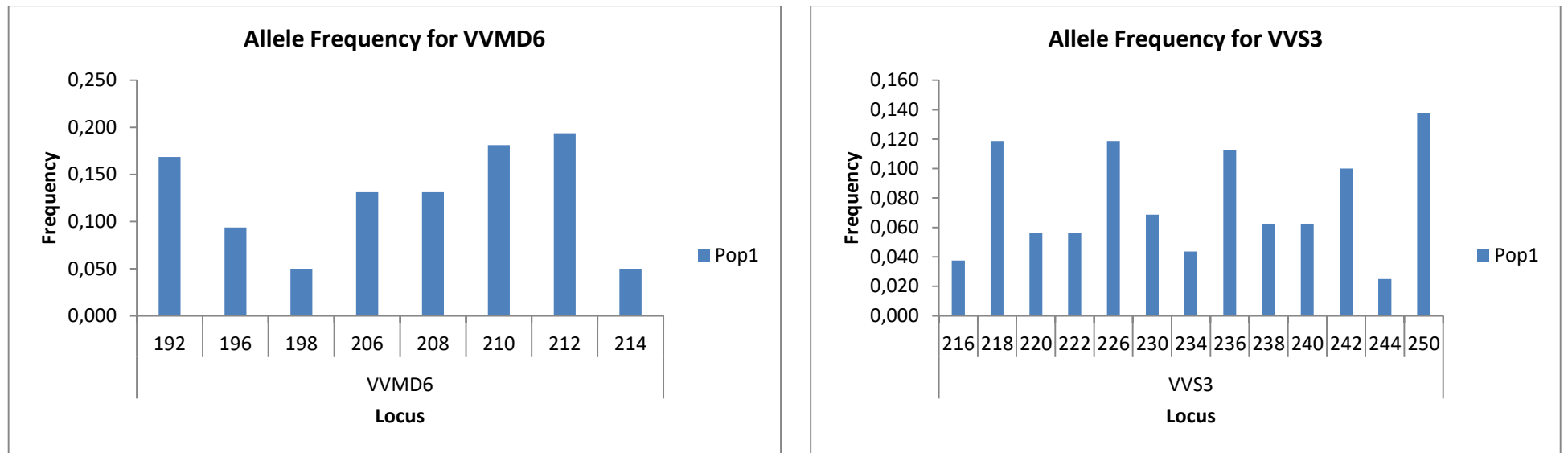


Рисунок 16 – Частота встречаемости аллелей микросателлитных локусов у гибридов винограда F₁

Уровень сходства гибридов F_1 оценивали с помощью программы Structure 2.3.4, основанной на вероятностной модели Бейса (Bayesian method). Метод позволяет обнаружить генетическую структуру популяции, размещая отдельные образцы в предполагаемые кластеры таким образом, чтобы отклонение от закона Харди-Вайнберга было минимальным. Вероятность числа кластеров в изучаемой выборке (K) оценивали в диапазоне от 1 до 15, для каждого значения K выполняли по 10 повторов анализа. Было выделено восемь генетических кластеров (K) и проведена оценка генетического разнообразия образцов винограда (рис. 19).

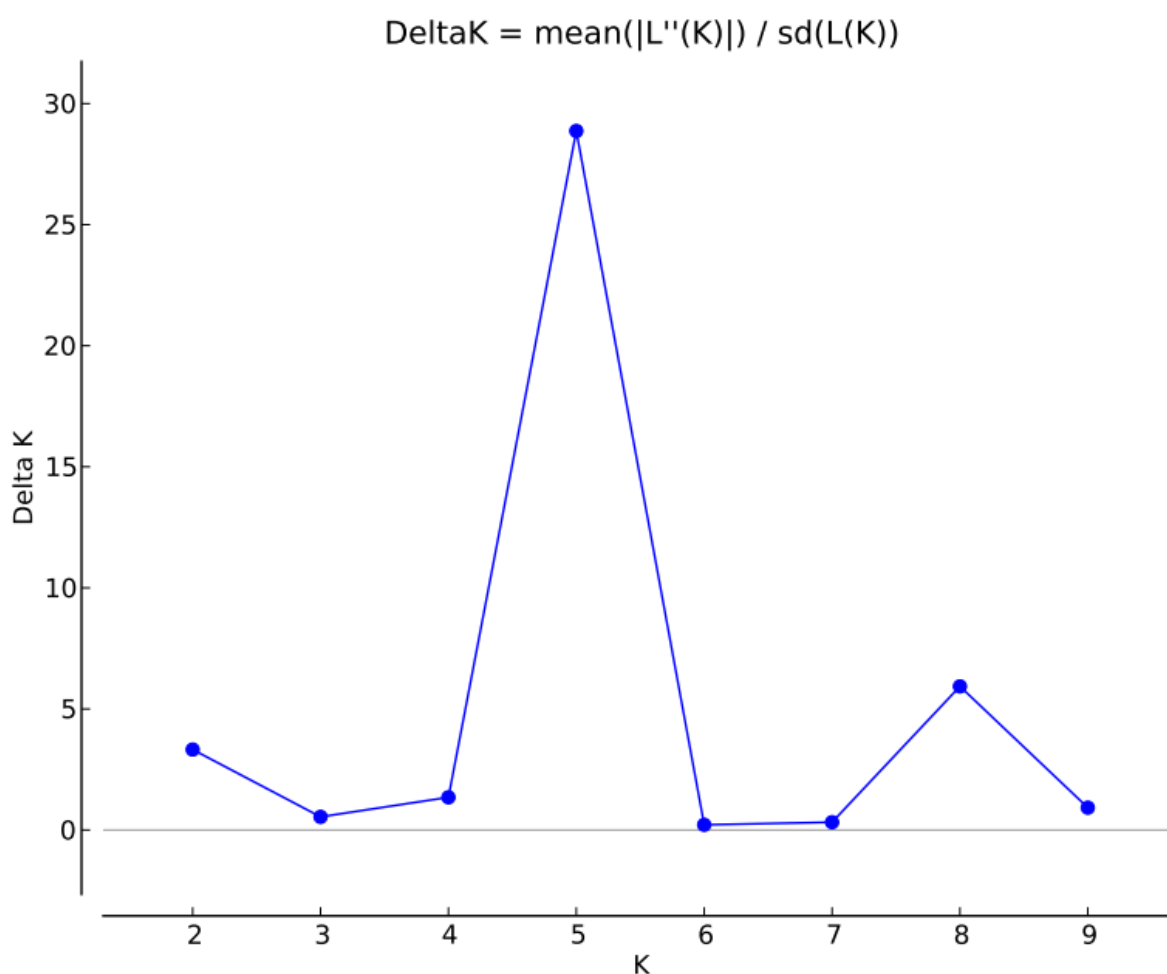


Рисунок 19 – Вероятность числа кластеров (K) – генетически обособленных групп – среди 80 образцов коллекции винограда ДОС ВИР по результатам генотипирования по 10 микросателлитным локусам

Анализ популяционной структуры по результатам микросателлитного маркирования позволяет сделать вывод о том, что скрещивания 3 (♀ ‘Аг чакракар’ × ♂ ‘Кара яй изюм’), 6 (♀ ‘Махбор дибил’ × ♂ ‘Кара яй изюм’) и 8 (♀ ‘Ири тумут’ × ♂ ‘Кара яй изюм’) не имеют признаков генетического засорения (рис 20, 21). Полученные гибридные популяции от скрещиваний устойчивого автохтонного сорта ‘Кара яй изюм’ на высоком инфекционном фоне и поражаемых

родителей, без признаков чужеродного генетического материала могут быть использованы для создания генетических карт, поиска генов-кандидатов и для селекционных целей при создании новых хозяйственно-ценных линий/форм винограда, с некой долей вероятности несущих признаки устойчивости. В перспективе полагаем целесообразным провести скрининг полученной популяции на наличие маркеров из семейства локусов *Ren*, *Rpv* для выявления устойчивых форм и включения их в селекционные программы. Кроме того, планируется проводить фенотипические наблюдения и повторные скрещивания с устойчивым образцом. В настоящее время полученная популяция сохраняется в полевых условиях на Дагестанской опытной станции ВИР.

Данный раздел исследований выполнен при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-316-80059.

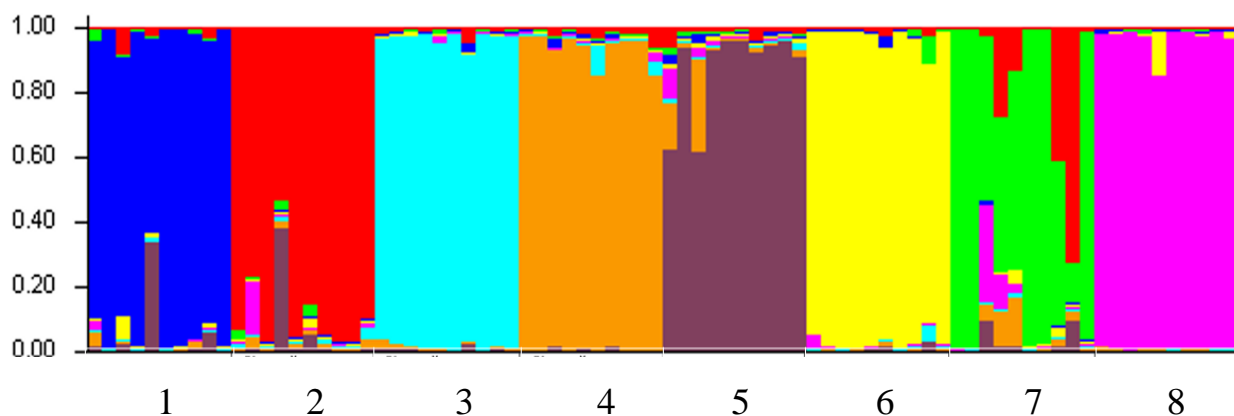


Рисунок 20 - График популяционной структуры 80 гибридов форм винограда

Примечание: гибриды от скрещиваний: 1 – ♀ ‘Альзуб’ × ♂ ‘Кара яй изюм’; 2 – ♀ ‘Джунга’ × ♂ ‘Кара яй изюм’; 3 – ♀ ‘Аг чакракар’ × ♂ ‘Кара яй изюм’; 4 – ♀ ‘Коз узюм’ × ♂ ‘Кара яй изюм’; 5 – ♀ ‘Чол бер’ × ♂ ‘Кара яй изюм’; 6 – ♀ ‘Махбор цибил’ × ♂ ‘Кара яй изюм’; 7 – ♀ ‘Гимра’ × ♂ ‘Кара яй изюм’; 8 – ♀ ‘Ири тумут’ × ♂ ‘Кара яй изюм’

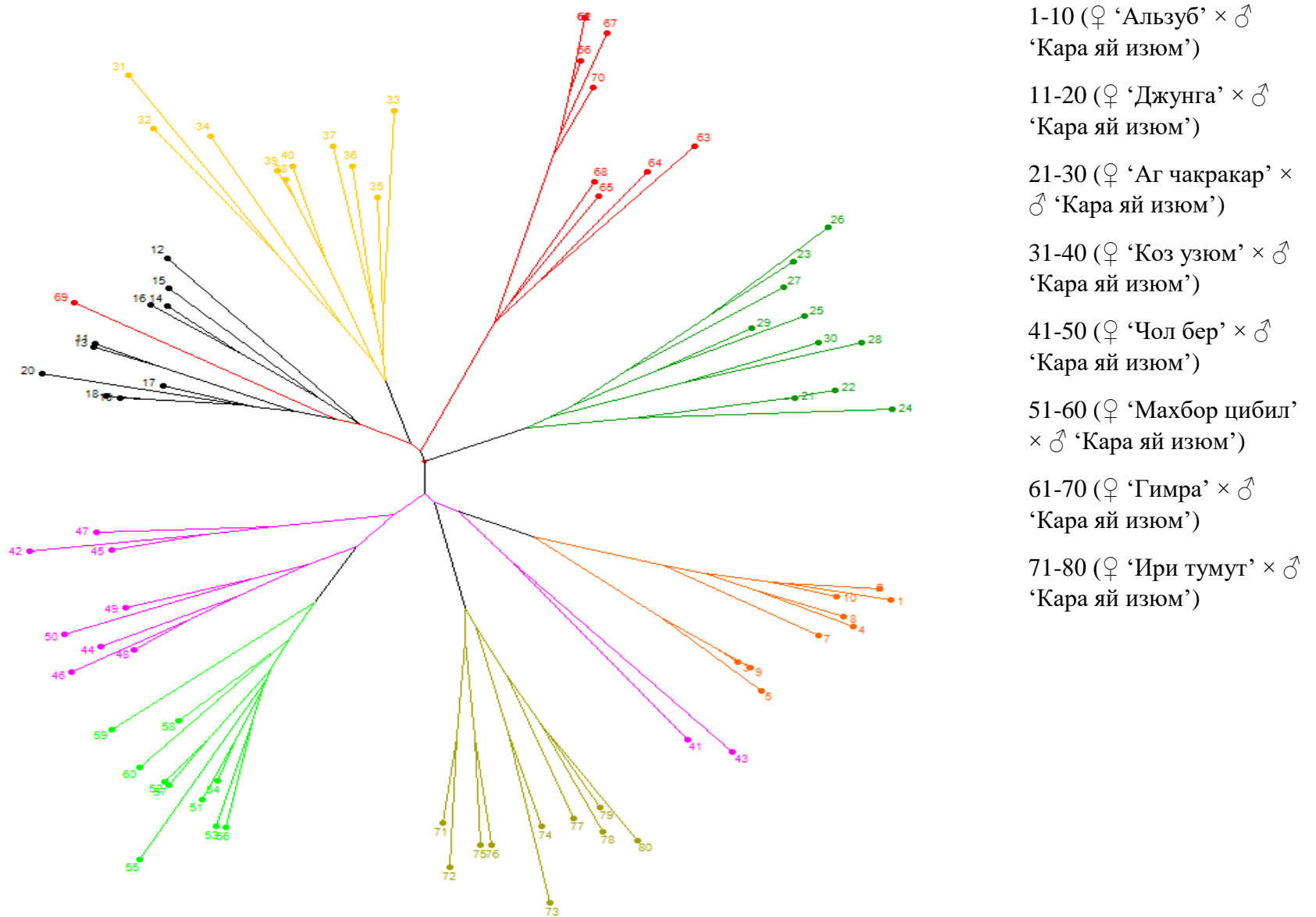


Рисунок 21 – Кластеризация 80 гибридов винограда, генотипированных по 10 микросателлитным локусам

3.4 Результаты изучения генетического разнообразия коллекции винограда

В геноме *V. vinifera* содержится огромное количество полиморфных микросателлитных локусов, аллельное разнообразие которых может использоваться для выявления генетической структуры зародышевой плазмы винограда в коллекциях *ex situ*, а также для обнаружения дублетов и сортовой идентификации (Dokupilová et al., 2013). На рисунке 22 показана доля каждой из эколого-географических групп, участвовавших в изучении генетического разнообразия винограда. В данном исследовании использовали 73 сорта винограда из ампелографической коллекции ДОС ВИР (приложение 2).

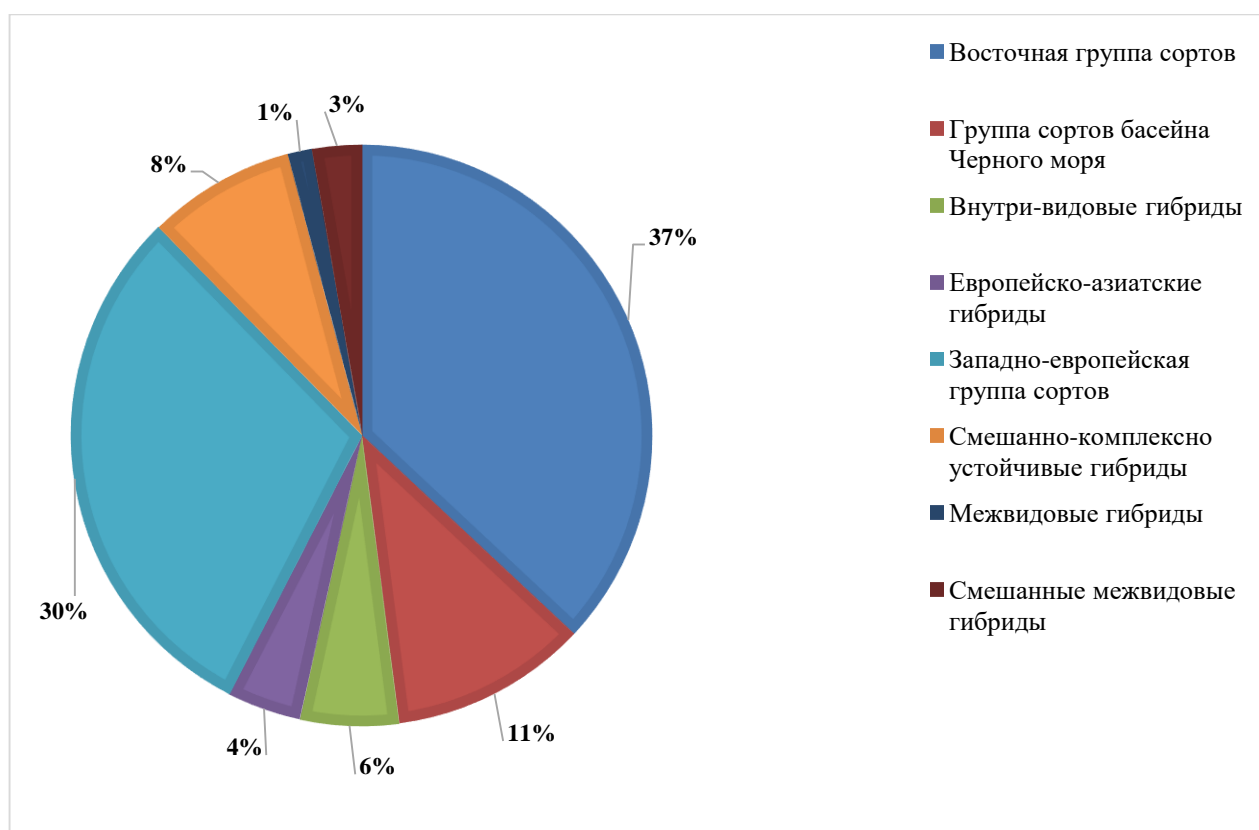


Рисунок 22 – Образцы винограда коллекции ДОС ВИР, изученные с использованием SSR-маркеров

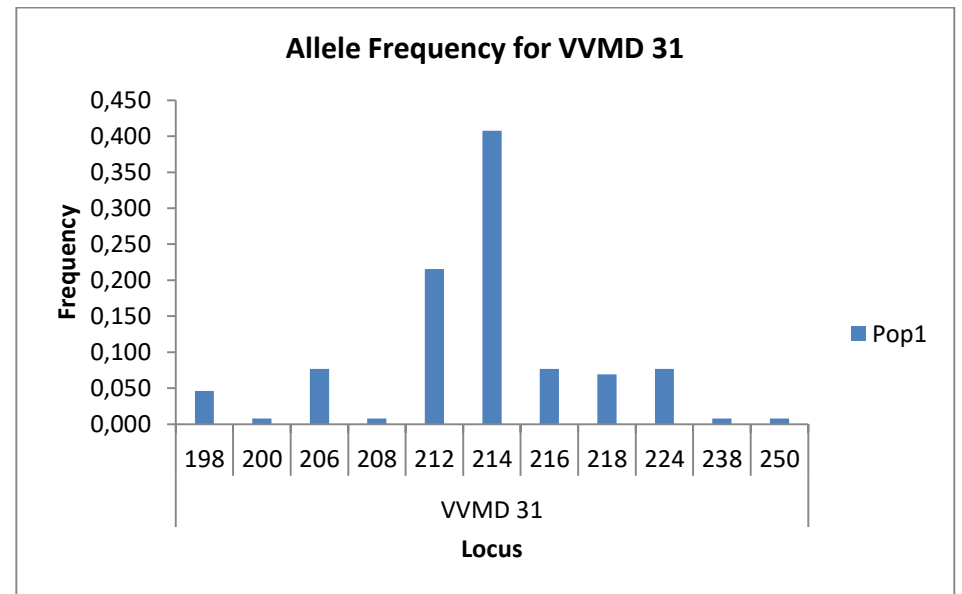
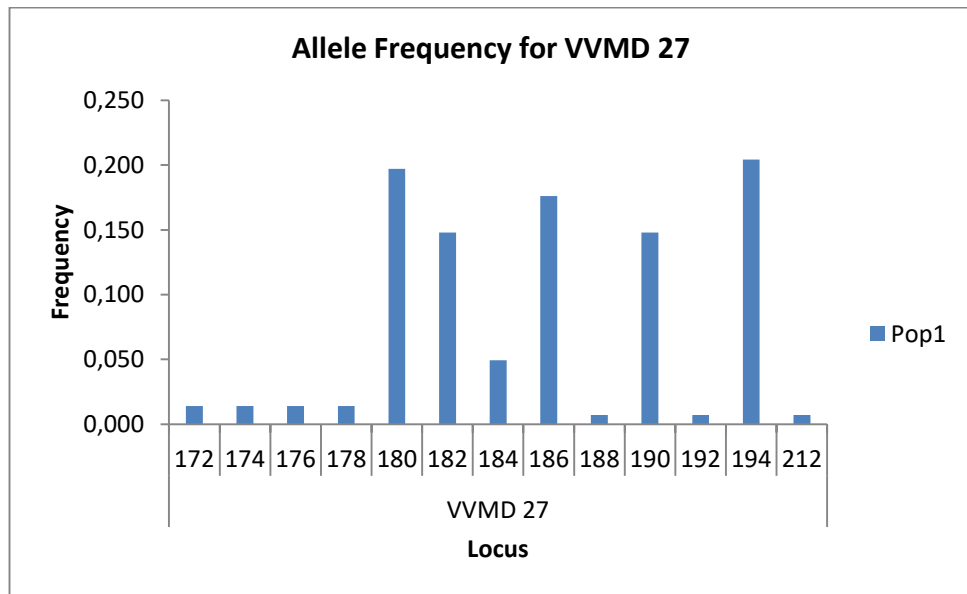
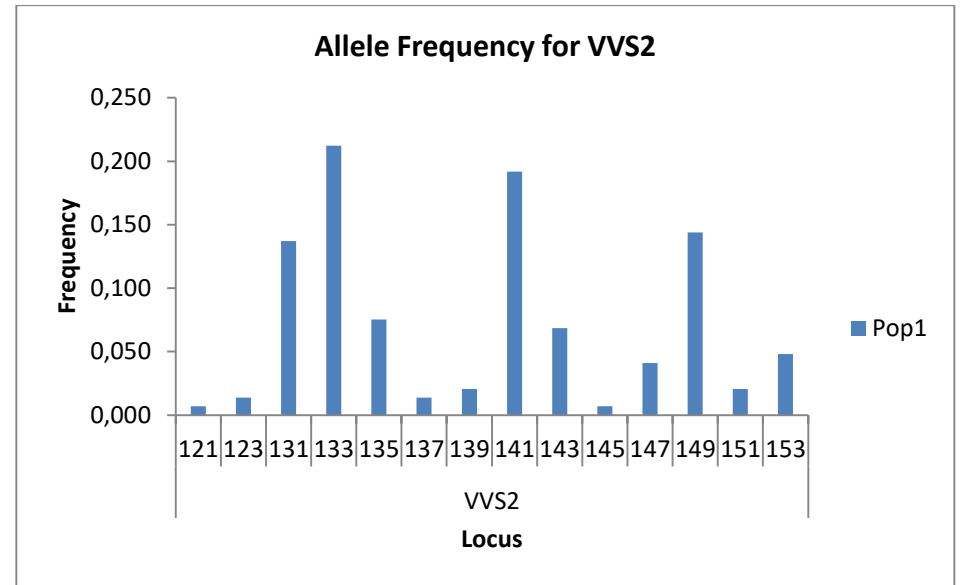
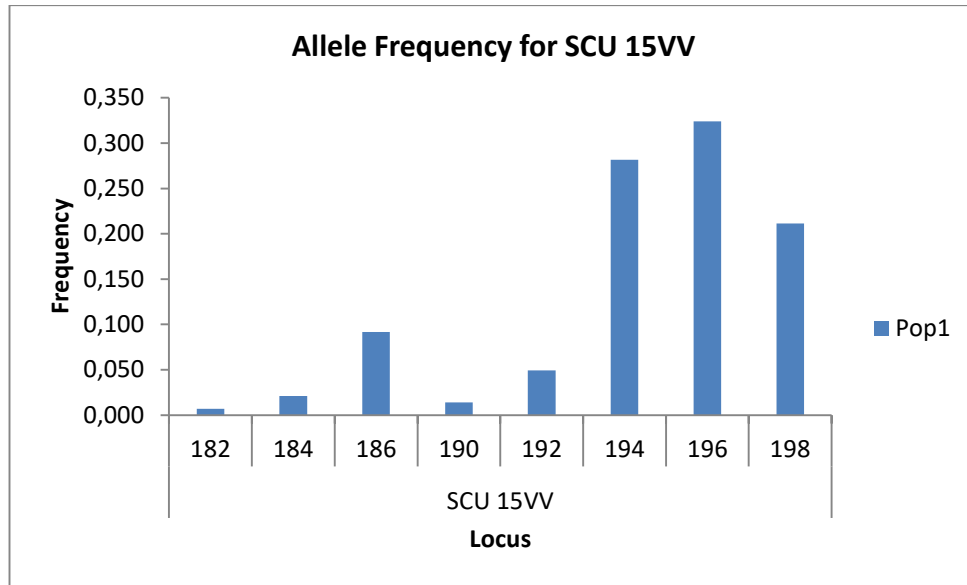
В проведенном исследовании 73 сорта винограда из коллекции ДОС ВИР были проанализированы с использованием восьми микросателлитных праймеров: scu15vv, vvs 2, vvmd 27, vvmd 31, vvih54, vvip31, scu11vv и vvib01, которые были ранее рекомендованы для сортовой идентификации винограда (Thomas et al., 1993; Bowers et al., 1999). Число выявленных аллелей, гетерозиготность (процент выявленных гетерозигот к общему числу проанализированных растений) для каждого микросателлитного локуса представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Изменчивость микросателлитных локусов по результатам генотипирования 73 образцов винограда, коллекции ДООС ВИР

Локус	scu 15vv	vvs2	vvmd2 7	vvmd 31	vvih 54	vvip 31	scu 11vv	vvib 01
Число аллелей	8	14	13	11	17	16	18	14
Гетерозиготность	0,760	0,863	0,841	0,762	0,845	0,906	0,812	0,755
Размер фрагментов (пн)	182- 198	121- 153	172- 212	198-250	143- 183	164- 198	214-294	284- 324
PIС, Polymorphic Information Content	0,625	0,785	0,769	0,727	0,764	0,812	0,611	0,714

Примечание: scu11vv – хромосома 19, scu15vv – хромосома 14 (Scot et al., 2000); vvih54 – хромосома 13, vvip31 – хромосома 19 (Merdinoglu et al. 2005); vvmd27 – хромосома 5 (Bowers et al. 1999a); vvmd31 – хромосома 7 (Bowers et al. 1996 b); vvs 2 – хромосома 11 (Thomas et al., 1993)

Как следует из таблицы 16, в общей сложности для восьми проанализированных микросателлитных локусов было выявлено 111 аллелей. Для каждого маркера был рассчитан коэффициент информативности PIС, значения которого были достаточно высоки и варьировали в пределах 0,61–0,81. Частота встречаемости аллелей каждого локуса среди 73 образцов винограда представлена на рисунке 23.



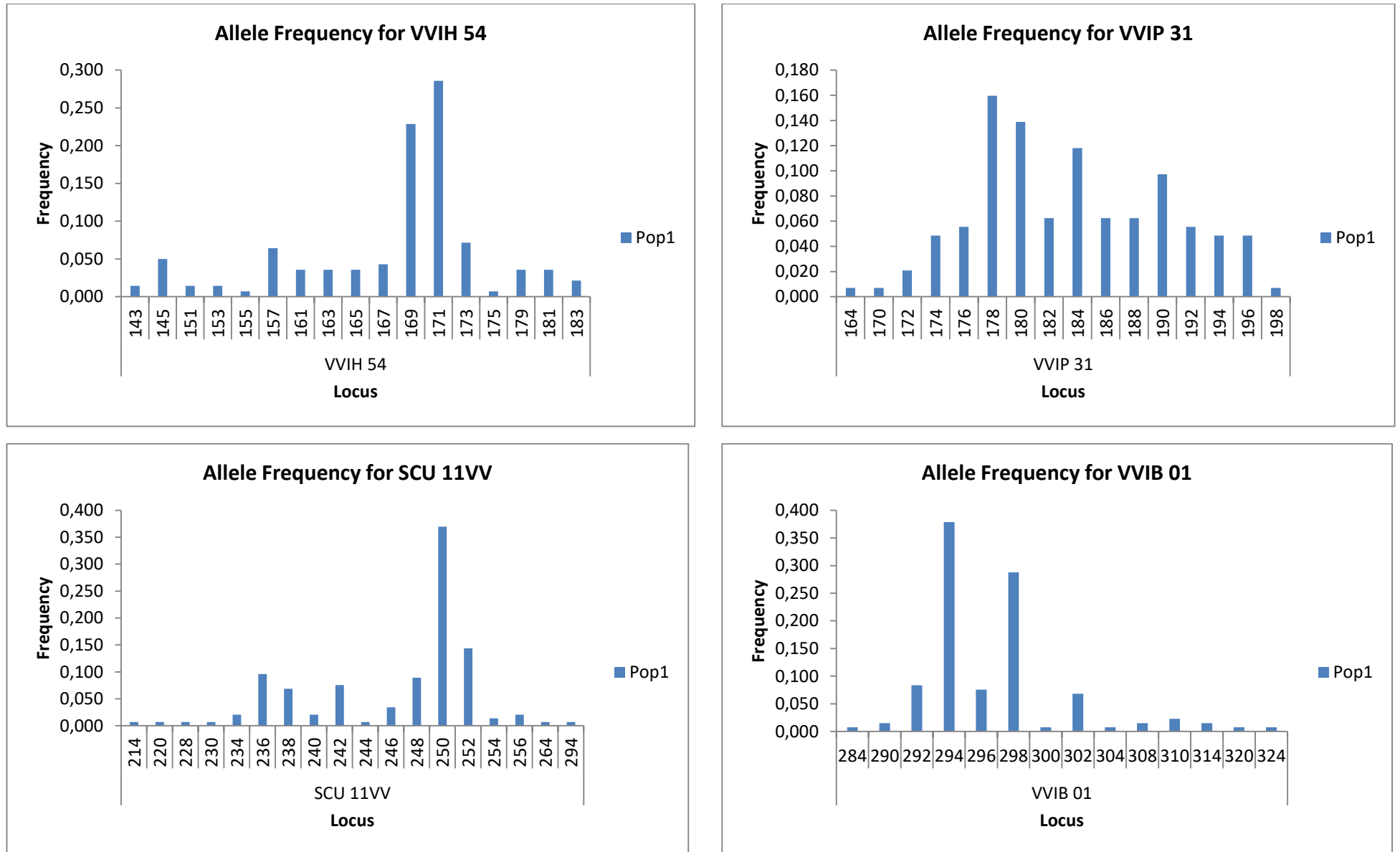


Рисунок 23 – Частота встречаемости аллелей микросателлитных локусов scu15vv, vvs2, vvmd27, vvmd31, vvih54, vvip31, scu11vv, vvib01 среди образцов винограда коллекции ДОС ВИР

Генетическая структура коллекции винограда ДОС ВИР по данным полиморфизма микросателлитных локусов была проанализирована с помощью программы Structure 2.3.4. На рисунке 24 представлены выделенные генетические кластеры (K), демонстрирующие генетическое разнообразие образцов винограда.

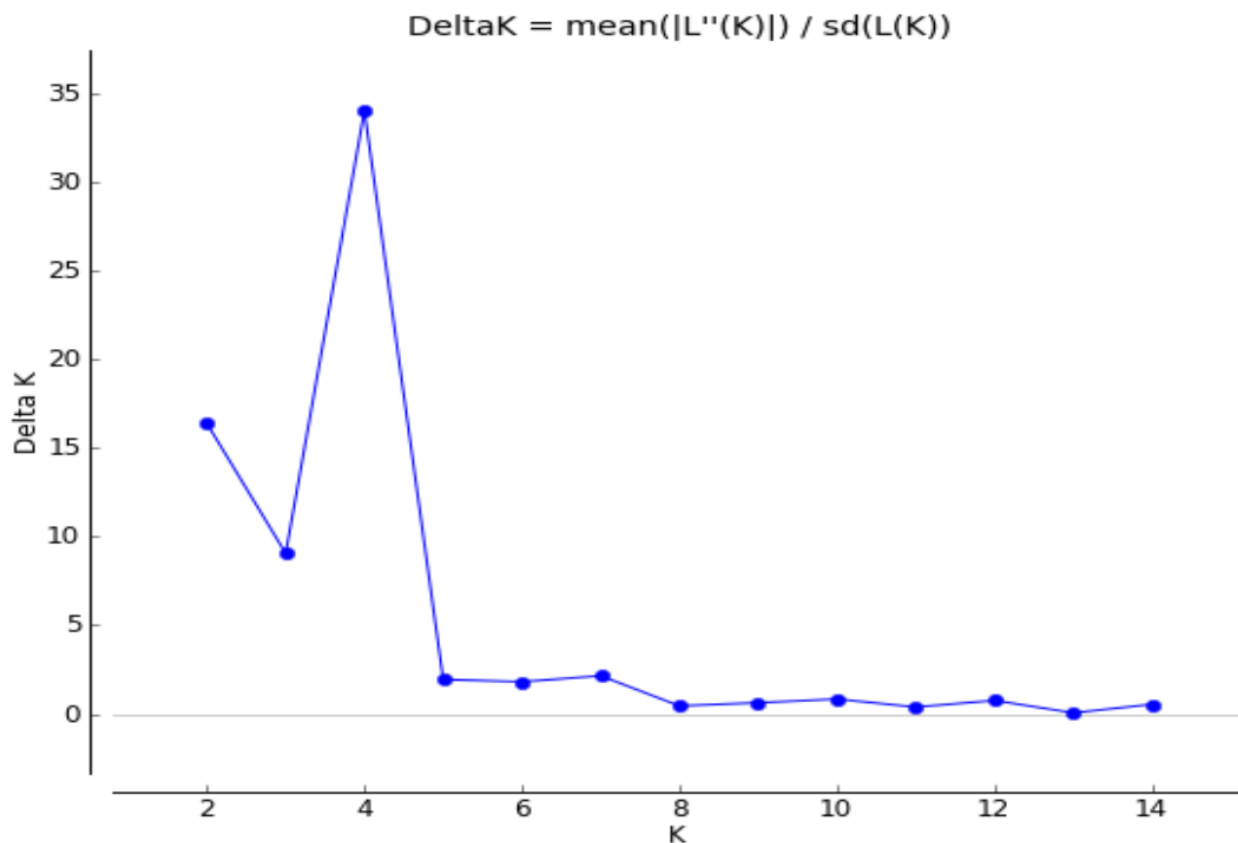


Рисунок 24 – Вероятность числа кластеров (K) – генетически обособленных групп – среди 73 образцов коллекции винограда ДОС ВИР по результатам генотипирования по 8 микросателлитным локусам

Каждая из первых трех групп содержит образцы винограда того же географического происхождения и представляет собой отдельную эколого-географическую группу, четвертый кластер включал в основном гибриды (рис. 25).

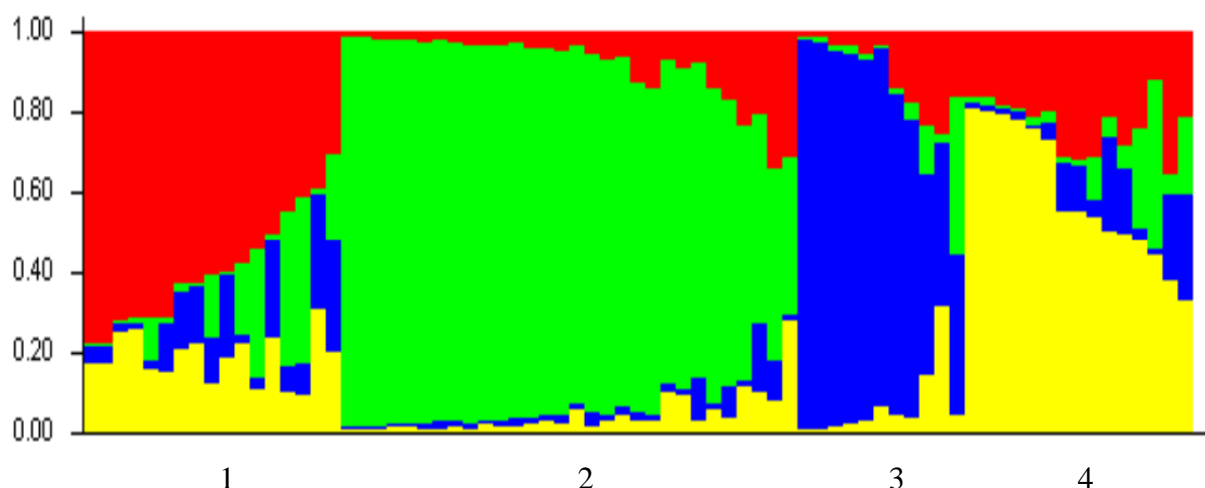


Рисунок 25 – Структура генетического разнообразия образцов винограда сохраняемых в условиях ДОС ВИР

Примечание: 1 – западноевропейская эколого-географическая группа сортов винограда (*V. vinifera* convar. *occidentalis* Negr.), 2 – восточная эколого-географическая группа сортов винограда (*V. vinifera* convar. *orientalis* Negr.), 3 – сорта винограда бассейна Черного моря (*V. vinifera* convar. *pontica* Negr.) и некоторые внутривидовые гибриды, 4 – межвидовые гибриды

Первая (красная) группа объединяет 18 образцов винограда и представляет в основном западноевропейскую эколого-географическую группу сортов винограда (*V. vinifera* convar. *occidentalis* Negr.). Среди них были некоторые известные сорта винограда, такие как ‘Рислинг’ и ‘Алиготе’. Второй (зеленый) кластер включает 28 образцов винограда, которые в основном относятся к восточной эколого-географической группе *V. vinifera* convar. *orientalis* Negr. и представляют собой дагестанские автохтонные сорта винограда. К третьему (синему) кластеру были отнесены древние автохтонные сорта винограда бассейна Черного моря (*V. vinifera* convar. *pontica* Negr.) и некоторые внутривидовые гибриды. В четвертую группу (желтую) вошли европейско-азиатские, внутривидовые, смешанно-комплексно устойчивые и межвидовые гибриды. Разнообразие восьми полиморфных микросателлитных локусов позволило нам оценить генетическую структуру и установить отношения между генотипом виноградного образца и его происхождением. Выявлен высокий уровень аллельного разнообразия образцов винограда в коллекции ВИР, потенциально являющихся источниками ценных признаков для различных селекционных программ. До настоящей работы молекулярных исследований ампелографической коллекции ВИР не проводили. Данные о генотипической структуре коллекции винограда ВИР рекомендованы для использования селекционерами при подборе пар для скрещиваний.

Данный раздел выполнен в рамках государственного задания ВИР по теме № 0662-2018-0012 «Создание теории и методологии оценки генетического разнообразия генетической стабильности и генетической уязвимости сохраняемых в ex situ коллекциях и произрастающих in situ видов, сортов и популяций культурных растений и их диких родичей».

3.5 Полногеномное секвенирование *V. rotundifolia* (сорт ‘Dixie’)

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) (табл. 17).

Таблица 17 – Общая статистика “сырых” данных секвенирования двух библиотек геномной ДНК *V. rotundifolia*, полученных с двух ячеек MinION с помощью программы NanoStat V.0.8.1 из 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/fastq и коррекции ошибок с помощью guppy было получено 1 738 535 ридов. Для полученных ридов был произведен контроль качества с помощью rucore, 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. 18).

Таблица 18 – Основные статистические характеристики полученных данных после процедуры распознавания нуклеотидов (basecalling с помощью guppy), полученные с помощью rucore

Количество активных пор	Номер ячейки	Количество ридов	Количество оснований	Медиана длины	Медиана качества по шкале Phred	N50
481	2	1 220 594	5 732 084 000	3 530	11.809	7 310
455	1	517 941	4 729 669 000	6 380	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 *de novo* без использования референсного генома (Vitis, 2020).

Гибридная сборка. Алгоритм гибридной сборки включает в себя сборку коротких чтений графами Де Брюина с последующим закрытием “пропусков” сборки с помощью длинных ридов. 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 19 представлены основные статистические показатели качества полногеномной сборки *V. rotundifolia*, полученной с использованием *de novo*, с привлечением только данных нанопорового секвенирования (ONT) и используя данные Illumina и ONT (гибридный метод).

Таблица 19 – Основные характеристики полногеномной сборки *V. rotundifolia*, полученной методом *de novo* и гибридным методом по результатам оценки с помощью Quast

Показатели качества сборки	Сборка <i>de novo</i> ONT+Illumina (гибридный метод) (пн)	Сборка <i>de novo</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)	428 439 192	386 122 654

(>= 0 пн)		
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 (рис. 26), однако при этом сборка получается намного более фрагментированной, чем при сборке с использованием только данных нанопорового секвенирования.

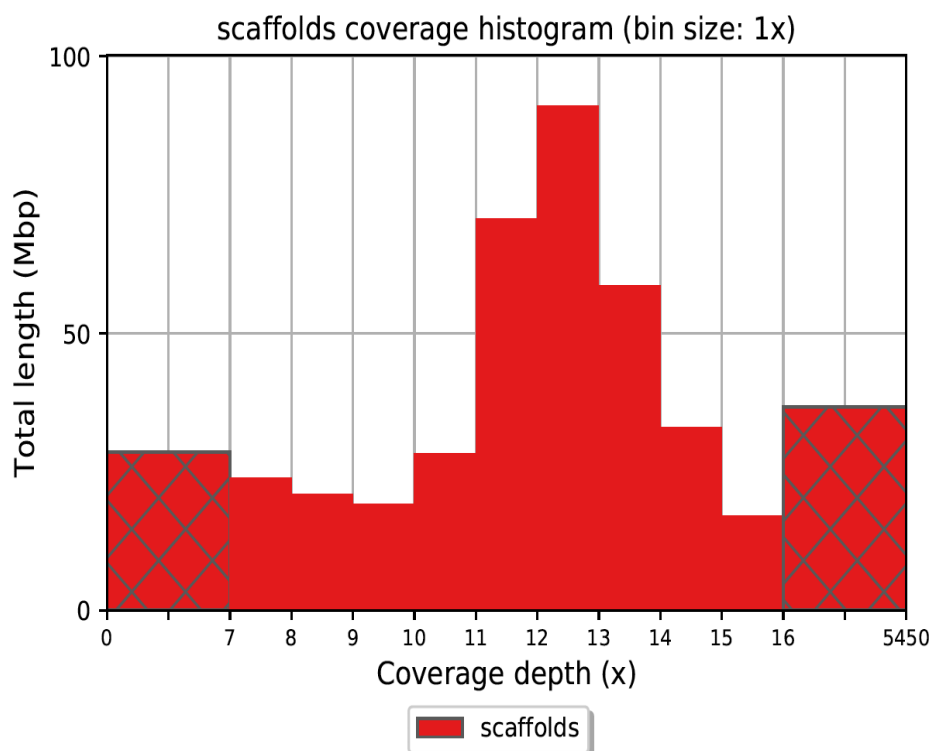


Рисунок 26 – Покрытие гибридной сборки

Сборка *de novo* 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 (рис. 27).

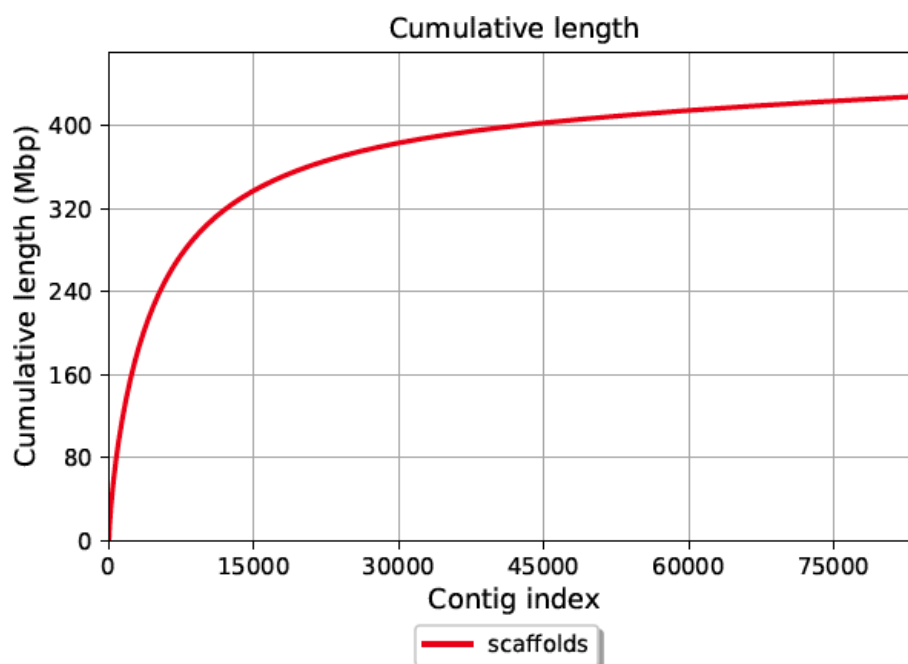


Рисунок 27 – Совокупная длина скаффолдов

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 «маскинга» (masking), который позволяет найти и скрыть повторы путем сравнения полногеномной сборки 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) нуклеотид для сборки, полученной с помощью minimap2-miniasm.

Для **функциональной аннотации** и оценки степени фрагментированности полногеномная сборка *V. rotundifolia*, полученная двумя различными способами, была проанализирована с помощью BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) (Seppey et al., 2019). Анализ поиска ортологичных последовательностей среди высших растений (*Embryophyta*) показал схожие результаты как для сборки *de novo* пайплайном minimap2-miniasm, так и для сборки гибридным методом. Всего для анализа BUSCO было использовано 1614 последовательностей ортологичных генов базы данных высших растений embryophyta_odb10.2019-11-20. На рисунке 28 представлены результаты оценки полноты представленности последовательностей ортологичных генов в сборке, полученной методом *de novo* и гибридным методом.

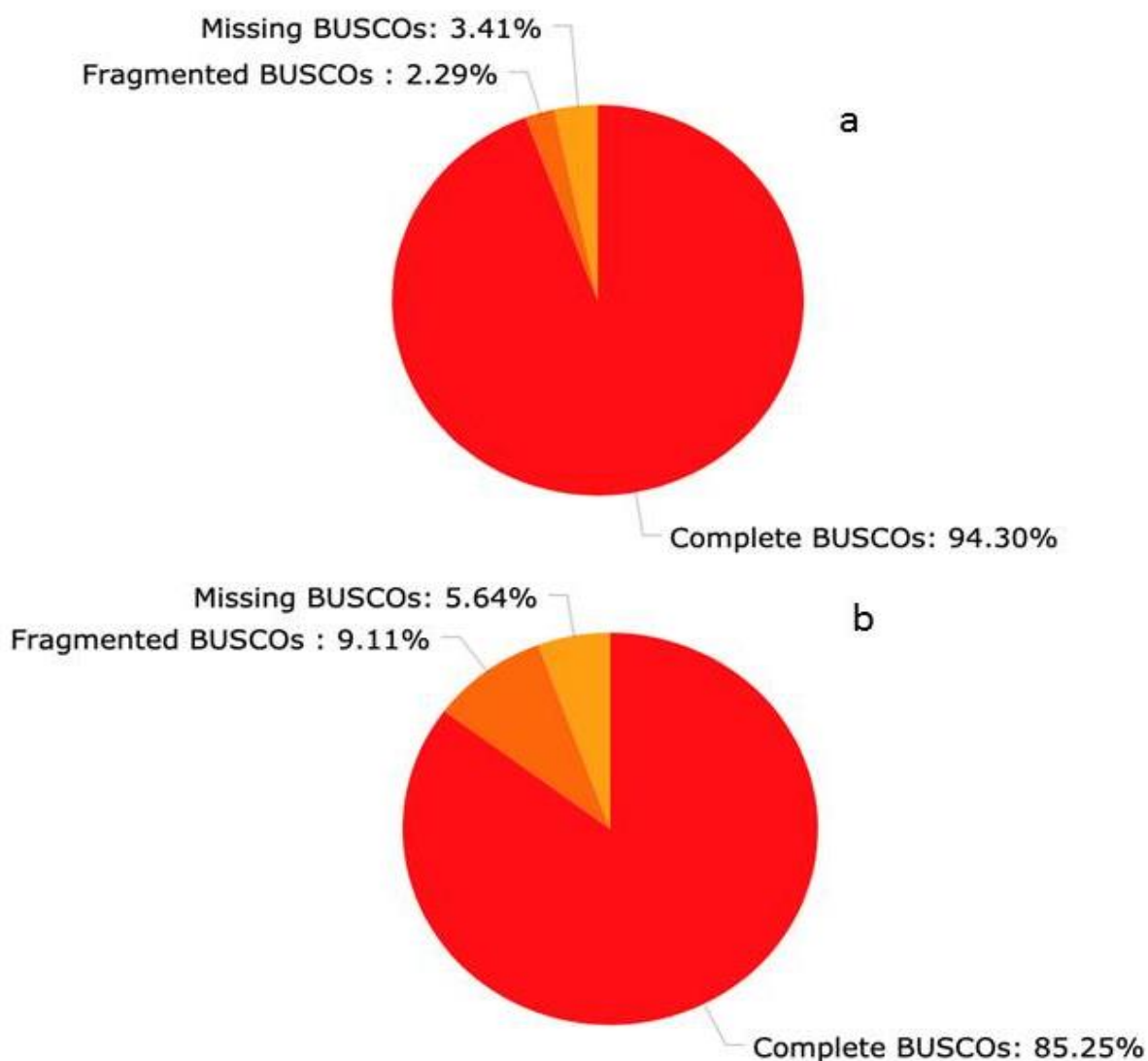


Рисунок 28 – Результаты анализа BUSCO для сборки *minimar2-miniasm*. Красная область представляет процент ортологичных генов, последовательности которых были найдены полностью (Complete BUSCOs). Оранжевая область представляет процент фрагментированных ортологичных генов (Fragmented). Желтая область представляет отсутствующие данные (Missing).

Красная область представляет процент ортологичных генов, последовательности которых были найдены полностью (Complete BUSCOs). Оранжевая область представляет процент фрагментированных ортологичных генов (Fragmented). Желтая область представляет отсутствующие данные (Missing).

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 для сборки *de novo*, что можно объяснить простотой предсказания генов для длинных непрерывных чтений. С другой стороны, судя по показателям об общей длине 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*.

Более 1,6 млн высококачественных прочтений длиной ~5 тыс. п.н., составивших в общей сложности более 10 млрд п.н., 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 чтений, 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.

Предложенная нами сборка генома устойчивого к фитопатогенам образца вида *V. rotundifolia* сорта ‘Dixie’ проанализирована с точки зрения **идентификации гомологичных участков с опубликованным геномом культурного винограда *V. vinifera* 12X** (International Grape Genome Program, GenBank assembly accession: GCA_000003745.2) и оценки степени сходства геномов двух видов. Особый интерес может представлять выравнивание полученной сборки на хромосому 12 в геноме *V. vinifera*, где ранее был картирован локус *RUN1/RPVI*, ассоциированный с устойчивостью к оидиуму (*RUN1*) и милдью (*RPVI*), а также другие гены устойчивости.

Исследование Cochetel et al., (2021), опубликовавших первую версию сборки генома *V. rotundifolia*, позволило проанализировать различия в структуре локуса *RUN1/RPVI* у иммунного *V. rotundifolia* (сорт ‘Trayshed’) и поражаемого *V. vinifera* (сорт ‘Sauvignonblanc’). Локус *RUN1/RPVI*, 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* (Nucleotide binding site leucine-rich repeat), роль которых в формировании устойчивости к патогенам описана для многих видов растений, в том числе и винограда (Zini et 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 (Cochetel et al., 2021). Аналогичный анализ структуры локуса *RUN1/RPVI* 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.

Также, для анализа качества сборки было произведено выравнивание сборки, полученной гибридным методом на доступный геном *V. vinifera* 12X для идентификации участков, которые не совпадают между сборкой у *V. rotundifolia* и *V. vinifera*, имеющих полное соответствие геному *V. vinifera*. Выравнивание было произведено с помощью п.о.bwa-mem, далее выравнивание было конвертировано в участки представляющие собой интервал на каждой хромосоме (ranges) в среде R. С помощью пакета karyotype R в среде R был визуализирован геном *V. vinifera* 12X и шкалирован на участки длиной 1 миллион п.н. (мегабаз). После этого полученные участки выравнивания гибридной сборки *V. rotundifolia* и *V. vinifera* 12X были сопоставлены с геномом *V. vinifera* 12X.

Известно, что *V. rotundifolia* и *V. vinifera* принадлежат к семейству Viciae, содержащее примерно 950 видов и 16 родов (Wen et al. 2018). Эти роды дивергировали, что повлекло за собой несколько хромосомных перестроек (Karkamkar et al. 2010; Wen et al. 2018). Так, *V. vinifera* имеет 19 хромосом ($2n=38$), а *V. rotundifolia* 20 ($2n=40$) (Branas 1932; Patil and Patil 1992; Karkamkar et al. 2010; Chu et al. 2018). Хромосома 7 *V. vinifera* является результатом слияния хромосом 7 и 20 *V. rotundifolia*. Высота пиков означает большее количество регионов в данном месте выравнивания. На рисунке 29 можно увидеть, что хромосома 7 сборки *V. rotundifolia* короче хромосомы *V. vinifera* ~ на 6 т. п.н. Синим цветом представлены регионы выравнивания. Высота пиков означает большее количество регионов в данном месте выравнивания.



Рисунок 29 – Сборка *V. rotundifolia* выровненная на сборку *V. vinifera*. Синим цветом представлены регионы выравнивания. Высота пиков означает большее количество регионов в данном месте выравнивания.

Всего на геном *V. vinifera* 12X алгоритмом bwa-mem было выровнено 95% сборки. Однако, средний показатель выравнивания сборки составил около 1.2 участков на участок генома. Это означает, что покрытие гибридной сборки в среднем составило ~1X. В таблице 20 представлено среднее значение выравнивания регионов на хромосомы и пиковое значение выравнивания.

Таблица 20 – Статистика выравнивания с помощью bwa-mem генома *V. rotundifolia*, собранного гибридным методом на геном *V. vinifera*.

№ хромосомы	Средняя глубина покрытия (среднее количество выровненных регионов)	Максимальная глубина покрытия (максимальное количество выровненных регионов/пиковое значение)
1	1.2	206
2	1.2	73
3	1.2	109
4	1.2	244
5	1.2	4824
6	1.2	56
7	1.2	271
8	1.2	124
9	1.2	174
10	1.2	141
11	1.2	178
12	1.2	278
13	1.2	6910
14	1.3	118
15	1.2	164
16	1.2	97
17	1.2	104
18	1.2	64
19	1.2	112

Известно, что хромосомы 12 значительно различаются у *V. vinifera* и *V. rotundifolia* (Chu et al. 2018; Wen et al. 2018).

При выравнивании на хромосому 12 генома *V. vinifera* полученной сборки было детектировано 3,776 различных вставок, делеций, повторов. Всего было получено 4.43 Mbp сборки, несущих в себе явные различия на 12 хромосоме по сравнению с *V. vinifera*

(рис. 30, приложение 5). Впервые было проведено полногеномное секвенирование устойчивого к грибным заболеваниям вида *V. rotundifolia* и выравнивание полученной сборки на хромосому 12 в геноме *V. vinifera*.

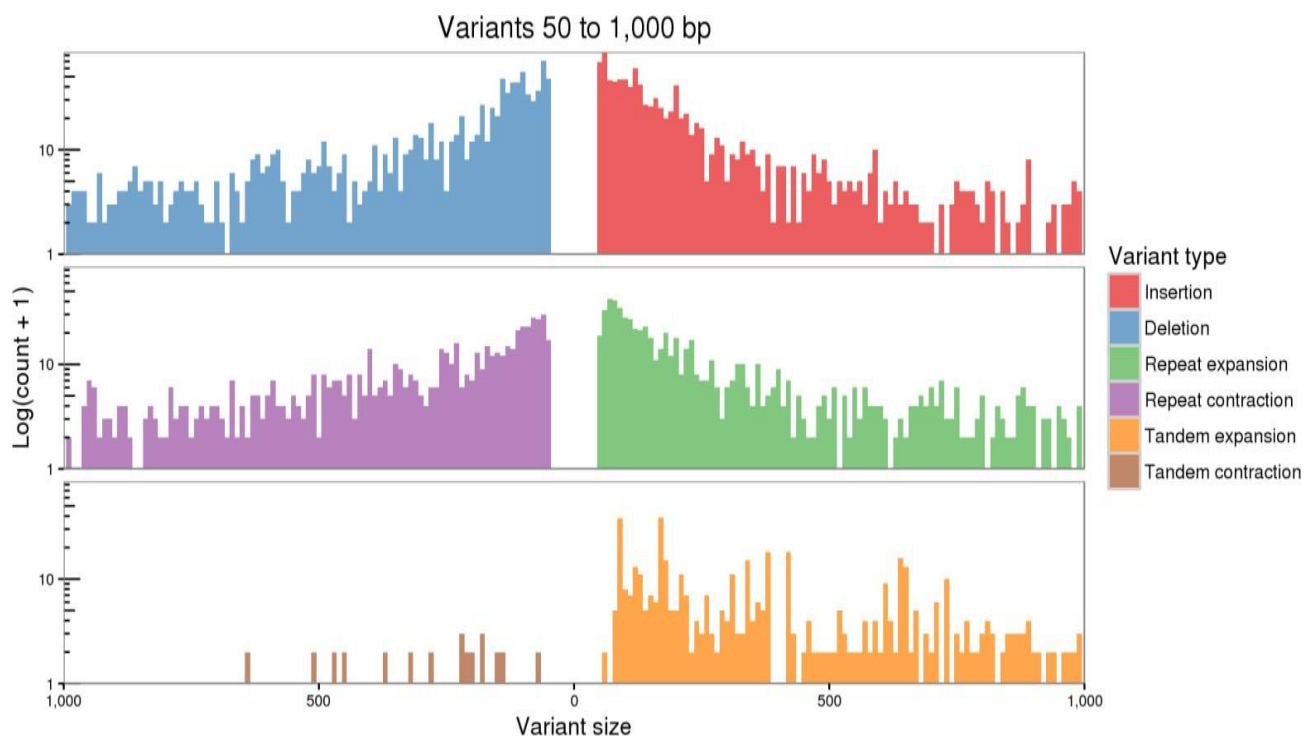


Рисунок 30 – Графическое представление различий между хромосомой 12 сборок *V. rotundifolia* и *V. vinifera*.

Примечание: по оси X представлен размер в п.н., по оси Y логарифмированное количество п.н. Цветами представлены: Insertion (красный цвет) - вставки, deletion (синий цвет) - выпадения/делеции, repeat expansion (зелёный цвет) расширение участка с повторами, repeat contraction (фиолетовый цвет) - сокращение участка с повторами, tandem expansion (оранжевый цвет) - расширение тандемного повтора, tandem contraction (коричневый цвет) - сокращение участка тандемного повтора.

Доступность данных. Сырые данные секвенирования генома *Vitis rotundifolia* двух ячеек minION были депонированы в базу данных Национального центра биотехнологической информации США (U.S. National Center for Biotechnology Information, NCBI) (NCBI..., 2020) и базу данных SRA (Sequence Reads Archive) (Bioproject: PRJNA649974; Biosample: SAMN15690594; SRA ENA: SRS7124084). Данные сборки гибридным методом (hybrid SPAdes) доступны в базе данных ENA (PRJNA649974).

Данный раздел работ выполнен при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-316-90007.

3.6 Влияние фитогормонов при введении в культуру *in vitro* винограда

Методы микрклонального размножения апикальными меристемами служат для получения свободных от вирусов растений. 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 малыми размерами апикальной меристемы, собственно меристеме бывает трудно вычленивать без повреждений, поэтому часто отделяли вместе с ней один-два листовых примордия.

Для апробации различных условий (состава и концентрации регуляторов роста в питательной среде для инициации роста микрорастений) введения в культуру *in vitro* мы использовали ранее зарекомендовавшие себя питательные среды из литературных источников, всего 5 вариантов (табл. 6). На каждую питательную среду были введены по 10 меристем 13 сортов винограда в двух повторностях (Агаханов, Ухатова, 2019). Задачей данного этапа работ было выявить состав питательной среды, на котором наиболее эффективно приживались бы меристемы винограда генотипированных ранее сортов. В дальнейшей работе по показателям микроразмножения и морфометрии изучали часть сортов из этой выборки. В дальнейшей работе по оценке эффективности микроразмножения исследовали выборку из 10 других сортов. Следовательно, на каждую питательную среду было введено 130 меристем, и число выживших не пораженных меристем варьировало от 58 до 107 шт. Проведенные наблюдения в течение двух недель показали, что на первом этапе выращивания часть меристем была поражена грибной инфекцией, часть некротизировалась, на некоторых питательных средах меристемы 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. В наших исследованиях рост и развитие апикальных меристем были отмечены у всех изучаемых сортов, при этом эти процессы у испытываемых сортов винограда протекали неодинаково (табл. 21).

Таблица 21 – Микроклональное размножение ампелографической коллекции филиала Дагестанская опытная станция ВИР (ДОС ВИР)

№	Сорт	Номер по каталогу ВИР	Количество меристем на ПС	В том числе на питательную среду				
				МС 0,5мг/л БАП	МС 1 мг/л БАП	МС 1,5 мг/л БАП + 0,2 ИМК	МС+1 мг/л кинетин	МС + 1,5 мг/л кинетин + 0,1 ИМК
1	‘Гимра’	41686	10	7	9	4	3	7
2	‘Семильон’	49415	10	6	8	6	4	7
3	‘Кишмиш Ваткана’	41752	10	6	7	4	6	6
4	‘Гюляби розовый’	41707	10	8	8	4	4	8
5	‘Серсиаль’	41852	10	7	7	5	4	6
6	‘Сафта дурмаз’	41776	10	6	8	7	5	4
7	‘Коз узюм’	41686	10	5	9	7	6	4
8	‘Хоца цибил’	–	10	6	8	6	5	3
9	‘Баят капы’	–	10	7	8	7	5	6
10	‘Алиготе’	41810	10	7	10	6	3	7
11	‘Рислинг’	41824	10	6	10	7	4	5
12	‘Бианка’	41918	10	6	7	7	3	5
13	‘Чол бер’	41677	10	5	8	6	6	9

На этапе введения в культуру *in vitro* самая низкая жизнеспособность была выявлена на питательных средах МС + 1мг/л кинетин – 44%, а самые высокие показатели на питательных средах МС 1 мг/л БАП – 82%. Средние величины жизнеспособности были отмечены на питательных среда МС БАП+0,5 мг/л 63%, МС БАП 1,5 мг/л + ИМК 0,2 мг/л – 58% и МС кинетин 1,5 мг/л + ИМК 0,1 мг/л 59% (табл. 22).

Таблица 22 – Процент прижившихся эксплантов при введении в культуру *in vitro*

Показатели	В том числе на питательную среду				
	МС 0,5мг/л БАП	МС 1 мг/л БАП	МС 1,5 мг/л БАП + 0,2 ИМК	МС 1 мг/л Кинетин	МС 1,5 мг/л кинетин+ 0,1 ИМК
Общее количество прижившихся меристем шт.	82	107	76	58	77
%, прижившихся	63	82	58	44	59

Степень жизнеспособности при введении в культуру *in vitro*, таким образом, больше зависела от регуляторов роста и от генотипических особенностей сорта. Полученные нами данные согласуются с данными других авторов (Mostafa, 2015, Tarinejad, 2019).

В рамках настоящего диссертационного исследования изучали показатели культивирования в стерильных условиях (введение в культуру *in vitro*, микроразмножение, укоренение) 10 сортов винограда (табл. 23) в трех повторностях на питательной среде МС (Murashige, Scoog, 1962) с добавлением 1 мг/л 6-БАП.

Таблица 23 – Коэффициент приживаемости эксплантов после введения в культуру *in vitro*

№	Сорт	Номер по каталогу ВИР	Кол-во высаженных эксплантов, шт.	Кол-во инфицированных эксплантов, шт.	Кол-во инфицированных эксплантов, %	Кол-во эксплантов с некрозом, шт.	Приживаемость	
							шт.	%
1	‘Кишмиш мускатный’	41712	20	4	20,0	1	15	75
2	‘Рислинг’	41824	20	3	15,0	1	16	80,0
3	‘Семильон’	49415	20	1	5,0	4	15	75,0
4	‘Бианка’	41918	20	2	10,0	4	14	70,0
5	‘Ахтамар’	41758	20	0	0,0	2	18	90,0
6	‘Чол бер’	41677	20	1	5,0	0	19	95,0
7	‘Джунга’	41664	20	1	5,0	2	17	85,0
8	‘Кишмиш Ваткана’	41752	20	2	10,0	3	15	75,0
9	‘Баят капы’	–	20	3	15,0	2	15	75,0
10	‘Серсиналь’	41852	20	2	10	2	16	80

Степень приживаемости апикальных меристем при введении в культуру *in vitro* достигала 70 - 95%. Наибольший процент инфицированности наблюдали у сортов 'Кишмиш мускатный' (20%), 'Рислинг' (15%), 'Баят капы' (15%), 'Серсиналь' (10%), 'Кишмиш Ваткана' (10%), 'Бианка' (10%). У сортов 'Чол бер', 'Ахтамар' и 'Джунга' (95%, 90%, 85%) отмечен самый высокий уровень приживаемости (табл. 23).

Кроме того, измеряли высоту микрорастений винограда. По морфогенетическому потенциалу наибольший размер (в см) на 30 сутки отмечали у сортов 'Кишмиш мускатный' ($4,1 \pm 0,56$), 'Чол бер' ($3,95 \pm 1,20$), 'Рислинг' ($3,8 \pm 0,75$) (рис. 31).

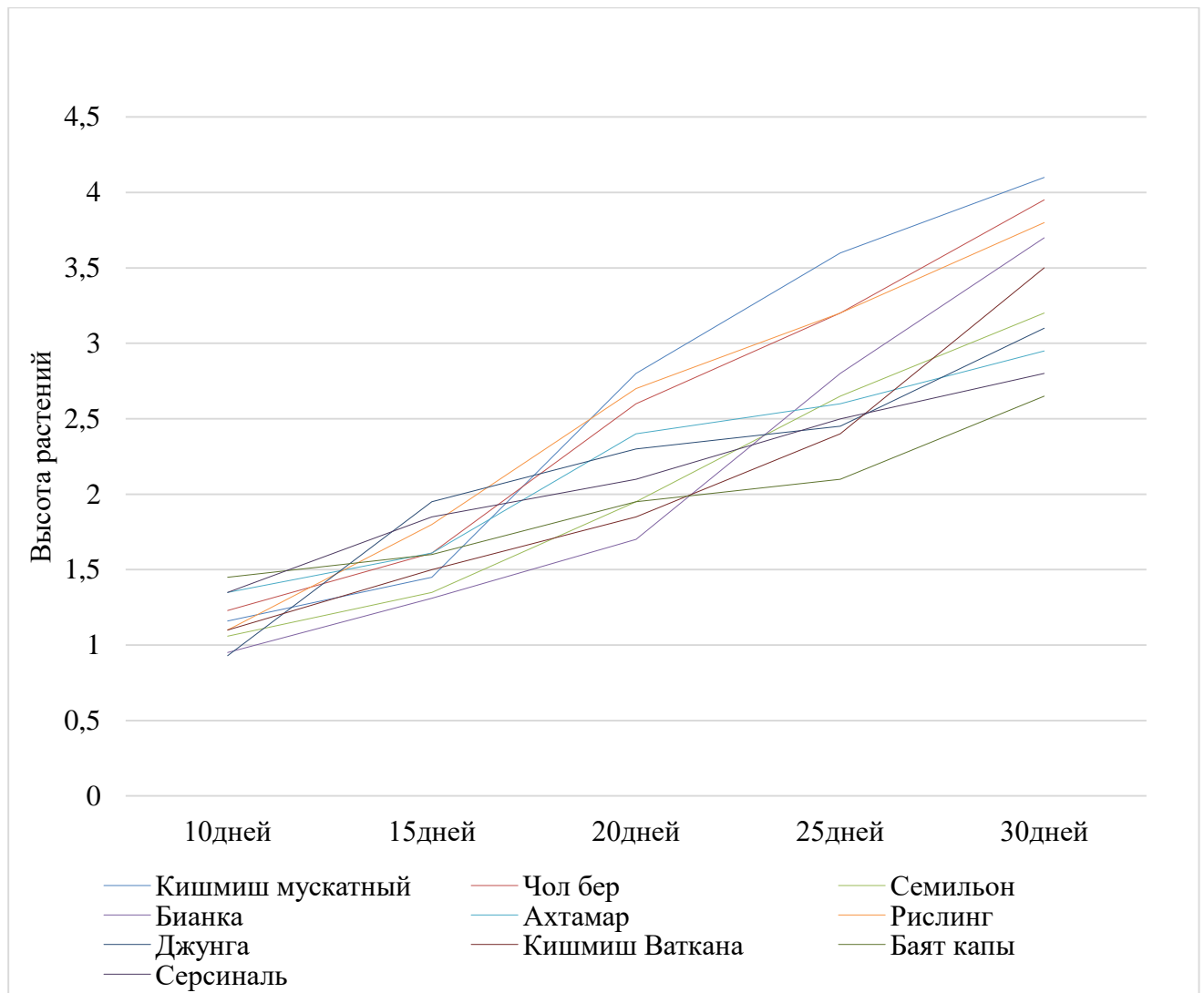


Рисунок 31 – Динамика изменения высоты микрорастений винограда в культуре *in vitro*

Кроме того, была изучена способность к микроразмножению 10 сортов винограда и отмечены межсортные различия по уровню коэффициент микрклонального размножения (КМР). В качестве эксплантов использовали одноузловые черенки микрорастений в количестве 10 повторностей на генотип. Через шесть недель культивирования на питательной среде

Мурасиге и Скуга (МС) + 1 мг/л бензоаминопурина (БАП) + 0,1 мг/л индолил-масляной кислоты (ИМК) подсчитывали КМР эксплантов. Образцы со значениями КМР \geq 3 после 6-недельного культивирования на питательной среде были перенесены на среду ½ МС без гормонов для среднесрочного *in vitro* хранения. Дисперсионный анализ показал, что 10 образцов винограда достоверно различия по уровню КМР ($p < 0,000$). На рисунке 32, представлен КМР 10 образцов винограда.

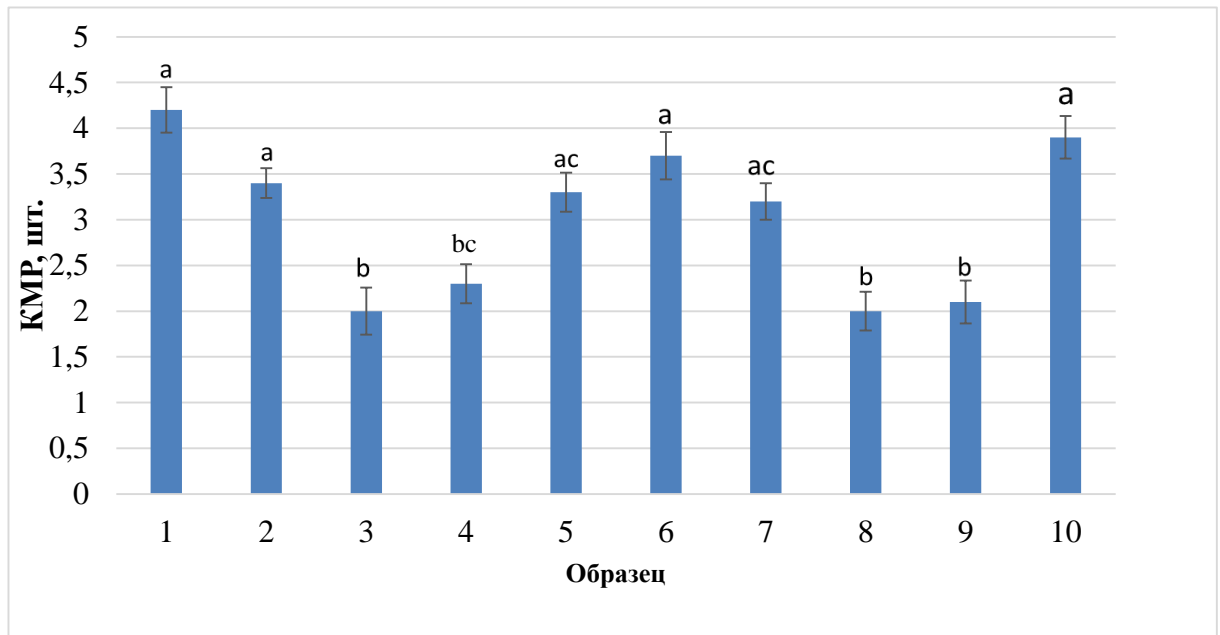


Рисунок 32 – Коэффициент микроразмножения изученных генотипов винограда.

Примечание: Одинаковыми буквами обозначены не различающиеся по критерию Тьюки образцы

Наибольшим КМР характеризовались образцы ‘Кишмиш мускатный’, ‘Рислинг’, ‘Чол бер’, ‘Серсиаль’ (КМР 3,4-4,2), достоверно превышавшие по этому показателю образцы ‘Кишмиш Ваткана’, ‘Семильон’, ‘Баят капы’ (КМР 2,0-2,1). Влияние группы происхождения на КМР образца было недостоверным.

Таким образом, подобрана питательная среда для ускоренного микроразмножения и получения КМР \geq 3,1 60% изученной выборки образцов винограда. Остальные образцы требуют более индивидуального подбора состава питательной среды для получения высоких показателей микроразмножения.

Данный раздел выполнен в рамках государственного задания ВИР по теме № 0481-2022-0004 «Совершенствование подходов и методов ex situ сохранения идентифицированного генофонда вегетативно размножаемых культур и их диких родичей, разработка технологий их эффективного использования в селекции».

Заключение

1. В результате трехлетнего изучения 73 образцов ампелографической коллекции ВИР выявлено большое разнообразие сортов, относящихся к разным эколого-географическим группам, по продолжительности вегетационного периода.

2. Анализ данных устойчивости, проявленной образцами за три года на высоком естественном инфекционном фоне, показал, что 93% образцов изученной выборки восприимчивы к поражению милдью и оидиумом в средней и сильной степени. Выявлены 7% высоко устойчивых к оидиуму листьев и гроздей, к милдью листьев и гроздей сортов винограда ('Виерул-59', 'Шоколадный', 'Грочанка', 'Ливадийский черный', 'Слава Дербента', 'Йорк Мадера', 'Варюшкин', 'Дунаевски лазур'). Кроме того, был выявлен устойчивый образец автохтонный сорт 'Кара яй изюм', проявивший устойчивость к обоим грибным заболеваниям во все годы исследования.

Оценка устойчивости к болезням гибридов винограда F₁, полученных от скрещиваний ♂ 'Кара яй изюм' с неустойчивыми сортами с женским типом цветка, позволила выявить гибридные сеянцы с иммунитетом (9 баллов) к оидиуму листьев и гроздей, а также к милдью листьев; устойчивые (7 баллов) к оидиуму листьев и гроздей, а также милдью листьев и гроздей.

3. Анализ популяционной структуры, по результатам микросателлитного маркирования, позволил сделать вывод о том, что гибриды от скрещивания 3 (♀ 'Аг чакракар' × ♂ 'Кара яй изюм'), 6 (♀ 'Махбор цибил' × ♂ 'Кара яй изюм') и скрещивание 8 (♀ 'Ири тумут' × ♂ 'Кара яй изюм') не имеют признаков генетического засорения и потенциально могут быть использованы для селекционных целей.

4. На основе микросателлитного анализа дифференцированы кластеры генотипов винограда ампелографической коллекции ВИР, сохраняемой в полевых условиях ДОС ВИР. Первый кластер объединил 18 образцов, представляющих западноевропейскую эколого-географическую группу сортов винограда (convar *occidentalis* Negr.). Второй кластер включал 28 сортов винограда, относящихся к восточной эколого-географической группе convar *orientalis* Negr. В третий кластер вошли автохтонные сорта Дагестана, представляющие эколого-географическую группу сортов бассейна Черного моря (convar *pontica* Negr.) В четвертую группу вошли европейско-азиатские, внутривидовые, смешанно-комплексно устойчивые и межвидовые гибриды. Данные о генотипической структуре коллекции винограда ВИР будут рекомендованы селекционерам при подборе пар для скрещиваний.

5. В результате секвенирования образца устойчивого к грибным заболеваниям вида *V. rotundifolia* сорта 'Dixie' получено 1,6 млн высококачественных прочтений длиной ~5 тыс. пн,

составивших в общей сложности более 10 млрд пн. Проведено сравнение геномов *V. vinifera* и *V. rotundifolia* и выравнивание полученной сборки на хромосому 12 в геноме *V. vinifera*.

Результаты впервые секвенированного генома образца вида *V. rotundifolia* сорта 'Dixie' опубликованы в базе данных Национального центра биотехнологической информации США (U.S. National Center for Biotechnology Information, NCBI) (NCBI Bioproject 649974, 2020) и базе данных SRA (Sequence Reads Archive) (Bioproject: PRJNA649974; Biosample: SAMN15690594; SRA ENA: SRS7124084). Данные сборки гибридным методом (hybrid SPAdes) доступны в базе данных ENA (PRJNA649974). Создан исследовательский ресурс для молекулярно-генетической идентификации генов устойчивости к болезням и вредителям винограда, донором которых является этот североамериканский вид.

6. Введены в культуру *in vitro* и дифференцированы по способности к микроклональному размножению образцы винограда различных групп происхождения. Установлено достоверное влияние генотипа на коэффициент микроклонального размножения ($p < 0,05$).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авидзба А. М., Волынкин В. А., Лиховской В. В., Полулях А. А., Трошин Л. П. Мировые ампелографические коллекции: ННИИВИВ «Магарач» и СКЗНИИСИВ //Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – №. 110. – С. 1444-1470.
2. 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. – 2018. – Т. 179. – №. 3. – С. 224-234. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2018-3-224-234>
3. Агаханов М. М., Ульянич П. С. К вопросу о полногеномном секвенировании иммунного к грибным заболеваниям вида *Vitis rotundifolia* Michx //Виноградарство и виноделие. – 2020. – Т. 49. – С. 18-20.
4. Агаханов М. М., Ухатова Ю. В. Изучение влияния регуляторов роста при введении винограда в культуру *in vitro* //125 years of Applied Botany in Russia. – 2019. – С. 67-67. <https://doi.org/10.30901/978-5-907145-39-9>
5. Агаханов М. М., Григорьева Е. А., Поточкина 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. – Т. 182. – №. 2. – С. 63-71. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2021-2-63-71>
6. Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях//М.: ИКЦ “Академкнига” – 2003. – С. 431
7. Ампелография СССР. – М.: Пищепромиздат, 1946. – Т.1. – С. 161.
8. Ампелография СССР. Отечественные сорта винограда. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 504 с.
9. Антонова О. Ю., Апаликова О. В., Ухатова Ю. В., Крылова Е. А., Шувалов О. Ю., Шувалова А. Р., Гавриленко Т. А. Оздоровление микрорастений трех культурных видов картофеля (*Solanum tuberosum* L., *S. phureja* Juz. & Buk. и *S. stenotomum* Juz. & Buk.) от вирусов методом комбинированной термо-химиотерапии//Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т. 52. - 1. С. 95-104. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.1.95rus>
10. Баздырев Г. И., Третьяков Н. Н., Белощапкина О. О. Интегрированная защита растений от вредных организмов. – 2014. –С. 302
11. Батукаев А. А., Палаева Д. О., Собралиева Э. А. Совершенствование состава питательных сред при микрочеренковании винограда *in vitro* //Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. – 2018. – Т. 18. – С. 76-80. <https://doi.org/10.30679/2587-9847-2018-18-76-80>

12. Батукаев А. А., Шишхаева М. Г. Оптимизация питательной среды при размножении новых сортов винограда *in vitro*. – 2018. – С. 1176-1179. [https:// doi/10.31255/978-5-94797-319-8-1176-1179](https://doi.org/10.31255/978-5-94797-319-8-1176-1179)
13. Батукаев А. А., Эдиева Х., Батукаев М. С. Биотехнологические методы ускоренного размножения винограда //Научные труды Государственного научного учреждения Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского института садоводства и виноградарства Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2013. – Т. 1. – С. 271-275.
14. Беспалова Е.С., Агаханов М.М., Архимандритова С.Б., Ерастенкова М.В., Ухатова Ю.В. Оздоровление сортов картофеля из коллекции ВИР от вирусов//Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2020. – Т.181. - №. 4. - С. 164-172. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2020-4-164-172>
15. Беспалова Е. С., Ухатова Ю. В., Волкова Н. Н., Овэс Е. В., Гаитова Н. А., Гавриленко Т. А. Изучение посткриогенного регенерационного потенциала сортов картофеля в разных условиях культивирования//Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2019. – Т. 23. - №3. - С. 281-286. <https://doi.org/10.18699/VJ19.500>
16. Браткова Л. Г., Цаценко Н. Н. Клональное микроразмножение винограда //Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29. – №. 6. – С. 49-52.
17. Бузин Н., Принц Я., Лазаревский М., Негруль А., Кац Я. Виноградарство //М.: Сельхозгиз. – 1937.
18. Волков В. А., Григорьева Е. А., Агаханов М. М. Возможности технологий нанопорового секвенирования для изучения метилома винограда //Виноградарство и виноделие. – 2020. – Т. 49. – С. 24-26.
19. Волынкин В. А., Лиховской В. В., Васылык И. А., Рыбаченко Н. А., Луцкай Е. А., Гориславец С. М., Володин В. А., Рисованная В. И., Потокина Е. К. Интрогрессии *Vitis rotundifolia* Michx. для получения генотипов винограда с комплексной устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессам //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – Т. 25. – №. 7. – С. 693-700. <https://doi.org/10.18699/VJ21.079>
20. Волынкин В.А. Зленко В.А., Популях А.А., Олейников Н.П., Лиховской В.В. Результаты экспериментальных исследований формирования генетического разнообразия у семейства винограда Vitaceae в процессе естественной эволюции //Виноградарство и виноделие. – 2010. – Т. 40. – С. 12-16.
21. Гостимский С. А., Кокаева З. Г., Коновалов Ф. А. Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров //Генетика. – 2005. – Т. 41. – №. 4. – С. 480-492.

22. Григорьева Е. А., Агаханов М.М., Александрова И.В., Волков В.А. Полногеномное секвенирование культурных дикорастущих форм винограда (*Vitis vinifera* L.) //Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 5. – №. 1. – С. 13-18. <https://doi.org/10.18699/Letters2019-5-2>
23. Дунаева С. Е., Антонова О. Ю., Пендинен Г. И., Швачко Н. А., Гавриленко Т. А. Сохранение генетического разнообразия вегетативно размножаемых культур растений в контролируемых условиях среды в ВИРе //Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2012. – Т. 169. – С. 245-256.
24. Дунаева С. Е., Орлова С. Ю., Тихонова О. А., Гавриленко Т. А. Образцы ягодных и плодовых культур и их дикорастущих родичей в коллекции *in vitro* ВИР //Биотехнология и селекция растений. – 2019. – Т. 1. – №. 1. – С. 43-51. <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2018-1-43-51>
25. Дунаева С. Е., Трускинов Э. В., Антонова О. Ю., Пендинен Г. И., Лупышева Ю. В., Швачко Н. А. Стратегия долгосрочного сохранения генофонда вегетативно размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды //Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2007. – Т. 164. – С. 273-285.
26. Ефремова О.С., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А. Длительное сохранение современных российских сортов картофеля в криобанке ВИР. Биотехнология и селекция растений. – 2020. – Т. 3. – №. 3. – С. 68-76. <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2020-3-01>
27. Ильницкая Е. Т., Макаркина М. В. Применение ДНК-маркеров в современных селекционно-генетических исследованиях винограда //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Т. 20. – №. 4. – С. 528-536. <https://doi.org/10.18699/VJ16.163>
28. Камнев А.М., Антонова О.Ю., Дунаева С.Е., Гавриленко Т.А., Чухина И.Г. Молекулярные маркеры в исследованиях генетического разнообразия представителей рода *Rubus* L. и перспективы их применения в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2020. – Т. 24. – №. 1. – С. 20. <https://doi.org/10.18699/VJ20.591>
29. Киселева А. А., Вержук В. Г., Савельев Н. И., Дорохов Д. С., Желтиков Ю. В., Еремина О. В., Потокина Е.К., Дзюбенко, Н. И. Методы мониторинга генетической стабильности плодовых культур в условиях криоконсервации //Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2012. – Т. 169. – С. 280-8.
30. Кислин Е. Н., Носульчак В. А., Дзюбенко Н. И. Ампелографическая коллекция ВИР им. Н.И. Вавилова. Прошлое, настоящее и будущее //Магарач. Виноградарство и виноделие. – 2015. – №. 3. – С. 14-16.

31. Конарев А. В., Губарева Н. К., Гаврилюк И. П., Пенева Т. И., Перчук И. Н., Лоскутов И. Г. Молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия *ex situ* //Кариология и молекулярная систематика: труды. – 2009. – С. 141-146.
32. Котляр В. К., Ильницкая Е. Т. К вопросу о генетике устойчивости винограда к филлоксере (*Daktulosphaira vitifoliae*) //Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2021. – №. 68. – С. 79-93.
33. Ларькина М.Д., Никулушкина Г.Е., Никольский М.А. Основные методы селекции винограда//К.: Юг. –2015. –С. 40
34. Лиховской В. В. Методология совершенствования генетического разнообразия и сортимента винограда // дис. – Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия. – 2018.
35. Митюшев И. М. Защита винограда от вредителей: учебное пособие //М.: Изд-во РГАУ—МСХА имени КА Тимирязева. – 2013.
36. Научно-исследовательский отчет «Дальневосточной опытной станции» // – Всероссийский институт генетических ресурсов растений, им. Н.И. Вавилова. –1989
37. Научно-исследовательский отчет «Дальневосточной опытной станции филиала ВИР» // – Всероссийский институт генетических ресурсов растений, им. Н.И. Вавилова. –2021
38. Научно-исследовательский отчет «Дагестанской опытной станции филиала ВИР» // – Всероссийский институт генетических ресурсов растений, им. Н.И. Вавилова. –1975
39. Научно-исследовательский отчет «Дагестанской опытной станции филиала ВИР» // – Всероссийский институт генетических ресурсов растений, им. Н.И. Вавилова. –2014
40. Научно-исследовательский отчет «Дагестанской опытной станции филиала ВИР» // – Всероссийский институт генетических ресурсов растений, им. Н.И. Вавилова. –2021
41. Научно-исследовательский отчет «Крымской опытно-селекционной станции филиала ВИР» // – Всероссийский институт генетических ресурсов растений, им. Н.И. Вавилова. – 2021
42. Негруль А. М. Ампелография с основами виноградарства. – Рипол Классик, 1979.
43. Носульчак В. А., Смурыгин А. С., Трошин Л. П. Сбор, сохранение и анализ генофонда винограда России //Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2006. – №. 19. – С. 107-134.
44. Орлова С. Ю., Павлов А. В., Вержук В. Г. Жизнеспособность пыльцы сортов черешни (*Cerasus avium*) различного эколого-географического происхождения в условиях Северо-Западного региона России //Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2019. – Т. 180. – №. 1. – С. 66-72. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2019-1-66-72>

45. Полулях А. А., Волынкин В. А., Лиховской В. В. Генетические ресурсы винограда института «Магарач». Проблемы и перспективы сохранения //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т. 21. – №. 6. – С. 608-616. <https://doi.org/10.18699/VJ17.276>
46. Потокина Е. К. Прикладные аспекты структурной и функциональной геномики растений (на примере родов *Vicia L.* и *Hordeum L.*): дис. – Всерос. науч.-исслед. ин-т растениеводства им. НИ Вавилова РАСХН, 2008.
47. Потокина Е. К. Прикладные аспекты структурной и функциональной геномики растений (на примере родов *Vicia L.* и *Hordeum L.*): дис. – Всерос. науч.-исслед. ин-т растениеводства им. НИ Вавилова РАСХН, 2008.
48. Пузырева В.Г. Совершенствование клонального микроразмножения винограда для создания коллекции генофонда *in vitro*: дис. – ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина»
49. Ребров А. Н. Влияние препаратов мелафен и селиплант-у на повышение адаптивности маточных растений подвойного сорта винограда 101-14 в условиях песчаного массива //Русский виноград. – 2016. – Т. 4. – С. 78-82.
50. Савин Г. А. Генофонд винограда //Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии. – 1990. – №. 8. – С. 7-8.
51. Тихонова О. А., Гаврилова О. А., Радченко Е. А., Вержук В. Г., Павлов А. В. Жизнеспособность пыльцы черной смородины до и после криоконсервирования в жидком азоте и особенности ее морфологии //Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2020. – Т. 181. – №. 3. – С. 110-119. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2020-3-110-119>
52. Трифонова А. А. Генетическое разнообразие в популяциях особо охраняемых видов растений Волгоградской области. Дисс. – Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова. – 2018.
53. Ухатова Ю. В. Совершенствование методов криоконсервации и оздоровления от вирусных болезней образцов вегетативно размножаемых культур: дисс. – Санкт-Петербург: ВИР, 2017.
54. Ухатова Ю. В. Совершенствование методов криоконсервации и оздоровления от вирусных болезней образцов вегетативно размножаемых культур: Автореф... дис. кан. биол. наук. – Санкт-Петербург.: 2017. – 22 с.
55. Ухатова Ю. В., Гавриленко Т. А. Методы криоконсервации вегетативно размножаемых культурных растений //Биотехнология и селекция растений. – 2019. – Т. 1. – №. 1. – С. 52-63. <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2018-1-52-63>
56. Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 17. – №. 4/2. – С. 1044-1054.

57. Хлесткина Е. К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т. 15. – №. 4. – С. 757-767.
58. Abdullahi I., Rott M. Microarray immunoassay for the detection of grapevine and tree fruit viruses //Journal of Virological Methods. – 2009. – Т. 160. – №. 1-2. – С. 90-100. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.04.027>
59. Adam-Blondon A. F., Roux C., Claux D., Butterlin G., Merdinoglu D., This P. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics //Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – Т. 109. – №. 5. – С. 1017-1027. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1704-y>
60. 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. <https://doi.org/10.18699/ICG-PlantGen2019-11>
61. Agrawal A., Singh S., Malhotra E. V., Meena D. P. S., Tyagi R. K. In vitro conservation and cryopreservation of clonally propagated horticultural species //Conservation and Utilization of Horticultural Genetic Resources. – Springer, Singapore, 2019. – С. 529-578. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3669-0_18
62. Agrios G. N. Plant Pathology, 5th Edn Burlington //MA: Elsevier Academic Press. [Google Scholar]. – 2005
63. Alleweldt G., Possingham J. V. Progress in grapevine breeding //Theoretical and Applied Genetics. – 1988. – Т. 75. – №. 5. – С. 669-673. <https://doi.org/10.1007/BF00265585>
64. Anhalt U., Crespo Martínez S., Rühl E., Forneck A. Dynamic grapevine clones—an AFLP-marker study of the *Vitis vinifera* cultivar Riesling comprising 86 clones //Tree Genetics & Genomes. – 2011. – Т. 7. – №. 4. – С. 739-746. <https://doi.org/10.1007/s11295-011-0370-x>
65. Antipov D., Hartwick N., Shen M., Raiko M., Lapidus A., Pevzner P. A. plasmidSPAdes: assembling plasmids from whole genome sequencing data //Bioinformatics. – 2016. – Т. 32. – №. 22. – С. 3380-3387. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw493>
66. Aradhya M., Wang Y., Walker M. A., Prins B. H., Koehmstedt A. M., Velasco D. Genetic diversity, structure, and patterns of differentiation in the genus *Vitis* //Plant Systematics and Evolution. – 2013. – Т. 299. – №. 2. – С. 317-330. <https://doi.org/10.1007/s00606-012-0723-4>
67. Armstrong T. T. J., De Lange P. J. Conservation genetics of *Hebe speciosa* (Plantaginaceae) an endangered New Zealand shrub //Botanical Journal of the Linnean Society. – 2005. – Т. 149. – №. 2. – С. 229-239. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2005.00437.x>

68. Arroyo-García R., Lefort F., Andrés M. T. D., Ibáñez J., Borrego J., Jouve N., Martínez-Zapater J. M. Chloroplast microsatellite polymorphisms in *Vitis* species //Genome. – 2002. – T. 45. – №. 6. – C. 1142-1149. <https://doi.org/10.1139/g02-087>
69. Banerjee A., Duflo E., Postel-Vinay G., Watts T. Long run health impacts of income shocks: wine and phylloxera in 19th century France //Massachusetts Institute of Technology, Department of Economics, Working Paper Series. 2007. P. 1–29.
70. 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. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-2030-8>
71. Barlass M., Skene K. G. M. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine: II. Factors affecting growth and differentiation in vitro //Journal of Experimental Botany. – 1980. – T. 31. – №. 2. – C. 489-495. <https://doi.org/10.1093/jxb/31.2.489>
72. Basheer-Salimia R., Mujahed A. Genetic diversity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) as revealed by ISSR markers //Journal of Plant Biotechnology. – 2019. – T. 46. – №. 1. – C. 1-8. <https://doi.org/10.5010/JPB.2019.46.1.001>
73. Bellin D., Peressotti E., Merdinoglu D., Wiedemann-Merdinoglu S., Adam-Blondon A. F., Cipriani G., Morgante M., Testolin R., Di Gaspero G. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine ‘Bianca’ is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. //Theoretical and Applied Genetics. – 2009. – T. 120. – №. 1. – C. 163-176. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1167-2>
74. Bellin D., Velasco R., Grando M. S. Intravarietal DNA polymorphisms in grapevine (*Vitis vinifera* L.) //International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture 546. – 2000. – C. 343-349. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.546.42>
75. Benheim D., Rochfort S., Robertson E., Potter I. D., Powell K. S. Grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*)—a review of potential detection and alternative management options //Annals of Applied Biology. – 2012. – T. 161. – №. 2. – C. 91-115. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2012.00561.x>
76. Bentley D. L. Coupling mRNA processing with transcription in time and space //Nature Reviews Genetics. – 2014. – T. 15. – №. 3. – C. 163- 175. <https://doi.org/10.1038/nrg3662>
77. Bettoni J. C., Kretschma A. A., Bonnart R., Shepherd A., Volk G. M. Cryopreservation of 12 *Vitis* species using apical shoot tips derived from plants grown *in vitro* //HortScience. – 2019. – T. 54. – №. 6. – C. 976-981. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13958-19>

78. Bettoni J. C., Marković Z., Bi W., Volk G. M., Matsumoto T., Wang Q. C. Grapevine Shoot Tip Cryopreservation and Cryotherapy: Secure Storage of Disease-Free Plants //Plants. – 2021. – T. 10. – №. 10. – C. 2190. <https://doi.org/10.3390/plants10102190>
79. Bettoni J.C., Bonnart R., Shepherd A., Kretschmar A.A., Volk G.M. Modifications to a Vitis shoot tip cryopreservation procedure: Effect of shoot tip size and use of cryoplates. //CryoLetters. – 2019. – T. 40. – №. 2. – C. 103-112.
80. Bi W.L., Hao X.Y., Cui Z.H., Volk G.M., Wang Q. Droplet-vitrification cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of grapevine (*Vitis* spp.) //In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2018. – T. 54. – №. 6. – C. 590-599. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9931-0>
81. Bignon V., Caroli E., Galbiati R. Stealing to survive: Crime and income shocks in 19th century France //Available at SSRN 2012989. – 2012. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.2012989>
82. Bisztray G. D., Korbuly J., Halász J., Oláh R., Ruthner S., Deák T., Pedryc, A. Characterization of grape varieties and species by RAPD markers //VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding 603. – 2002. – C. 601-604. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.603.80>
83. Bitsadze N., Aznarashvili M., Vercesi A., Chipashvili R., Failla O., Maghradze D. Screening of Georgian grapevine germplasm for susceptibility to downy mildew (*Plasmopara viticola*) //VITIS-Journal of Grapevine Research. – 2015. – T. 54. – C. 193-196.
84. Blasi P., Blanc S., Wiedemann-Merdinoglu S., Prado E., Rühl E. H., Mestre P., Merdinoglu D. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of Rpv8, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew //Theoretical and Applied Genetics. – 2011. – T. 123. – №. 1. – C. 43-53. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1565-0>
85. Bocharova B. R., Kovaliova I. A., Mazurenko L. S. Identification of grapevine clone genotypes by use of microsatellite markers //Cytology and Genetics. – 2009. – T. 43. – №. 6. – C. 371-378. <https://doi.org/10.3103/S0095452709060024>
86. Boso Alonso S., Kassemeyer H. H. Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew. – 2008.
87. Boso S., Alonso-Villaverde V., Gago P., Santiago J.L., Martínez M.C. Susceptibility of 44 grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties to downy mildew in the field //Australian Journal of Grape and Wine Research. – 2011. – T. 17. – №. 3. – C. 394-400. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2011.00157.x>
88. Boso S., Martínez M.C., Unger S., Kassemeyer H.-H. Evaluation of foliar resistance to downy mildew in different cv. Albariño clones //Vitisgeil Weilerhof-. – 2006. – T. 45. – №. 1. – C. 23.
89. Bouamama-Gzara B., Selmi I., Chebil S., Melki I., Mliki A., Ghorbel A., Carra A., Carimi F., Mahfoudhi N. Elimination of Grapevine leafroll associated virus-3, Grapevine rupestris stem pitting associated virus and Grapevine virus A from a Tunisian Cultivar by Somatic Embryogenesis and

Characterization of the Somaclones Using Ampelographic Descriptors //The Plant Pathology Journal. – 2017. – T. 33. – №. 6. – C. 561. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.06.2017.0122>

90. Boubals D. Contribution à l'étude des causes de la résistance des Vitacées au mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola* (B. et C.) Berl. et de T.) et de leur mode de transmission héréditaire. – Institut National de la Recherche Agronomique, 1959. – №. 9.

91. Boubals D. Hérité de la résistance au phylloxéra radicole chez la vigne //Ann. Amélior. Plantes. – 1966. – T. 16. – C. 327-347.

92. Bouquet A. Etude de la résistance au phylloxera radicole des hybrides *Vitis vinifera* × *Muscadinia rotundifolia* //Vitis. – 1983. – T. 32. – №. 4. – C. 311-323.

93. Bourquin J. C., Sonko A., Otten L., Walter B. Restriction fragment length polymorphism and molecular taxonomy in *Vitis vinifera* L //Theoretical and Applied Genetics. – 1993. – T. 87. – №. 4. – C. 431-438. <https://doi.org/10.1007/BF00215088>

94. Bowers J. E., Bandman E. B., Meredith C. P. DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars //American Journal of Enology and Viticulture. – 1993. – T. 44. – №. 3. – C. 266-274.

95. 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. – T. 50. – №. 3. – C. 243-246

96. Bowers J. E., Meredith C. P. Genetic similarities among wine grape cultivars revealed by restriction fragment-length polymorphism (RFLP) analysis //Journal of the American Society for Horticultural Science. – 1996. – T. 121. – №. 4. – C. 620-624. <https://doi.org/10.21273/JASHS.121.4.620>

97. Bowers J., Boursiquot J. M., This P., Chu K., Johansson H., Meredith C. Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of northeastern France //Science. – 1999. – T. 285. – №. 5433. – C. 1562-1565. <https://doi.org/10.1126/science.285.5433.1562>

98. Brewer M. T., Milgroom M. G. Phylogeography and population structure of the grape powdery mildew fungus, *Erysiphe necator*, from diverse *Vitis* species //BMC Evolutionary Biology. – 2010. – T. 10. – №. 1. – C. 1-13. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-268>

99. Brum M.C.P., Araujo W.L., Maki C., Azevedo J.L. Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. ('Niagara Rosada') and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum* //Genet Mol Res. – 2012. – T. 11. – №. 4. – C. 4187-4197. <https://doi.org/10.4238/2012.December.6.2>

100. Cadle-Davidson L. Variation within and between *Vitis* spp. for foliar resistance to the downy mildew pathogen *Plasmopara viticola* //Plant Disease. – 2008. – T. 92. – №. 11. – C. 1577-1584. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-11-1577>

101. Canaguier C.A., Grimplet J., Di Gaspero G., Scalabrin S., Duchêne E., Choisine 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). *Genom. Data* 14: 56–62. – 2017. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2017.09.002>

102. Carisse O. Development of grape downy mildew (*Plasmopara viticola*) under northern viticulture conditions: influence of fall disease incidence // *European Journal of Plant Pathology*. – 2016. – T. 144. – №. 4. – C. 773-783. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0748-y>

103. Castro I., D’Onofrio C., Martín J. P., Ortiz J. M., De Lorenzis G., Ferreira V., Pinto-Carnide O. Effectiveness of AFLPs and retrotransposonbased markers for the identification of Portuguese grapevine cultivars and clones // *Molecular Biotechnology*. – 2012. – T. 52. – №. 1. – C. 26 - 39. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9470-y>

104. Cervera M. T., Cabezas J. A., Sancha J. C., Martinez de Toda F., Martínez-Zapater J. M. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain) // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1998. – T. 97. – №. 1. – C. 51-59. <https://doi.org/10.1007/s001220050866>

105. Cervera M.T., Cabezas, J.A., Sanchez-Escribano E., Cenis J.L., MartinezZapter J.M. Characterization of genetic variation within table grape varieties based on AFLP markers // *Vitis*. – 2000. – № 39. – C. 109–114

106. Chani E., Ashkenazi V., Hillel J., Veilleux R. E. Microsatellite marker analysis of an anther-derived potato family: skewed segregation and gene centromere mapping // *Genome*. – 2002. – T. 45. – №. 2. – C. 236-242. <https://doi.org/10.1139/g01-140>

107. Chen I., Manchester S. R. Seed morphology of Vitaceae // *International Journal of Plant Sciences*. – 2011. – T. 172. – №. 1. – C. 1-35.

108. Chen Z. D., Ren H., Wen J. Vitaceae // *Flora of China*. – 2007. – T. 12. – C. 173-222.

109. Cipriani G., Marrazzo M. T., Di Gaspero G., Pfeiffer A., Morgante M., Testolin R. A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping // *BMC Plant Biology*. – 2008. – T. 8. – №. 1. – C. 1-13. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-127>

110. Cipriani, G., Frazza, G., Peterlunger, E., Testolin, R., 1994. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats // *Vitis* 33, 211–215

111. Clark M.D., Teh S.L., Burkness E., Moreira L., Watson G., Yin L., Hutchison W.D., Luby J.J. Quantitative trait loci identified for foliar phylloxera resistance in a hybrid grape population // *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2018. Vol. 24. №. 3. P. 292-300. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12341>

112. Cochetel N., Minio A., Massonnet M., Vondras A. M., 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. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab033>

113. Conner P. J., MacLean D. Fruit anthocyanin profile and berry color of muscadine grape cultivars and *Muscadinia* germplasm //HortScience. – 2013. – T. 48. – №. 10. – C. 1235-1240. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.48.10.1235>

114. Costantini L., Grando M. S., Feingold S., Ulanovsky S., Mejía N., Hinrichsen P., Martínez-Zapater J. M. Generation of a common set of mapping markers to assist table grape breeding //American Journal of Enology and Viticulture. – 2007. – T. 58. – №. 1. – C. 102-111.

115. Cruz-Cruz C. A., González-Arno M. T., Engelmann F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity //Resources. – 2013. – T. 2. – №. 2. – C. 73-95. <https://doi.org/10.3390/resources2020073>

116. Dalbó M. A., Ye G. N., Weeden N. F., Steinkellner H., Sefc K. M., Reisch B. I. A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map //Genome. – 2000. – T. 43. – №. 2. – C. 333-340. <https://doi.org/10.1139/g99-136>

117. Dalla Costa L., Malnoy M., Lecourieux D., Deluc L., Ouaked-Lecourieux F., Thomas M., Torregrosa L. J. M. The state-of-the-art of grapevine biotechnology and new breeding technologies (NBTS) //Oeno One. – 2019. – T. 53. – №. 2. – C. 189-212.

118. Davidis UX, Olmo HP. The *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* hybrids as phylloxera resistant rootstocks //Vitis. – 1964. – T. 4. – C. 129-143.

119. 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. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty149>

120. De Mattia F., Imazio S., Grassi F., Lovicu G., Tardáguila J., Failla O., Maitt C., Scienza A., Labra M. Genetic characterization of Sardinia grapevine cultivars by SSR markers analysis //OENO One. – 2007. – T. 41. – №. 4. – C. 175-184. <https://doi.org/10.20870/oenone.2007.41.4.837>

121. de.NBI Nanopore Training Course. The Tutorial Data Set. Basecalling. – 2019. Available from: <https://denbi-nanopore-trainingcourse.readthedocs.io/en/latest/basecalling/index.html> [accessed Dec. 10, 2020]

122. Deamer D., Akeson M., Branton D. Three decades of nanopore sequencing //Nature Biotechnology. – 2016. – T. 34. – №. 5. – C. 518-524. <https://doi.org/10.1038/nbt.3423>

123. Delrot S., Grimplet J., Carbonell-Bejerano P., Schwandner A., Bert P.F, Bavaresco L., Dalla Costa L., Di Gaspero G., Duchêne E., Hausmann L., Malnoy M., Morgante M., Ollat N., Pecile M., Vezzulli S. Genetic and Genomic Approaches for Adaptation of Grapevine to Climate Change //In Genomic Designing of Climate-Smart Fruit Crops. Springer, Cham. – 2020. – C. 157-270. https://doi.org/10.1007/978-3-319-97946-5_7

124. Di Gaspero G., Cipriani G. Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis* spp.) //Theoretical and Applied Genetics. – 2002. – T. 106. – №. 1. – C. 163-172. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1062-6>
125. Di Gaspero G., Cipriani G., Adam-Blondon A. F., Testolin R. Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for R-gene candidates //Theoretical and Applied Genetics. – 2007. – T. 114. – №. 7. – C. 1249-1263. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0516-2>
126. Di Gaspero G., Cipriani G., Marrazzo M. T., Andretta D., Castro M. J. P., Peterlunger E., Testolin R. Isolation of (AC) n-microsatellites in *Vitis vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection //Molecular Breeding. – 2005. – T. 15. – №. 1. – C. 11-20. <https://doi.org/10.1007/s11032-004-1362-4>
127. Di Gaspero G., Peterlunger E., Testolin R., Edwards K. J., Cipriani G. Conservation of microsatellite loci within the genus *Vitis* //Theoretical and Applied Genetics. – 2000. – T. 101. – №. 1. – C. 301-308. <https://doi.org/10.1007/s001220051483>
128. Diez-Navajas A., Wiedemann-Merdinoglu S., Greif C., Merdinoglu D. Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level //Phytopathology. – 2008. – T. 98. – №. 7. – C. 776-780. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-7-0776>
129. Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, M., Poizat, C., Zanetto A., Arús P., Laigret F. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.) //Theoretical and Applied Genetics. – 2002. – T. 105. – №. 1. – C. 127-138. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0867-7>
130. Divilov K., Barba P., Cadle-Davidson L., Reisch B. I. Single and multiple phenotype QTL analyses of downy mildew resistance in interspecific grapevines //Theoretical and Applied Genetics. – 2018. – T. 131. – №. 5. – C. 1133-1143. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3065-y> 80.
131. Dokupilova I., Sturdik E., Mihalik D. Characterization of vine varieties by SSR markers //Acta Chimica Slovaca. – 2013. – T. 6. – №. 2. – C. 227-234.
132. Doligez A., Bouquet A., Danglot Y., Lahogue F., Riaz S., Meredith C., Edwards K., This P. Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight //Theoretical and Applied Genetics. – 2002. – T. 105. – №. 5. – C. 780- 795. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0951-z>
133. Doucleff M., Jin Y., Gao F., Riaz S., Krivanek A. F., Walker M. A. A genetic linkage map of grape, utilizing *Vitis rupestris* and *Vitis arizonica* //Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – T. 109. – №. 6. – C. 1178-1187. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1728-3>
134. Dunstan R. T. Some fertile hybrids of bunch and muscadine grapes //Journal of Heredity. – 1962. – T. 53. – №. 6. – C. 299-303. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a107200>

135. Edwards J., Norng S., Powell K.S., Granett J. Relationships between grape phylloxera abundance, fungal interactions and grapevine decline //Acta Horticulturae. – 2007. – T. 733. – C. 151-157.
136. Egorov E. A. Grape breeding is a key link in the development of the grapes and wine-making industry //Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2021. – T. 25. – №. 4. – C. 408. <https://doi.org/10.18699/VJ21.045>
137. Eibach R., Töpfer R. Traditional grapevine breeding techniques //Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry. – Woodhead Publishing, 2015. – C. 3-22. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-075-0.00001-6>Get
138. Elgelmann, F. *In vitro* conservation methods. In Biotechnology and Plant Genetic Resources; Callow, J.A., Ford-Lloye, B.V., Newbury, H.J., Eds.; CAB International: Wallingford, UK, 1997; pp. 119–161.
139. Emanuelli F., Lorenzi S., Grzeskowiak L., Catalano V., Stefanini M., Troglio M., Myles S., Martinez-Zapater J. M., Zyprian E., Moreira F.M., Grando M. S. Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape //BMC Plant Biology. – 2013. – T. 13. – №. 1. – C. 1-17. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-39>
140. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity //In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2011. – T. 47. – №. 1. – C. 5-16. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>
141. Ercisli S., Orhan E., Hizarci Y., Yildirim N., Agar G. Genetic diversity in grapevine germplasm resources in the Coruh valley revealed by RAPD markers //Biochemical Genetics. – 2008. – T. 46. – №. 9. – C. 590-597. <https://doi.org/10.1007/s10528-008-9173-7>
142. Eujayl I., Sorrells M. E., Baum M., Wolters P., Powell W. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat //Theoretical and Applied Genetics. – 2002. – T. 104. – №. 2. – C. 399-407. <https://doi.org/10.1007/s001220100738>
143. Ewing B., Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities //Genome Research. – 1998. – T. 8. – №. 3. – C. 186-194. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.186>
144. Faraj S., Cenis J. L., Sánchez-Escribano, E., Ortiz J. M. Evaluation of genetic diversity of grapevine cultivars grown in Morocco with RAPDPCR //VII International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding 528. – 1998. – C. 171-178. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2000.528.21>
145. Fawke S., Doumane M., Schornack S. Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles //Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2015. – T. 79. – №. 3. – C. 263-280. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00010-15>
146. Feechan A., Anderson C., Torregrosa L., Jermakow A., Mestre P., Wiedemann-Merdinoglu S., Merdinoglu D., Walker A.R., Cadle-Davidson L., Reisch B., Aubourg S., Bentahar N., Shrestha B.,

Bouquet A., Adam-Blondon A.F., Thomas M.R., Dry I.B. Genetic dissection of a TIR- NB-LRR locus from the wild North American grapevine species *Muscadinia rotundifolia* identifies paralogous genes conferring resistance to major fungal and oomycete pathogens in cultivated grapevine //The Plant Journal. – 2013. – T. 76. – №. 4. – C. 661-674. <https://doi.org/10.1111/tpj.12327>

147. Fennell J. L. Two new North American species of *Vitis* //Journal of the Washington Academy of Sciences. – 1940. – T. 30. – №. 1. – C. 15-19.

148. Fernandez M. P., Núñez Y., Ponz F., Hernáiz S., Gallego F. J., Ibanez J. Characterization of sequence polymorphisms from microsatellite flanking regions in *Vitis* spp //Molecular Breeding. – 2008. – T. 22. – №. 3. – C. 455-465. <https://doi.org/10.1007/s11032-008-9189-z>

149. Fischer B. M., Salakhutdinov I., Akkurt M., Eibach R., Edwards K. J., Toepfer R., Zyprian E. M. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine //Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – T. 108. – №. 3. – C. 501-515. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1445-3>

150. Foria S., Copetti D., Eisenmann B., Magris G., Vidotto M., Scalabrin S., Testolin R., Cipriani G., Wiedemann-Merdinoglu S., Bogs J., Di Gaspero G., Morgante M. Gene duplication and transposition of mobile elements drive evolution of the *Rpv3* resistance locus in grapevine //The Plant Journal. – 2020. – T. 101. – №. 3. – C. 529-542. <https://doi.org/10.1111/tpj.14551>

151. Forneck A., Huber L. (A) sexual reproduction—a review of life cycles of grape phylloxera, *Daktulosphaira vitifoliae* //Entomologia Experimentalis et Applicata. – 2009. – T. 131. – №. 1. – C. 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2008.00811.x>

152. Gale G. Saving the vine from phylloxera: a never ending battle //Wine: A Scientific Exploration. – 2002. – T. 70. – C. 91.

153. Gavrilenko T.A., Shvachko N.A., Volkova N.N., Ukhatova Yu.V. A modified droplet vitrification method for cryopreservation of shoot tips from in vitro potato plants //Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2019. – T. 23. – №. 4. – C. 422-429. <https://doi.org/10.18699/VJ19.505>

154. Gerrath J., Posluszny U., Ickert-Bond S.M., Wen J. Inflorescence morphology and development in the basal rosoid lineage Vitales //Journal of Systematics and Evolution. – 2017. – T. 55. – №. 6. – C. 542-558. <https://doi.org/10.1111/jse.12261>

155. Gerrath J., Posluszny U., Melville L. Taming the wild grape: Botany and horticulture in the Vitaceae. – Springer, 2015.

156. Gessler C., Pertot I., Perazzolli M. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management //Phytopathologia Mediterranea. – 2011. – T.50. – №.1. – C. 3-44. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-9360

157. Gisbert, C.; Peiró, R.; San Pedro, T.; Olmos, A.; Jiménez, C.; García, J. Recovering ancient grapevine varieties: from genetic variability to *in vitro* conservation, a case study //Grapes Wines

Advances in Production, Processing, Analysis and Valorization; InTech: Rijeka, Croatia. – 2018. – C.1.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.71133>

158. Grando M. S., Bellin D., Edwards K. J., Pozzi C., Stefanini M., Velasco R. Molecular linkage maps of *Vitis vinifera* L. and *Vitis riparia* Mchx //Theoretical and Applied Genetics. – 2003. – T. 106. – №. 7. – C. 1213-1224. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1170-3>

159. Grando M. S., De Micheli L., Biassetto L., Scienza A. RAPD markers in wild and cultivated *Vitis vinifera* //Vitis. – 1995. – T. 34. – №. 1. – C. 37-39.

160. Granett J., Walker M. A., Kocsis L., Omer A. D. Biology and management of grape phylloxera //Annual Review of Entomology. – 2001. – T. 46. – №. 1. – C. 387-412. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.387>

161. Gray D. J., Benton C. M. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*) //Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1991. – T. 27. – №. 1. – C. 7-14. <https://doi.org/10.1007/BF00048199>

162. Grigoreva E., Ulianich P., Ben C., Gentzittel 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. <https://doi.org/10.1134/S102279541911005X>

163. Guidelines for DNA-Profiling: Molecular Marker Selection and Database Construction ("BMT Guidelines") UPOV/INF/17/1. http://www.upov.int/en/publications/information_documents_index.htm

164. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies //Bioinformatics. – T. 29. – C. 1072- 1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>

165. Hasnaoui N., Buonamici A., Sebastiani F., Mars M., Zhang D., Vendramin G. G. Molecular genetic diversity of *Punica granatum* L. (pomegranate) as revealed by microsatellite DNA markers (SSR) //Gene. – 2012. – T. 493. – №. 1. – C. 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.11.012>

166. Hassan N. A., Gomaa A. H., Shahin M. A., El Homosany A. A. *In vitro* storage and cryopreservation of some grape varieties //Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants. – 2013. – T. 5. – №. 3. – C. 183-193. <https://doi.org/10.5829/idosi.jhsop.2013.5.3.1126>

167. Hassanen S. A., Abido A. I. A., Aly M. A. M., Rayan G. A. *In vitro* preservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) Muscat of Alexandria and Black Monukka cultivars as genetic resource //African Journal of Basic and Applied Sciences. – 2013. – T. 5. – №. 2. – C. 55-63. <https://doi.org/10.5829/idosi.ajbas.2013.5.2.23313>

168. Hausmann L., Eibach R., Zyprian E., Töpfer R. Genetic analysis of phylloxera root resistance in cultivar 'Börner' //Acta Horticulturae. – 2011. – №. 904. – C. 47-52

169. He F., Wang J., Duan C. Q. Parental selection on wine grapevine breeding for frost hardiness in China //Interactive Ampelography and Grapevine Breeding: Collected Papers of the Int. Symp. – 2011. – C. 20- 22.
170. Heather J. M., Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA //Genomics. – 2016. – T. 107. – №. 1. – C. 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
171. Hoey B. K., Crowe K. R., Jones V. M., Polans N. O. A phylogenetic analysis of *Pisum* based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers //Theoretical and Applied Genetics. – 1996. – T. 92. – №. 1. – C. 92-100. <https://doi.org/10.1007/BF00222957>
172. Hyman E. D. A new method of sequencing DNA //Analytical Biochemistry. – 1988. – T. 174. – №. 2. – C. 423-436. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90041-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90041-3)
173. Imazio S., Maghradze D., De Lorenzis G., Bacilieri R., Laucou V., This P., Scienza A., Failla O. From the cradle of grapevine domestication: molecular overview and description of Georgian grapevine (*Vitis vinifera* L.) germplasm //Tree Genetics & Genomes. – 2013. – T. 9. – №. 3. – C. 641-658. <https://doi.org/10.1007/s11295-013-0597-9>
174. Ingram DS: Physiology and Biochemistry of Host-Parasite Interaction //The Downy Mildews. –1981. – C. 143-161.
175. Jackson R.S. Wine Science, Principles and Applications //Vineyard Practice. – 2014. – C. 143–306
176. Jaros U., Fischer G.A., Pailler T., Comes H. P. Spatial patterns of AFLP diversity in *Bulbophyllum occultum* (Orchidaceae) indicate long-term refugial isolation in Madagascar and long-distance colonization effects in La Réunion //Heredity. – 2016. – V. 116. – №. 5. – P. 434-446. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.1>
177. Jean-Jaques I. Characterization of *Vitis vinifera* cultivars by random amplified polymorphic DNA markers //Vitis. – 1993. – T. 32. – C. 189- 190.
178. Jenderek M. M., Reed B. M. Cryopreserved storage of clonal germplasm in the USDA National Plant Germplasm System //In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2017. – T. 53. – №. 4. – C. 299-308. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9828-3>
179. Jian S., Zhong Y., Liu N., Gao Z., Wei Q., Xie Z., Ren H. Genetic variation in the endangered endemic species *Cycas fairylakea* (Cycadaceae) in China and implications for conservation //Biodiversity & Conservation. – 2006. – T. 15. – №. 5. – C. 1681-1694. <https://doi.org/10.1007/s10531-004-5017-x>
180. Jung A., Fischer C. National inventory of grape genetic resources in Germany //Interactive Ampelography and Grapevine Breeding: Collected Papers of the Int. Symp. – 2011. – C. 20-22.

181. Kaga A., Tomooka N., Egawa Y., Hosaka K., Kamijima. Species relationships in the subgenus *Ceratotropis* (genus *Vigna*) as revealed by RAPD analysis //Euphytica. – 1996. – T. 88. – №. 1. – C. 17-24. <https://doi.org/10.1007/BF00029261>
182. Kamoun S., Furzer O., Jones J. D., Judelson H. S., Ali G. S., Dalio R. J., Roy S. G., Schena L., Zambounis A., Panabières F., Cahill D., Ruocco M., Figueiredo A., Chen X. R., Hulvey J., Stam R., Lamour K., Gijzen M., Tyler B. M., Grünwald N. J., Mukhtar M. S., Tomé D. F. A., Tör M., Van Den Ackerveken G., McDowell J., Daayf F., Fry W. E., Lindqvist-Kreuzer H., Meijer H. J. G., Petre B., Ristaino J., Yoshida K., Birch P. R. J., Govers F. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology //Molecular Plant Pathology. – 2015. – T. 16. – №. 4. – C. 413-434. <https://doi.org/10.1111/mpp.12190>
183. Karkamkar S. P., Patil S. G., Misra S. C. Cyto-morphological studies and their significance in evolution of family Vitaceae //The Nucleus. – 2010. – T. 53. – №. 1. – C. 37-43. <https://doi.org/10.1007/s13237-010-0009-6>
184. Kassemeyer H. H., Gadourym D. M., Hill G. “Downy Mildew,” in compendium of grape diseases, disorders, and pests. 2nd Edn., eds W. Wilcox, W. D. Gubler, K. J. Uyemoto (St. Paul: APS Press). – 2015. C. 46–52.
185. Kast W. K., Stark-Urnau M., Seidel M., Gemmrich A. R. Inter-isolate variation of virulence of *Plasmopara viticola* on resistant vine varieties //Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Fruchteverwertung. – 2000. – T. 50. – №. 1. – C. 38-42.
186. Kazybayeva S., Kovalchuk I., Turdiyev T., Kulshanov S., Azhitayeva L. Micropropagation of some grape varieties in Kazakhstan //BIO Web of Conferences. – EDP Sciences. – 2020. – T. 25. – C. 05003. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202505003>
187. Keller E.R., Grube M., Hajirezaei M.R., Melzer M., Mock H.P., Rolletschek H., Senula A., Subbarayan K. Experience in large-scale cryopreservation and links to applied research for safe storage of plant germplasm //Acta Hort. – 2016. T. 1113. – C. 239-249. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1113.36>
188. Kennelly M.M., Gadoury D.M., Wilcox W.F., Magarey P.A., Seem R.C. Primary infection, lesion productivity, and survival of sporangia in the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola* //Phytopathology. – 2007. – T. 97. – №. 4. – C. 512-522. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-4-0512>
189. Kim H.H., Popova E., Shin D.J., Yi J.Y., Kim C.H., Lee J.S., Yoon M.K., Engelmann F. Cryobanking of Korean Allium germplasm collections: results from a 10 year experience //CryoLetters. – 2012. – T. 33. – №. 1. – C. 45-57.

190. Kinfe B., Feyssa T., Bedada G. *In vitro* micropropagation of grape vine (*Vitis vinifera* L.) from nodal culture //African Journal of Biotechnology. – 2017. – T. 16. – №. 43. – C. 2083-2091. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15803>
191. Křižan B., Ondrušiková E., Holleinova V., Moravcova K., Blahova L. Elimination of grapevine fanleaf virus in grapevine by *in vivo* and *in vitro* thermotherapy //Horticultural Science. – 2009. – T. 36. – №. 3. – C. 105-108.
192. Kulus D., Zalewska M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species—a review //Scientia Horticulturae. – 2014. – T. 168. – C. 88-107. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.01.014>
193. Kumar H., Priya P., Singh N., Kumar M., Kumar C. B., Kumar L., Singh I. S., Kumar N. RAPD and ISSR marker-based comparative evaluation of genetic diversity among Indian germplasms of *Euryale ferox*: an aquatic food plant //Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2016. – T. 180. – №. 7. – C. 1345-1360. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2171-z>
194. Kumsa F. Factors affecting *in vitro* cultivation of grape (*Vitis vinifera* L.): a review //International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology – 2020. – T. 10. – №. 1. – C. 1-5. <https://doi.org/10.3329/ijarit.v10i1.48087>
195. Labra M., Failla O., Fossati T., Castiglione S., Scienza A., Sala F. Phylogenetic analysis of grapevine cv. Ansonica growing on the island of Giglio, Italy by AFLP and SSR markers // Vitis – 1999. – T. 38. – №. 1. – C. 161-166
196. Lafon R, Bulit J: Downy Mildew of the Vine. //The Downy Mildews. Edited by: Spencer DM. London: Academic Press. –1981. – C. 601-614.
197. Lakhanpaul S., Chadha S., Bhat K. V. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis in Indian mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) cultivars //Genetica. – 2000. – T. 109. – №. 3. – C. 227-234. <https://doi.org/10.1023/A:1017511918528>
198. Lalancette N., Madden L. V., Ellis M. A. A model for predicting the sporulation of *Plasmopara viticola* based on temperature and duration of high relative-humidity //Phytopathology. – 1987. – T. 77. – №. 12. – C. 1699
199. Lamoureux D., Bernole A., Le Clainche I., Tual S., Thareau V., Sophie P., Legeai F., Dossat C., Wincker P., Oswald M., Merdinoglu D., Vignault C., Delrot S., Caboche M., Chalhoub B., Adam-Blondon A. F. Anchoring of a large set of markers onto a BAC library for the development of a draft physical map of the grapevine genome //Theoretical and Applied Genetics. – 2006. – T. 113. – №. 2. – C. 344-356. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0301-7>
200. Lamoureux D., Bernole A., Le Clainche I., Tual S., Thareau V., Sophie P., Legeai F., Dossat C., Wincker P., Oswald M., Merdinoglu D., Vignault C., Delrot S., Caboche M., Chalhoub B., Adam-Blondon A. F. Anchoring of a large set of markers onto a BAC library for the development of a draft

physical map of the grapevine genome //Theoretical and Applied Genetics. – 2006. – T. 113. – №. 2. – C. 344-356. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0301-7>

201. Langcake P., Lovell P. A. Light and electron microscopical studies of the infection of *Vitis* spp. by *Plasmopara viticola*, the downy mildew pathogen //Vitis. – 1980. – T. 19. – №. 4. – C. 321-337.

202. Large E. C. The advance of the fungi //The Advance of the Fungi. – 1940.

203. Leão P. C. S., Motoike S. Y. Genetic diversity in table grapes based on RAPD and microsatellite markers //Pesquisa Agropecuária Brasileira. – 2011. – T. 46. – №. 9. – C. 1035-1044.

204. Leger A., Leonardi T. pycoQC, interactive quality control for Oxford Nanopore Sequencing //Journal of Open Source Software. – 2019. – T. 4. – №. 34. – C. 1236. <https://doi.org/10.21105/joss.01236>

205. Lenne J. M., Wood D. Plant diseases and the use of wild germplasm //Annual Review of Phytopathology. – 1991. – T. 29. – №. 1. – C. 35- 63. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.000343>

206. Leppik E. E. Gene centers of plants as sources of disease resistance //Annual Review of Phytopathology. – 1970. – T. 8. – №. 1. – C. 323- 344. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.08.090170.001543>

207. Li H. Minimap and miniasm: fast mapping and de novo assembly for noisy long sequences //Bioinformatics. – 2016. – T. 32. – №. 14. – C. 2103-2110. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw152>

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

209. Lin H., Leng H., Guo Y., Kondo S., Zhao Y., Shi G., Guo X. QTLs and candidate genes for downy mildew resistance conferred by interspecific grape (*V. vinifera* L. × *V. amurensis* Rupr.) crossing //Scientia Horticulturae. – 2019. – T. 244. – C. 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.09.045>

210. Lin H., Walker M. A. Identifying grape rootstocks with simple sequence repeat (SSR) DNA markers //American Journal of Enology and Viticulture. – 1998. – T. 49. – №. 4. – C. 403-407.

211. Lisek A., Lisek J. Assessment of genetic diversity and relationships among grapevine cultivars originating in Central and Eastern Europe and North America using ISSR markers //Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus. – 2019. – T. 18. – №. 5. <https://doi.org/10.24326/asphc.2019.5.14>

212. Litt M., Luty J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene //American Journal of Human Genetics. – 1989. – T. 44. – №. 3. – C. 397-401

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

214. Lowe K. M., Walker M. A. Genetic linkage map of the interspecific grape rootstock cross Ramsey (*Vitis champinii*) × Riparia Gloire (*Vitis riparia*) //Theoretical and Applied Genetics. – 2006. – T. 112. – №. 8. – C. 1582-1592. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0264-8>
215. Lu J. J., Kang J. Y., Feng S. G., Zhao H. Y., Liu J. J., Wang H. Z. Transferability of SSR markers derived from *Dendrobium nobile* expressed sequence tags (ESTs) and their utilization in *Dendrobium* phylogeny analysis //Scientia Horticulturae. – 2013. – T. 158. – C. 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.04.011>
216. Lu J. J., Wang S., Zhao H. Y., Liu J. J., Wang H. Z. Genetic linkage map of EST-SSR and SRAP markers in the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium* (Orchidaceae) //Genet Mol Res. – 2012. – T. 11. – C. 4654–4667. <https://doi.org/10.4238/2012.December.21.1>
217. Luo S., He P. Discrimination of wild grapes native to China by RAPD markers //Vitis: Journal of Grapevine Research. – 2001. – T. 40. – №. 3. – C. 163-168.
218. Madden L. V., Ellis M. A., Lalancette N., Hughes G., Wilson L. L. Evaluation of a disease warning system for downy mildew of grapes //Plant Disease. – 2000. – T. 84. – №. 5. – C. 549-554. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.5.549>
219. Madden L. V., Hughes G., Ellis M. A. Spatial heterogeneity of the incidence of grape downy mildew //Phytopathology. – 1995. – T. 85. – №. 3. – C. 269-275.
220. Maia J. D. G., Camargo U. A., Tonietto J., Zanús M. C., Quecini V., Ferreira M. E., Ritschel P. Grapevine breeding programs in Brazil //Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry. Woodhead Publishing. – 2015. – C. 247-271. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-075-0.00011-9>
221. Malik S. K., Chaudhury R. Cryopreservation techniques for conservation of tropical horticultural species using various explants //Conservation and Utilization of Horticultural Genetic Resources. – 2019. – C. 579-594. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3669-0_19
222. Maliogka V. I., Skiada F. G., Eleftheriou E. P., Katis, N. I. Elimination of a new ampelovirus (GLRaV-Pr) and Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV) from two *Vitis vinifera* cultivars combining *in vitro* thermotherapy with shoot tip culture //Scientia Horticulturae. – 2009. – T. 123. – №. 2. – C. 280-282. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.08.016>
223. Malysheva L., Sjakste T., Matzk F., Röder M., Ganal M. Molecular cytogenetic analysis of wheat barley hybrids using genomic *in situ* hybridization and barley microsatellite markers //Genome. – 2003. – T. 46. – №. 2. – C. 314-322. <https://doi.org/10.1139/g02-117>
224. Marguerit E., Boury C., Manicki A., Donnart M., Butterlin G., Némorin A., Wiedemann-Merdinoglu S., Merdinoglu D., Ollat N., Decroocq S. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine //Theoretical and Applied Genetics. – 2009. – T. 118. – №. 7. – C. 1261-1278. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-0979-4>

225. Martínez L., Cavagnaro P., Masuelli R., Rodríguez J. Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers //Electronic Journal of Biotechnology. – 2003. – T. 6. – №. 3. – C. 244-253
226. Mason A. S. SSR genotyping //Plant Genotyping. – Humana Press, New York, NY, 2015. – C. 77-89. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6_6
227. Meneghetti S., Costacurta A., Morreale G., Calò A. Study of intra-varietal genetic variability in grapevine cultivars by PCR-derived molecular markers and correlations with the geographic origins //Molecular Biotechnology. – 2012. – T. 50. – №. 1. – C. 72-85. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9403-9>
228. Merdinoglu D., Butterlin G., Bevilacqua L., Chiquet V., Adam-Blondon A. F., Decroocq S. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR //Molecular Breeding. – 2005. – T. 15. – №. 4. – C. 349-366. <https://doi.org/10.1007/s11032-004-7651-0>
229. Merdinoglu D., Schneider C., Prado E., Wiedemann-Merdinoglu S., Mestre P. Breeding for durable resistance to downy and powdery mildew in grapevine //OENO One. – 2018. – T. 52. – №. 3. – C. 203-209. <https://doi.org/10.20870/oenone.2018.52.3.2116>
230. Merdinoglu D., Wiedeman-Merdinoglu S., Coste P., Dumas V., Haetty S., Butterlin G., Greif C. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia* //VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding 603. – 2002. – C. 451-456. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.603.57>
231. Migicovsky Z., Sawler J., Money D., Eibach R., Miller A. J., Luby J. J., Jamieson A. R., Velasco D., von Kintzel S., Warner J., Wührer W., Brown P. J., Myles S. Genomic ancestry estimation quantifies use of wild species in grape breeding //BMC Genomics. – 2016. – T. 17. – №. 1. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2834-8>
232. Mignouna H. D., Ikea J., Thottapilly G., Ng N. Q. Genetic diversity in cowpea as revealed by random amplified polymorphic DNA [RAPD *Vigna unguiculata* L. Walp] //Journal of Genetics & Breeding (Italy). – 1998.
233. Mondello V., Songy A., Battiston E., Pinto C., Coppin C., Trotel-Aziz P., Clément C., Mugnai L., Fontaine F. Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents //Plant Disease. – 2018. – T. 102. – №. 7. – C. 1189- 1217. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1181-FE>
234. Montero C.I., Shea Y.R., Jones P.A., Harrington S.M., Tooke N.E, Witebsky F.G., Murray P.R. Evaluation of Pyrosequencing® technology for the identification of clinically relevant non-dematiaceous yeasts and related species //European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. – 2008. – T. 27. – №. 9. – C. 821-830. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0510-x>

235. Moore M.O., Wen J. Vitaceae. In: Flora of North America Editorial Committee ed Flora of North America, North of Mexico //New York: Oxford University Press. – 2016. – T. 12. – №. 1. – C. 3–23.
236. Moreira F. M., Madini A., Marino R., Zulini L., Stefanini M., Velasco R., Kozma P., Grando M. S. Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis* spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance //Tree Genetics & Genomes. – 2011. – T. 7. – №. 1. – C. 153-167. <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0322-x>
237. Moreno S., Gogorcena Y., Ortiz J. M. The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.) //Scientia Horticulturae. – 1995. – T. 62. – №. 4. – C. 237-243. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(95\)00784-Q](https://doi.org/10.1016/0304-4238(95)00784-Q)
238. Moroldo M., Paillard S., Marconi R., Fabrice L., Canaguier A., Cruaud C., De Berardinis V., Guichard C., Brunaud V., Le Clainche I., Scalabrin S., Testolin R., Di Gaspero G., Morgante M., Adam-Blondon, A. F. A physical map of the heterozygous grapevine 'Cabernet Sauvignon' allows mapping candidate genes for disease resistance //BMC Plant Biology. – 2008. – T. 8. – №. 1. – C. 1-14. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-66>
239. Mostafa F. M. A., Shaaban M. M., Elazab D. S., Kamel M. T. *In vitro* propagation of four grape cultivars //Assiut Journal of Agricultural Sciences. – 2015. – T.46. – №. 4. – C. 65-76. <https://doi.org/10.21608/ajas.2015.542>
240. Mueller U. G., Wolfenbarger L. L. R. AFLP genotyping and fingerprinting //Trends in Ecology & Evolution. – 1999. – T. 14. – №. 10. – C. 389-394. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01659-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01659-6)
241. Nair V. D., Raj R. P. D., Panneerselvam R., Gopi R. Assessment of diversity among populations of *Rauvolfia serpentina* Benth. Ex. Kurtz. from Southern Western Ghats of India, based on chemical profiling, horticultural traits and RAPD analysis //Fitoterapia. – 2014. – T. 92. – C. 46-60. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.09.017>
242. Nookaraju A., Agrawal D. C. Genetic homogeneity of *in vitro* raised plants of grapevine cv. Crimson Seedless revealed by ISSR and microsatellite markers //South African Journal of Botany. – 2012. – T. 78. – C. 302-306. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.08.009>
243. Ochssner I., Hausmann L., Töpfer R. Rpv14, a new genetic source for *Plasmopara viticola* resistance conferred by *Vitis cinerea* //Vitis. – 2016. – T. 55. – №. 2. – C. 79-81. <https://doi.org/10.5073/vitis.2016.55.79-81>
244. OIV – Organization Internationale de la Vigne et du Vin. Descriptor list for grapevine varieties and *Vitis* species (OIV Paris, 135, 2009)
245. Ollat N., Peccoux A., Papura D., Esmenjaud D., Marguerit E., Tandonnet J.P., Bordenave L., Cookson S.J., Barrieu F., Rossdeutsch L., Lecourt J., Lauvergeat V., Vivin P., Bert P.F., Delrot S.

Rootstocks as a component of adaptation to environment //Grapevine in a Changing Environment: a Molecular and Ecophysiological Perspective, 1st edn. Wiley, Chichester. – 2016. – C. 68–108

246. Olmo H. P. The potential role of (*vinifera* x *rotundifolia*) hybrids in grape variety improvement //Experientia. – 1986. – T. 42. – №. 8. – C. 921-926. <https://doi.org/10.1007/BF01941769>

247. Olmstead J. W., Sebolt A. M., Cabrera A., Sooriyapathirana S. S., Hammar S., Iriarte G., Wang D., Chen Y. C., van der Knaap E., Iezzoni A. F. Construction of an intra-specific sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic linkage map and synteny analysis with the *Prunus* reference map //Tree Genetics & Genomes. – 2008. – T. 4. – №. 4. – C. 897-910. <https://doi.org/10.1007/s11295-008-0161-1>

248. Olmstead J. W., Sebolt A. M., Cabrera A., Sooriyapathirana S. S., Hammar S., Iriarte G., Wang D., Chen Y. C., van der Knaap E., Iezzoni A. F. Construction of an intra-specific sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic linkage map and synteny analysis with the *Prunus* reference map //Tree Genetics & Genomes. – 2008. – T. 4. – №. 4. – C. 897-910. <https://doi.org/10.1007/s11295-008-0161-1>

249. Omer A.D., Granett J., De Benedictis J., Walker M.A. Effects of fungal root infections on the vigor of grapevines infested by root-feeding grape phylloxera //Vitis. – 1995. – T. 34. – №. 3. – C. 165-170.

250. Panattoni A., D'Anna F., Cristani C., Triolo E. Grapevine vitivirus A eradication in *Vitis vinifera* explants by antiviral drugs and thermotherapy //Journal of Virological Methods. – 2007. – T. 146. – №. 1-2. – C. 129-135. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.06.008>

251. Panattoni A., Triolo E. New advances on *in vitro* antiviral chemotherapy. – 2007. – C. 51-51

252. Panis B. Sixty years of plant cryopreservation: From freezing hardy mulberry twigs to establishing reference crop collections for future generations //III International Symposium on Plant Cryopreservation 1234. – 2019. – C. 1-8. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1234.1>

253. Panis B., Nagel M., Van den Houwe I. Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in *in vitro* collections and/or in liquid nitrogen //Plants. – 2020. – T. 9. – №. 12. – C. 1634. <https://doi.org/10.3390/plants9121634>

254. Parliament E. Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides //Official Journal of the European Union. – 2009. – T. 309. – C. 71-86.

255. Patel G. I., Olmo H. P. Cytogenetics of Vitis: I. The hybrid *V. vinifera* × *V. rotundifolia* //American Journal of Botany. – 1955. – C. 141-159. <https://doi.org/10.2307/2438464>

256. Pathirana R., McLachlan A., Hedderley D., Panis B., Carimi F. Pre-treatment with salicylic acid improves plant regeneration after cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) by droplet vitrification //Acta Physiologiae Plantarum. – 2016. – T. 38. – №. 1. – C. 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2026-1>

257. Pavlov A. V., Verzhuk V. G., Orlova S. Y., Radchenko O. Y., Yerastenkova M. V., Dodonova A. S., Gavrilkova Y. A., Sitnikov M. N., Filipenko G. I., & Murashev S. V. Cryopreservation as a method to preserve some fruit and berry crops and wild medicinal plants //Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2019. – T. 29. – №. 1. – C. 44-57 <https://doi.org/10.15407/cryo29.01.044>
258. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
259. Pearson R. C., Goheen A. C. Compendium of grape diseases //APS Press. – 1988.
260. Pearson R. C., Pool R. M., Gonsalves D., Goffinet M. C. Occurrence of flavesence dorée-like symptoms on 'White Riesling' grapevines in New York, USA //Phytopathologia Mediterranea. – 1985. – C. 82-87.
261. Peressotti E., Wiedemann-Merdinoglu S., Delmotte F., Bellin D., Di Gaspero G., Testolin R., Merdinoglu D., Mestre P. Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety //BMC Plant Biology. – 2010. – T. 10. – №. 1. – C. 1- 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-147>
262. Pilatti F.K., Aguiar T., Simões T., Benson E.E., Viana A.M. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil //In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2011. – T. 47. – №. 1. – C. 82-98. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9302-y>
263. Porotikova E., Terehova U., Volodin V., Yurchenko E., Vinogradova S. Distribution and Genetic Diversity of Grapevine Viruses in Russia //Plants. – 2021. – T. 10. – №. 6. – C. 1080. <https://doi.org/10.3390/plants10061080>
264. Pospisilova D. Variety—the building stone of the vinegrowing //Interactive Ampelography and Grapevine Breeding: Collected Papers of the Int. Symp. – 2011. – C. 20-22.
265. Pouget R. Histoire de la lutte contre le phylloxéra de la vigne en France //Histoire de la Lutte Contre le Phylloxera de la Vigne en France. – 1990. – C. 1-168.
266. Powell K. S. A holistic approach to future management of grapevine phylloxera //Arthropod Management in Vineyards:. – Springer, Dordrecht, 2012. – C. 219-251. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4032-7_10
267. Powell K. S. Grape phylloxera: an overview //Root Feeders: an Ecosystem Perspective. CAB International, Wallingford. – 2008. – C. 96-114.
268. Powell K. S., Cooper P. D., Forneck A. The biology, physiology and host–plant interactions of grape phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae* //Advances in Insect Physiology. – Academic Press, 2013. – T. 45. – C. 159-218. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417165-7.00004-0>
269. Prins B., Volk G.M., Preece J.E. Grape collection. In Field Tour of the USDA National Clonal Germplasm Repository for Tree Fruit, Nut Crops, and Grapes in Davis, California; Volk G.M., Preece

J.E., Eds.; Colorado State University: Fort Collins, CO, USA, 2021; Available Online: <https://colostate.pressbooks.pub/davisrepositoryfieldtour/chapter/grapes/> (accessed on 7 August 2021)

270. Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data //Genetics. – 2000. – T. 155. – №. 2. – C. 945-959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>

271. Qiu W., Feechan A., Dry I. Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (*Erysiphe necator*), the causal agent of powdery mildew disease //Horticulture Research. – 2015. – T. 2. <https://doi.org/10.1038/hortres.2015.20>

272. Rahimah A. R., Cheah S. C., Rajinder S. Freeze-drying of oil palm (*Elaeis guineensis*) leaf and its effect on the quality of extractable DNA //J. Oil Palm Res. – 2006. – T. 18. – C. 296-304.

273. Raji J., Atkinson C. T. Population genetic structure of rare and endangered plants using molecular markers. – 2013. – C. 42.

274. Ramming D. W., Gabler F., Smilanick J., Cadle-Davidson M., Barba P., Mahanil S., Cadle-Davidson L. A single dominant locus, Ren4, confers rapid non-race-specific resistance to grapevine powdery mildew //Phytopathology. – 2011. – T. 101. – №. 4. – C. 502-508. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-10-0237>

275. Ren X., Jiang H., Yan Z., Chen Y., Zhou X., Huang L., Lei Y., Huang J, Yan L., Qi Y., Wei W., Liao B. Genetic diversity and population structure of the major peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars grown in China by SSR markers //PLoS One. – 2014. – T. 9. – №. 2. – C. e88091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088091>

276. Riaz S., Boursiquot J.M., Dangl G.S., Lacombe T., Laucou V., Tenscher A.C., Walker M.A. Identification of mildew resistance in wild and cultivated Central Asian grape germplasm //BMC Plant Biology. – 2013. – T. 13. – №. 1. – C. 1-21. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-149>

277. Riaz S., Dangl G. S., Edwards K. J., Meredith C. P. A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. //Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – T. 108. – №. 5. – C. 864-872. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1488-5>

278. Riaz S., Tenscher A. C., Graziani R., Krivanek A. F., Ramming D. W., Walker M. A. Using marker-assisted selection to breed Pierce's disease resistant grapes //American Journal of Enology and Viticulture. – 2009. – T. 60. – №. 2. – C. 199-207

279. Riaz S., Tenscher A. C., Ramming D. W., Walker M. A. Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding //Theoretical and Applied Genetics. – 2011. – T. 122. – №. 6. – C. 1059-1073. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1511-6>

280. Rossi V., Caffi T., Gobbin D. Contribution of molecular studies to botanical epidemiology and disease modelling: grapevine downy mildew as a case-study //European Journal of Plant Pathology. – 2013. – T. 135. – №. 4. – C. 641-654. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0114-2>
281. Rossi V., Giosuè S., Caffi T. Modelling the dynamics of infections caused by sexual and asexual spores during *Plasmopara viticola* epidemics //Journal of Plant Pathology. – 2009. – C. 615-627.
282. Rossi V., Tito C. The role of rain in dispersal of the primary inoculum of *Plasmopara viticola* //Phytopathology. – 2012. – T. 102. – №. 2. – C. 158-165. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-11-0223>
283. Rubio B., Lalanne-Tisné G., Voisin R., Tandonnet J. P., Portier U., Van Ghelder C., Lafargue M., Petit J.P., Donnart M., Joubard B., Bert P.F., Papura D., Le Cunff L., Ollat N., Esmenjaud D. Characterization of genetic determinants of the resistance to phylloxera, *Daktulosphaira vitifoliae*, and the dagger nematode *Xiphinema* index from muscadine background //BMC Plant Biology. – 2020. – T. 20. – №. 1. – C. 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2310-0>
284. Said Ahmad A. H., Sathyanarayana B. N., Zarir Sh. *In Vitro* Propagation of Grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Thompson Seedless // Indian Journal of Pure & Applied Biosciences. – 2020. – T. 8. – №. 5. – C. 421-428. <https://doi.org/10.18782/2582-2845.8347>
285. San Pedro T., Peiró R., Villanova J., Olmos A., Gisbert C. *In vitro* propagation of *Vitis vinifera* L. cv. ‘Monastrell’ //Electronic Journal of Biotechnology. – 2017. – T. 27. – C. 80-83. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.006>
286. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1977. – T. 74. – №. 12. – C. 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
287. Santalla M., Power J. B., Davey M. R. Genetic diversity in mung bean germplasm revealed by RAPD markers //Plant Breeding. – 1998. – T. 117. – №. 5. – C. 473-478. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1998.tb01976.x>
288. Sapkota S., Chen L.L., Schreiner K., Ge H., Hwang C.F. A phenotypic study of *Botrytis bunch* rot resistance in *Vitis aestivalis*-derived ‘Norton’ grape //Tropical Plant Pathology. – 2015. – T. 40. – №. 4. – C. 279-282. <https://doi.org/10.1007/s40858-015-0028-6>
289. Sapkota S., Chen L.L., Yang S., Hyma K. E., Cadle-Davidson L., Hwang C.F. Construction of a high-density linkage map and QTL detection of downy mildew resistance in *Vitis aestivalis*-derived ‘Norton’ //Theoretical and Applied Genetics. – 2019. – T. 132. – №. 1. – C. 137-147. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3203-6>
290. Sargolzaei M., Rustioni L., Cola G., Ricciardi V., Bianco P. A., Maghradze D. Failla O., Quaglino F., Toffolatti S.L., De Lorenzis, G. Georgian grapevine cultivars: ancient biodiversity for future viticulture //Frontiers in Plant Science. – 2021. – T. 12. – C. 94. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.630122>

291. Schwander F., Eibach R., Fechter I., Hausmann L., Zyprian E., Töpfer R. Rpv10: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine //Theoretical and Applied Genetics. – 2012. – T. 124. – №. 1. – C. 163-176. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1695-4>
292. Scott K.D., Eggler P., Seaton G., Rossetto M., Ablett E.M., Lee L.S., Henry R.J. Analysis of SSRs derived from grape ESTs //Theoretical and Applied genetics. – 2000. – T. 100. – №. 5. – C. 723-726. <https://doi.org/10.1007/s001220051344>
293. Sefc K. M., Steinkellner H., Glössl J., Kampf S., Regner F. Reconstruction of a grapevine pedigree by microsatellite analysis //Theoretical and Applied Genetics. – 1998. – T. 97. – №. 1. – C. 227-231. <https://doi.org/10.1007/s001220050889>
294. Segerman B. The most frequently used sequencing technologies and assembly methods in different time segments of the bacterial surveillance and RefSeq genome databases //Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2020. – C. 571. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.527102>
295. Seppey M., Manni M., Zdobnov E. M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness //Gene prediction. – Humana, New York, NY, 2019. – C. 227-245. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_14
296. Seyedimoradi H., Talebi R., Hassani D., Karami F. Comparative genetic diversity analysis in Iranian local grapevine cultivars using ISSR and DAMD molecular markers //Environ Exp Biol. – 2012. – T. 10. – C. 125-132.
297. Shiferaw E., Pe M. E., Porceddu E., Ponnaiah M. Exploring the genetic diversity of Ethiopian grass pea (*Lathyrus sativus* L.) using EST-SSR markers //Molecular Breeding. – 2012. – T. 30. – №. 2. – C. 789-797. <https://doi.org/10.1007/s11032-011-9662-y>
298. Shirasawa K., Ishii K., Kim C., Ban T., Suzuki M., Ito T., Muranaka T., Kobayashi M., Nagata N., Isobe S., Tabata S. Development of Capsicum EST-SSR markers for species identification and in silico mapping onto the tomato genome sequence //Molecular Breeding. – 2013. – T. 31. – №. 1. – C. 101-110. <https://doi.org/10.1007/s11032-012-9774-z>
299. Simão 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. – T. 31. – №. 19. – C. 3210-3212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>
300. Singh Z., BRAR S. J. S. *In vitro* plant regeneration in seedless grapes (*Vitis vinifera* L.) //Vitis. – 1993. – T. 32. – №. 4. – C. 229-232.
301. Siqueira J. F., Fouad A. F., Rocas I. N. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes //Journal of Oral Microbiology. – 2012. – T. 4. – №. 1. – C. 10743. <https://doi.org/10.3402/jom.v4i0.10743>

302. Skiada F. G., Grigoriadou K., Maliogka V. I., Katis N. I., Eleftheriou E. P. Elimination of *Grapevine leafroll-associated virus 1* and *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* from grapevine cv. Agiorgitiko, and a micropropagation protocol for mass production of virus-free plantlets //Journal of Plant Pathology. – 2009. – C. 177-184.
303. Skroch P. W., Dos Santos J. B., Nienhuis J. Genetic relationships among *Phaseolus vulgaris* genotypes based on RAPD marker data //Annual Report of the Bean Improvement Cooperative (USA). – 1992.
304. Smith H.M., Clarke C.W., Smith B.P., Carmody B.M., Thomas M.R., Clingeleffer P.R., Powell K.S. Genetic identification of SNP markers linked to a new grape phylloxera resistant locus in *Vitis cinerea* for marker-assisted selection //BMC Plant Biology. – 2018. – T. 18. – №. 1. – C. 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1590-0>
305. Smith L.M., Sanders J.Z., Kaiser R.J., Hughes P., Dodd C., Connell C.R., Heiner C., Kent S.B., Hood L.E. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis //Nature. – 1986. – T. 321. – №. 6071. – C. 674-679. <https://doi.org/10.1038/321674a0>
306. Soller M., Beckmann J. S. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement //Theoretical and Applied Genetics. – 1983. – T. 67. – №. 1. – C. 25-33. <https://doi.org/10.1007/BF00303917>
307. Song S., Fu P., Lu J. Downy mildew resistant QTLs in *Vitis amurensis* “Shuang Hong” grapevine //Abstract Book GBG. – 2018. – C. 131.
308. Stanford A. M., Ray G. J., Forbes V., Mustafa Y. Population genetics and reintroduction performance of *Solanum conocarpum*, an Endemic Shrub of St. John, US Virgin Islands //Caribbean Journal of Science. – 2013. – T. 47. – №. 2–3. – C. 173-180. <https://doi.org/10.18475/cjos.v47i3.a6>
309. Stanke M., Keller O., Gunduz I., Hayes A., Waack S., Morgenstern B. AUGUSTUS: ab initio prediction of alternative transcripts //Nucleic Acids Research. – 2006. – T. 34. – №. 2. – C. 435-439. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl200>
310. Staudt G., Kassemeyer H. Evaluation of downy mildew resistance in various accessions of wild *Vitis* species //Vitis. – 1995. – T. 34. – №. 4. – C. 225-228.
311. Süßenguth K. Vitaceae //In Engler A, Prantl K eds. Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Berlin: Dunker & Humblot. –1953. – 20d. – C.174–333.
312. Tamhankar S. A., Patil S. G., Rao V. S. Assessment of the genetic diversity of some important grape genotypes in India using RAPD markers //Vitis-Geilweilerhof. – 2001. – T. 40. – №. 3. – C. 157-162.
313. Tarailo-Graovac M., Chen N. Using Repeat Masker to identify repetitive elements in genomic sequences //Current Protocols in Bioinformatics. – 2009. – T. 25. – №. 1. – C. 4.10.1-4.10.14. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0410s25>

314. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers //Nucleic Acids Research. – 1989. – T. 17. – №. 16. – C. 6463-6471. <https://doi.org/10.1093/nar/17.16.6463>
315. Tello J., Forneck A. Use of DNA markers for grape phylloxera population and evolutionary genetics: From RAPDs to SSRs and beyond //Insects. – 2019. – T. 10. – №. 10. – C. 317. <https://doi.org/10.3390/insects10100317>
316. Temnykh S., Park W. D., Ayres N., Cartinhour S., Hauck N., Lipovich L., Cho Y.G., Ishii T., McCouch S.R. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.) //Theoretical and Applied Genetics. – 2000. – T. 100. – №. 5. – C. 697-712. <https://doi.org/10.1007/s001220051342>
317. Tessier C., David J., This P., Boursiquot J. M., Charrier A. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. //Theoretical and Applied Genetics. – 1999. – T. 98. – №. 1. – C. 171-177. <https://doi.org/10.1007/s001220051054>
318. Theocharis A., Hand P., Pole J., Cevik V., Fisarakis I., Henderson, J. Study of genetic diversity among inter-intraspecific hybrids and original grapevine varieties using AFLP molecular markers //Australian Journal of Crop Science. – 2010. – T. 4. – №. 1. – C. 1-8.
319. Thiel T., Michalek W., Varshney R., Graner A. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) //Theoretical and Applied Genetics. – 2003. – T. 106. – №. 3. – C. 411-422. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1031-0>
320. Thind T. S. Fungicides in Plant Disease Management //Approaches and Trends in Plant Disease Management. – 2014. – C. 243.
321. 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. – 1993. – T. 86. – №. 2. – C. 173-180. <https://doi.org/10.1007/BF00222076>
322. Thomas M. R., Scott N. S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs) //Theoretical and Applied Genetics. – 1993. – T. 86. – №. 8. – C. 985-990. <https://doi.org/10.1007/BF00211051>
323. Toffolatti S. L., Maddalena G., Salomoni D., Maghradze D., Bianco P. A., Failla O. Evidence of resistance to the downy mildew agent *Plasmopara viticola* in the Georgian *Vitis vinifera* germplasm //Vitis. – 2016. – T. 55. – C. 121-128. <https://doi.org/10.5073/vitis.2016.55.121-128>
324. Toffolatti S.L., De Lorenzis G., Brilli M., Moser M., Shariati V., Tavakol E., Maddalena G., Passera A., Casati P., Pindo M., Cestaro A., Maghradze D., Failla O., Bianco P.A., Quaglino F. Novel aspects on the interaction between grapevine and *Plasmopara viticola*: dual-RNA-Seq analysis highlights gene expression dynamics in the pathogen and the plant during the battle for infection //Genes. – 2020. – T. 11. – №. 3. – C. 261. <https://doi.org/10.3390/genes11030261>

325. Toffolatti S. L., De Lorenzis G., Costa A., Maddalena G., Passera A., Bonza M. C., Pindo M., Stefani E., Cestaro A., Casati P., Failla O., Bianco P.A., Maghradze D., Quaglino F. Unique resistance traits against downy mildew from the center of origin of grapevine (*Vitis vinifera*) //Scientific Reports. – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30413-w>
326. Töpfer R., Hausmann L., Harst M., Maul E., Zyprian E., Eibach R. New horizons for grapevine breeding //Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology. – 2011. – T. 5. – №. 1. – C. 79-100.
327. Troggio M., Malacarne G., Coppola G., Segala C., Cartwright D. A., Pindo M., Stefanini M., Mank R., Moroldo M., Morgante M., Grando M S., Velasco R. A dense single-nucleotide polymorphism-based genetic linkage map of grapevine (*Vitis vinifera* L.) anchoring Pinot Noir bacterial artificial chromosome contigs //Genetics. – 2007. – T. 176. – №. 4. – C. 2637-2650. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.067462>
328. Ukhatova Y. V., Dunaeva S. E., Antonova O. Y., Apalikova O. V., Pozdniakova K. S., Novikova L. Y., Shuvalova L. E., Gavrilenko T. A. Cryopreservation of red raspberry cultivars from the VIR in vitro collection using a modified droplet vitrification method //In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2017. – T. 53. – №. 4. – C. 394-401. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9860-3>
329. Úrbez-Torres J. R., Peduto F., Smith R. J., Gubler W. D. Phomopsis dieback: a grapevine trunk disease caused by *Phomopsis viticola* in California //Plant Disease. – 2013. – T. 97. – №. 12. – C. 1571-1579. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1072-RE>
330. Vaser R., Sović I., Nagarajan N., Šikić M. Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads //Genome Research. – 2017. – T. 27. – №. 5. – C. 737-746. <https://doi/10.1101/gr.214270.116>.
331. Velasco R., Zharkikh A., Troggio M., Cartwright D., Cestaro A., Pruss D., Pindo M., FitzGerald L. M., Vezzulli S., Reid J., Malacarne G., Iliev D., Coppola G., Wardell B., Micheletti D., Macalma T., Facci M., Mitchell J. T., Perazzolli M., Eldredge G., Gatto P., Oyzerski R., Moretto M., Gutin N., Stefanini M., Chen Y., Segala C., Davenport C., Demattè L., Mraz A., Battilana J., Stormo K., Costa F., Tao Q., Si-Ammour A., Harkins T., Lackey A., Perbost C., Taillon B., Stella A., Solovyev V., Fawcett J. A., Sterck L., Vandepoele K., Grando S. M., Toppo S., Moser C., Lanchbury J., Bogden R., Skolnick M., Sgaramella V., Bhatnagar S. K., Fontana P., Gutin A., de Peer Y. V., Salamini F., Viola R. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety //PloS One. – 2007. – T. 2. – №. 12. – C. e1326. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001326>
332. Venuti S., Copetti D., Foria S., Falginella L., Hoffmann S., Bellin D., Cindrić P., Kozma P., Scalabrin S., Morgante M., Testolin R., Di Gaspero G. Historical introgression of the downy mildew resistance gene *Rpv12* from the Asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties //Plos One. – 2013. – T. 8. – №. 4. – C. e61228. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061228>

333. Vercesi A., Toffolatti S. L., Zocchi G., Guglielmann R., Ironi, L. A new approach to modelling the dynamics of oospore germination in *Plasmopara viticola* //European Journal of Plant Pathology. – 2010. – T. 128. – №. 1. – C. 113-126. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9635-8>
334. Verzhuk V., Pavlov A., Novikova L. Y., Filipenko G. Viability of Red (*Ribes rubrum* L.) and Black (*Ribes nigrum* L.) Currant Cuttings in Field Conditions after Cryopreservation in Vapors of Liquid Nitrogen //Agriculture. – 2020. – T. 10. – №. 10. – C. 476. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100476>
335. Vezzulli S., Malacarne G., Masuero D., Vecchione A., Dolzani C., Goremykin V., Mehari Z.H., Banchi E., Velasco R., Stefanini M., Vrhovsek U., Zulini L., Franceschi P., Moser C. The Rpv3-3 haplotype and stilbenoid induction mediate downy mildew resistance in a grapevine interspecific population //Frontiers in Plant Science. – 2019. – T. 10. – C. 234. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00234>
336. Vezzulli S., Troggio M., Coppola G., Jermakow A., Cartwright D., Zharkikh A., Stefanini M., Grando M. S., Viola R., Adam-Blondon A-F., Thomas M., This P., Velasco R. A reference integrated map for cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.) from three crosses, based on 283 SSR and 501 SNP-based markers //Theoretical and Applied Genetics. – 2008. – T. 117. – №. 4. – C. 499-511. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0794-3>
337. Viala P., Ravaz L. American vines (resistant stock): their adaptation, culture, grafting and propagation //Press of Freygang-Leary –1908.
338. Vidal J. R., Coarer M., Defontaine A., Genetic relationships among grapevine varieties grown in different French and Spanish regions based on RAPD markers //Euphytica. – 1999. – T. 109. – №. 3. – C. 161-172. <https://doi.org/10.1023/A:1003776716394>
339. Vincent A. T., Derome N., Boyle B., Culley A. I., Charette S. J. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money //Journal of Microbiological Methods. – 2017. – T. 138. – C. 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.02.016>
340. Volk G. M., Shepherd A. N., Bonnart R. Successful cryopreservation of *Vitis* shoot tips: novel pre-treatment combinations applied to nine species //CryoLetters. – 2018. – T. 39. – №. 5. – C. 322-330.
341. Vollmer R., Villagaray R., Cárdenas J., Castro M., Chávez O., Anglin N. L., Ellis D. A large-scale viability assessment of the potato cryobank at the International Potato Center (CIP) //In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. – 2017. – T. 53. – №. 4. – C. 309-317. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9846-1>
342. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Friters A., Pot J., Paleman J., Kuiper M., Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting //Nucleic Acids Research. – 1995. – T. 23. – №. 21. – C. 4407-4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
343. Walker B. J., Abeel T., Shea T., Priest M., Abouelliel A., Sakthikumar Sh., Cuomo C. 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. – T. 9. – №. 11. – C. e112963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963>

344. Wan Y., Schwaninger H., He P., Wang Y. Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes //Vitis: Journal of Grapevine Research. – 2007. – T. 46. – №. 3. – C. 132-137.

345. Wang M. R., Chen L., Teixeira da Silva J. A., Volk G. M., Wang Q. C. Cryobiotechnology of apple (*Malus* spp.): development, progress and future prospects //Plant Cell Reports. – 2018. – T. 37. – №. 5. – C. 689-709. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2249-x>

346. Wapshere A. J., Helm K. F. Phylloxera and *Vitis*: an experimentally testable coevolutionary hypothesis //American Journal of Enology and Viticulture. – 1987. – T. 38. – №. 3. – C. 216-222.

347. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers //Nucleic Acids Research. – 1990. – T. 18. – №. 24. – C. 7213-7218. <https://doi.org/10.1093/nar/18.24.7213>

348. Welter L. J., Göktürk-Baydar N., Akkurt M., Maul E., Eibach R., Töpfer R., Zyprian E. M. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.) //Molecular Breeding. – 2007. – T. 20. – №. 4. – C. 359-374. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9097-7>

349. Weltzien H. C. Geographical distribution of powdery mildews //The Powdery Mildews. – 1978.

350. Wen J. Vitaceae //Flowering Plants Eudicots. – Springer, Berlin, Heidelberg. – 2007. – C. 467-479.

351. Wen J., Lu L. M., Nie Z. L., Liu X. Q., Zhang N., Ickert-Bond S., Cerrath J., Manchester S.R., Boggan J., Chen Z. D. A new phylogenetic tribal classification of the grape family (Vitaceae) //Journal of Systematics and Evolution. – 2018. – T. 56. – №. 4. – C. 262-272. <https://doi.org/10.1111/jse.12427>

352. Wick R. R., Judd L. M., Holt K. E. Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing //Genome Biology. – 2019. – T. 20. – №. 1. – C. 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1727-y>

353. Wiedemann-Merdinoglu S., Prado E., Coste P., Dumas V., Butterlin G., Bouquet A., Resistance to downy mildew derived from *Muscadinia rotundifolia*: genetic analysis and use of molecular markers for breeding //Proc. 5th Int. Workshop on Grapevine Downy Mildew and Powdery Mildew. – 2006. – C. 18-23.

354. Williams J. G., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers //Nucleic Acids Research. – 1990. – T. 18. – №. 22. – C. 6531-6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>

355. Yancheva S., Marchev P., Yaneva V., Roichev V., Tsvetkov I. *In vitro* propagation of grape cultivars and rootstocks for production of prebasic planting material //Bulgarian Journal of Agricultural Science. – 2018. – T. 24. – №. 5. – C. 801-806.

356. Yobrégat O. Introduction to resistant vine types: a brief history and overview of the situation //OENO One. – 2018. – Т. 52. – №. 3. – С. 241-246. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2018.52.3.2220>
357. Yu Y., Fan Q., Shen R., Guo W., Jin J., Cui D., Liao W. Genetic variability and population structure of *Disanthus cercidifolius* subsp. *longipes* (Hamamelidaceae) based on AFLP analysis //PloS One. – 2014. – Т. 9. – №. 9. – С. e107769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107769>
358. Zecca G., Abbott J. R., Sun W. B., Spada A., Sala F., Grassi F. The timing and the mode of evolution of wild grapes (*Vitis*) //Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2012. – Т. 62. – №. 2. – С. 736-747. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.11.015>
359. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification //Genomics. – 1994. – Т. 20. – №. 2. – С. 176-183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>
360. Zini E., Dolzani Ch., Stefanini M., Gratl V., Bettinelli P., Nicolini D., Betta G., Dorigatti C., Velasco R., Letschka T., 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. <https://doi.org/10.3390/ijms20143526>
361. <https://fps.ucdavis.edu/> (дата обращения: февраль 2022)
362. rusvine.ru (дата обращения: февраль 2022)
363. www.comunidad.madrid (дата обращения: февраль 2022)
364. www.genesys-pgr.org (дата обращения: февраль 2022)
365. www.genesys-pgr.org/wiews/USA167 (дата обращения: февраль 2022)
366. www.vivc.de (дата обращения: февраль 2022)
367. www6.montpellier.inrae.fr/vassal/ (дата обращения: февраль 2022)

Приложение 1 – Характеристика изученного материала

№	Название	Номер к-ВИР	Группа	Страна происхождения	Назначение			
					Генотипирование	Получение гибридов	<i>in vitro</i>	Полногеномное секвенирование
1	‘Кара яй изюм’	41647	В	RUS	+			
2	‘Хатми’	41653	В	RUS,	+			
3	‘Гок ала’	41697	БЧМ	RUS	+			
4	‘Ширин шакар’	41743	В	UZB	+			
5	‘Баян ширей’	41782	В	AZE	+			
6	‘Грюнер Сильванер’	49421	ЗЕВ	AUT	+			
7	‘Красноstop золотистый’	41829	БЧМ	RUS	+			
8	‘Слитной’	41853	БЧМ	RUS	+			
9	‘Богатырский’	41895	ЗЕВxВ	RUS	+			
10	‘Марагинский черный’	41698	В	RUS	+			
11	‘Кара калтак’	41744	В	TJK	+			
12	‘Маранди Шамахин’	41785	В	AZE	+			
13	‘Алиготе’	41810	ЗЕВ	FRA	+			
14	‘Турига’	41831	ЗЕВ	PTG	+			
15	‘Виерул – 59’	41856	СМКУГ	MDA	+			
16	‘Сеянец Маленгра’	41900	ЗЕВ	RUS	+			
17	‘Гюлле изюм’	–	В	RUS	+			
18	‘Шампанчик цимлянский’	41811	ЗЕВ	RUS	+			
19	‘Фурминт’	41832	БЧМ	HUN	+			
20	‘Тамбовский ранний’	41902	ВВГ	RUS	+			
21	‘Везне’	–	В	RUS	+			
22	‘Гимра’	41686	БЧМxВ	RUS	+	+		
23	‘Мухчалони’	41746	В	TJK	+			
24	‘Шасла мускатная’	41789	ЗЕВ	FRA	+			

25	‘Сильванер розовый’	41812	ЗЕВ	AUT	+			
26	‘Старый горюн’	41837	БЧМ	RUS	+			
27	‘Юбилейный Магарача’	41870	СМКУГ	UKR	+			
28	‘Урожайный’	41917	СМКУГ	MDA	+			
29	‘Коз изюм’	41656	В	RUS	+	+		
30	‘Розовый Марагинский’	41708	В	RUS	+			
31	‘Паркент’	41751	В	UZB	+			
32	‘Мускат Московский’	41793	ЗЕВ	RUS	+			
33	‘Мускат черный’	41813	ЗЕВ	FRA	+			
34	‘Майский черный’	41838	ЗЕВ	MDA	+			
35	‘Суворовец’	41921	ЕАГ	RUS	+			
36	‘Агадаи’	41659	В	RUS	+			
37	‘Мускат Магарача’	41814	В	UKR	+			
38	‘Кишмиш дербентский’	41880	В	RUS	+			
39	‘Дунавезки лазул’	41923	СМКУГ	BGR	+			
40	‘Тавлинский поздний’	41671	БЧМ	RUS	+			
41	‘Кишмиш круглый’	41713	В	ARM	+			
42	‘Ахтамар’	41758	В	ARM	+		+	
43	‘Шилохвостый’	41800	БЧМ	RUS	+			
44	‘Йорк Мадера’	41815	СМГ	USA	+			
45	‘Донзелино’	41842	ЗЕВ	PTG	+			
46	‘Г-154’	41881	ВВГ	RUS	+			
47	‘Кишмиш ВИРа’	41715	В	UZB	+			
48	‘Рушаки’	41763	В	ARM	+			

49	‘Жемчуг Саба’	41802	ЗЕВ	HUN	+			
50	‘Вердо серый’	41843	ЗЕВ	FRA	+			
51	‘Шоколадный’	41883	СМКУГ	RUS	+			
52	‘Лоза Гагарина’	41931	ВВГ	RUS	+			
53	‘Кара узюм табасаранский’	41675	В	RUS	+			
54	‘Кара узюм ашхабадский’	41766	В	TURK	+			
55	‘Мозак белый’	41822	ЗЕВ	FRA	+			
56	‘Нарын Кала’	41884	В	RUS	+			
57	‘Ливадийски чёрный’	41932	ВВГ	UKR	+			
58	‘Джагар’	41679	ЗЕВ	RUS	+			
59	‘Тегард’	41772	В	ARM	+			
60	‘Изабелла’	41805	МВГ	USA	+			
61	‘Рислинг’	41824	ЗЕВ	DEU	+		+	
62	‘Варюшкин’	41846	БЧМ	RUS	+			
63	‘Агат донской’	41891	ЕАГ	RUS	+			
64	‘Мускат аксайский’	41935	ЕАГ	RUS	+			
65	‘Спитак араксени’	41734	В	ARM	+			
66	‘Мсхали’	41773	В	ARM	+			
67	‘Молдавский’	41807	В	MDA	+			
68	‘Гран нуар де ля Кальмет’	41826	ЗЕВ	FRA	+			
69	‘Грочанка’	41893	ЗЕВ	SRB	+			
70	‘Мускат одесский’	41936	СМКУГ	UKR	+			
71	‘Кабасма’	41827	ЗЕВ	MDA	+			
72	‘Серсиль’	41852	ГСПА	PTG,ESP	+		+	
73	‘Слава Дербента’	41704	В	RUS	+			
74	‘Кишмиш мускатный’	41712	В	UZB			+	

75	‘Семильон’	41836	ЗЕВ	FRA			+	
76	‘Бианка’	41918	СМКУГ	HUN			+	
77	‘Чол бер’	41677	В	RUS		+	+	
78	‘Джунга’	41664	В	RUS		+	+	
79	‘Кишмиш Ваткана’	41752	В	UZB			+	
80	‘Баят капы’	–	БЧМ	RUS			+	
81	‘Альзуб’	41649	В	RUS		+		
82	‘Аг чакрак’	41669	В	RUS		+		
83	‘Махбар цибил’	41694	В	RUS		+		
84	‘Ири тумут’	41681	БЧМ	RUS		+		
85	‘Dixie’ (V. rodundifolia)	48937	СМКУГ	USA				+

Приложение 2 – Крупнейшие держатели коллекций генофонда винограда в мире

Страны	Институты	Количество образцов	Источники
Франция	UFR de Viticulture, Centre ENSA.M/INRA, Montpellier	7800	https://www6.montpellier.inrae.fr/vassal/
	l'Institut des sciences de la vigne et du vin (ISVV)	580	VIVC
США	Agrarian University of Florida	5952	Полулях
	Foundation Plant Services	695	https://fps.ucdavis.edu/
	University of Minnesota Horticultural Research Center	307	VIVC
	University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences	112	
	National Clonal Germplasm Repository University of California	1281	
	Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, USDA, ARS	1406	https://www.genesys-pgr.org/wiews/USA167
Индия	Agrarian Institute, Bangalore	3900	Полулях, 2017
	Indian Institute of Horticultural Research	150	VIVC
	Chaudhary Charan Singh Haryana Agricultural University	161	
Германия	Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof Julius Kühn-Institut (JKI)	4566	VIVC
	Hochschule Geisenheim University Institut für Rebenzüchtung	717	
	Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Wein- und Obstbau Weinsberg	902	
Испания	Junta de Andalucia, Consejeria de Agricultura y Pesca	1452	Полулях, 2017
	Departamento de Biología Vegetal Universidad Politecnica de Madrid	2573	
	Garcia DE LUJAN Junta de Andalucia Consejeria de Agricultura y Pesca C.I.F.A. Rancho de la Merced	1416	VIVC
	Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA)	3532	https://www.comunidad.madrid/

Греция	Research Center of Makedonia and Thraki Greek	260	VIVC
	Hellenic Agricultural Organisation "DEMETER" Institute of Olive Tree, Subtropical Crops and Viticulture	741	
	Gene Bank NAGREF Vine Institute	791	Полулях, 2017
Италия	Istituto Sperimentale per la Viticoltura	2223	Полулях, 2017
	Centro Miglioramento Genetico e Biologia della Vite	404	
	Istituto Agrario di San Michele all' Adige	1564	
	Universita degli Studi di Udine	349	
	Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante Unità Grugliasco	454	VIVC
	Centro Ricerca e Innovazione della Fondazione Edmund Mach, FEM (ex Istituto Agrario di San Michele all' Adige, IASMA)	1099	
	Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA)	1883	
Istituto Sperimentale per la Viticoltura Sezione Operative Periferica	544		
Болгария	Institute of Viticulture and Oenology, Pleven	1676	Полулях, 2017
Молдова	Institut National de la Vigne et du Vin	2574	Полулях, Волынкин, Лиховской 2017
	Practical Scientific Institute of Horticulture and Food Technology Laboratory of Grapevine Genetic Resources and Breeding	1910	https://www.genesys-pgr.org/
Россия	СКФНЦСВВ	5001	Егоров Е., 2021
	ВНИИВиВ Магарач	4620	Егоров Е., 2021
	ВИР	1247	Кислин и др., 2015
	Донская ампелографическая коллекция	828	https://rusvine.ru/
	Ампелографическая коллекция им. Я.И. Потапенко	1200	Панкин, Ильницкая 2018

Приложение 3 – Характеристики групп образцов различного происхождения, баллы

Группа сортов*	Число образцов	Сила роста			Оидиум листьев			Оидиум гроздей			Милдью листьев			Милдью гроздей		
		\bar{x}	Min	Max	\bar{x}	Min	Max	\bar{x}	Min	Max	\bar{x}	Min	Max	\bar{x}	Min	Max
В	29	6.3	2.3	9.0	3.8	1.0	9.0	3.5	1.7	9.0	4.5	1.7	9.0	4.0	1.7	9.0
БЧМ	6	5.4	3.0	7.7	2.6	2.3	3.7	2.9	2.3	3.7	4.0	1.7	7.0	3.3	1.7	5.0
ЗЕВ	20	4.3	1.7	7.7	4.4	2.3	7.7	4.1	1.7	6.3	3.9	1.7	8.3	3.8	1.7	7.0
ВВГ	6	4.9	2.3	7.0	5.0	1.7	7.7	4.7	1.7	6.3	5.3	3.7	6.3	5.8	4.3	6.3
МВГ	8	6.8	4.3	9.0	6.8	5.7	8.3	6.2	5.7	7.0	6.8	4.3	9.0	6.4	5.7	8.3
ЕАГ	3	5.9	4.3	9.0	5.0	4.3	6.3	4.8	4.3	5.7	5.4	4.3	6.3	5.7	4.3	6.3
All Grps	72	5.6	1.7	9.0	4.3	1.0	9.0	4.1	1.7	9.0	4.7	1.7	9.0	4.4	1.7	9.0

*Обозначение: (В-восточная группа сортов, БЧМ – группа сортов Бассейна Черного моря, ЗЕВ – западно-европейская группа сортов, ВВГ – внутри-видовые гибриды, МВГ – межвидовые комплексные гибриды с американскими видами, ЕАГ – европейско-азиатские гибриды)

Приложение 4 – Устойчивость гибридов F₁ к грибным заболеваниям

Родительский образец, гибрид	2021			
	оидиум листьев	оидиум гроздей	милдью листьев	милдью гроздей
♀ ‘Альзуб’ × ♂ ‘Кара яй изюм’				
1	3	3	5	5
2	3	3	3	3
3	3	3	3	3
4	7	5	7	5
5	3	3	3	5
6	3	3	3	3
7	7	5	7	7
8	3	3	3	3
9	3	3	3	3
10	7	5	3	5
♀ ‘Джунга’ × ♂ ‘Кара яй изюм’				
1	7	7	7	5
2	7	5	7	7
3	3	3	3	3
4	1	1	3	3
5	3	3	1	1
6	1	1	1	1
7	3	1	5	3
8	3	3	3	5
9	1	1	3	3
10	5	5	3	3
♀ ‘Аг чакракар’ × ♂ ‘Кара яй изюм’				
1	7	7	7	7
2	7	9	7	7
3	3	3	3	3
4	3	3	5	5
5	3	3	5	5
6	3	3	1	1

7	1	3	1	1
8	5	5	7	5
9	7	5	5	5
10	5	5	3	3
♀ 'Коз узюм' × ♂ 'Кара яй изюм'				
1	7	7	5	7
2	9	5	7	7
3	5	5	3	3
4	3	1	3	3
5	3	3	3	3
6	5	5	3	3
7	7	7	5	5
8	5	5	3	3
9	3	3	1	1
10	3	3	3	3
♀ 'Чол бер' × ♂ 'Кара яй изюм'				
1	7	7	5	5
2	5	5	7	5
3	3	3	1	1
4	5	7	7	7
5	7	7	5	5
6	3	1	3	1
7	5	5	3	3
8	3	1	3	1
9	3	3	3	1
10	3	3	1	1
♀ 'Махбор цибил' × ♂ 'Кара яй изюм'				
1	5	5	9	7
2	5	5	7	7
3	3	3	3	3
4	3	3	5	5
5	9	7	5	5

6	3	3	1	1
7	3	3	3	1
8	3	3	3	1
9	1	1	3	1
10	3	3	1	1
♀ 'Ири тумут' × ♂ 'Кара яй изюм'				
1	7	7	9	7
2	5	5	7	7
3	3	3	5	5
4	3	3	1	1
5	7	5	7	5
6	3	3	1	1
7	3	3	3	3
8	1	1	3	3
9	3	1	3	3
10	3	1	1	1
♀ 'Гимра' × ♂ 'Кара яй изюм'				
1	5	5	7	7
2	7	7	9	7
3	7	7	7	7
4	5	5	9	7
5	3	3	1	1
6	3	3	5	3
7	3	3	3	1
8	1	1	3	1
9	1	1	3	3
10	3	1	1	1

Приложение 5 – Различия между сборкой генома *V. rotundifolia* и *V. vinifera*
на хромосоме 12

Тип	Размер (п.н.)	Количество (п.н.)
Вставка	50-500	109210
Вставка	500-10,000	281618
Делеция	50-500	90627
Делеция	500-10,000	984376
Увеличение тандемного участка	50-500	54053
Увеличение тандемного участка	500-10,000	958278
Сокращение тандемного участка	50-500	3457
Сокращение тандемного участка	500-10,000	1148
Сокращение повторяющихся элементов	50-500	73902
Сокращение повторяющихся элементов	500-10,000	1451574
Увеличение повторяющихся элементов	50-500	75811
Увеличение повторяющихся элементов	500-10,000	349111

Приложение 6 – Характеристика сортов по хозяйственно-ценным признакам и вегетационному периоду на фоне погодных условий

Название ряда	Группа сортов	Сила роста, балл			Оидиум листьев, балл			Оидиум гроздей, балл			Милдью листьев, балл			Милдью гроздей, балл			Вегетационный период, сут			Сумма температур, °С		
		Среднее	Min	Max	Среднее	Min	Max	Среднее	Min	Max	Среднее	Min	Max	Среднее	Min	Max	Среднее	Min	Max	Среднее	Min	Max
‘Кара яй изюм’	В	6.7±0.9	5	8	9±0	9	9	9±0	9	9	9±0	9	9	9±0	9	9	167.3±0.7	166	168	3542.9±52 .1	3440.5	3610.6
‘Хатми’	В	7±0	7	7	2.3±0.7	1	3	3±1.2	1	5	5±0	5	5	4.3±0.7	3	5	148±1.2	146	150	3044.6±41	2969	3110
‘Гюлле изюм’	В	8±0.6	7	9	4.3±0.7	3	5	3±1.2	1	5	3.7±0.7	3	5	3.7±0.7	3	5	150.7±1.7	149	154	3106.3±27 .7	3050.9	3135
‘Везне’	В	6.3±0.7	5	7	5±1.2	3	7	3.7±1.3	1	5	4.3±0.7	3	5	4.3±1.8	3	7	149.7±0.9	148	151	3100.1±45 .3	3018	3174.3
‘Коз узюм’	В	7±0	7	7	1.7±0.7	1	3	2.3±0.7	1	3	4.3±0.7	3	5	3±1.2	1	5	173.3±1.3	172	176	3623.9±63	3497.9	3689
‘Агадаи’	В	6.3±0.7	5	7	2.3±0.7	1	3	2.3±0.7	1	3	3.7±0.7	3	5	4.3±0.7	3	5	157.7±0.3	157	158	3317.5±50 .7	3216.2	3371.8
‘Тавлинский поздний’	БЧМ	7.7±0.7	7	9	2.3±0.7	1	3	2.3±0.7	1	3	4.3±0.7	3	5	3.7±0.7	3	5	178.3±0.7	185	187	3723.1±42	3642.4	3783.5
‘Кара узюм табасаранский’	В	6.3±0.7	5	7	4.3±0.7	3	5	3.7±0.7	3	5	4.3±0.7	3	5	3.7±0.7	3	5	177.3±0.9	176	179	3733.6±47 .2	3641	3796.3
‘Джагар’	ЗЕВ	5.7±1.3	3	7	3±1.2	1	5	3±1.2	1	5	3.7±0.7	3	5	3.7±1.8	3	7	180.7±0.7	176	182	3623.8±50 .4	3583.2	3758.4
‘Гок кала’	БЧМ	3.7±0.7	3	5	2.3±0.7	1	3	3±1.2	1	5	4.3±0.7	3	5	3.7±1.3	1	5	177.7±0.9	176	179	3532.7±32 .6	3475.9	3589
‘Марагинский черный’	В	6.3±0.7	5	7	3.7±1.3	1	5	3.7±1.3	1	5	5.7±1.3	3	7	3.7±1.3	1	5	167±1	166	169	3487.7±56 .6	3375.2	3554.6

‘Черный ДОС ВИР’	В	9±0	9	9	1.7±0.7	1	3	2.3±0.7	1	3	6.3±0.7	5	7	4.3±0.7	3	5	167.3±0.9	166	169	3495.5±61.6	3375.2	3578.2
‘Гимра новый’	БЧМхВ	4.3±0.7	3	5	3.7±1.3	1	5	4.3±0.7	3	5	4.3±0.7	3	5	5±1.2	3	7	176±1.7	174	180	3423.7±45	3348.4	3548.7
‘Розовый Марагинский’	В	6.3±0.7	5	7	1.7±0.7	1	3	2.3±0.7	1	3	3.7±0.7	3	5	3±1.2	1	5	161.3±0.3	161	162	3358.2±50.2	3261.1	3428.8
‘Кишмиш круглый’	В	6.3±0.7	5	7	3±1.2	1	5	2.3±1.3	1	5	3.7±0.7	3	5	3±1.2	1	5	147±1	146	149	3005.7±52.2	2901.4	3060.8
‘Кишмиш ВИРА’	В	3.7±0.7	3	5	5±1.2	3	7	4.3±0.7	3	5	3.7±0.7	3	5	3.7±0.7	3	5	161.3±0.3	161	162	3313.5±42.8	3229.4	3369.2
‘Спитак араксени’	В	6.3±0.7	5	7	2.3±0.7	1	3	2.3±0.7	1	3	4.3±0.7	3	5	3±1.2	1	5	139.3±0.7	138	140	2784.2±23.4	2737.9	2813.1
‘Ширин шакар’	В	5.7±0.7	5	7	5.7±1.3	3	7	4.3±0.7	3	5	2.3±0.7	1	3	2.3±0.7	1	3	170.7±0.9	169	172	3521.4±29.4	3465.6	3565.4
‘Кара калтак’	В	5.7±0.7	5	7	4.3±0.7	3	5	3.7±0.7	3	5	3.7±0.7	3	5	3.7±0.7	3	5	159.7±1.2	158	162	3296.7±59.6	3183.2	3384.8
‘Мухчалони’	В	6.3±0.7	5	7	2.3±0.7	1	3	3±0	3	3	3.7±0.7	3	5	3.7±0.7	3	5	145.3±0.3	145	146	3000±45.6	2909.5	3054.8
‘Паркент’	В	6.3±0.7	5	7	2.3±0.7	1	3	3±0	3	3	4.3±0.7	3	5	3.7±1.3	1	5	158±1.2	156	160	3333.1±60.5	3216.2	3418.5
‘Ахтамар’	В	5.7±0.7	5	7	1±0	1	1	1.7±0.7	1	3	3.7±1.8	3	7	2.3±1.3	1	5	150.3±0.9	149	152	3064.1±38.5	3002.6	3135
‘Рушаки’	В	5±1.2	3	7	1.7±0.7	1	3	1.7±0.7	1	3	1.7±0.7	1	3	1.7±0.7	1	3	181±2.1	178	185	3750.1±54.7	3643.1	3823.6
‘Кара узюм ашхабадский’	В	3.7±0.7	3	5	2.3±0.7	1	3	1.7±0.7	1	3	3.7±0.7	3	5	2.3±0.7	1	3	180±0.6	179	181	3740.5±56.6	3641	3837.1

‘Гегард’	В	8.3±0.7	7	9	3±1.2	1	5	3±1.2	1	5	3.7±0.7	3	5	2.3±0.7	1	3	180±1.7	177	183	3740.2±72 .1	3599.2	3837.1
‘Мсхали’	В	9±0	9	9	2.3±0.7	1	3	2.3±0.7	1	3	4.3±0.7	3	5	3.7±0.7	3	5	176.7±1.2	174	178	3320.4±58 .2	3296.1	3383.3
‘Баян ширей’	В	5.7±0.7	5	7	2.3±0.7	1	3	3±1.2	1	5	3±0	3	3	3.7±0.7	3	5	175±1.5	171	177	3423.7±56 .4	3328.5	3538.1
‘Маранди Шамахин’	В	7.7±0.7	7	9	5±0	5	5	5±0	5	5	5.7±0.7	5	7	5.7±0.7	5	7	177.3±1.7	175	180	3625±50.2	3613.7	3648.3
‘Шасла мускатная’	ЗЕВ	3±0	3	3	5.7±1.3	3	7	4.3±0.7	3	5	5±1.2	3	7	5±1.2	3	7	137±1.7	134	140	2383.6±43 .5	2336.3	2470.6
‘Мускат Московский’	ЗЕВ	5±0	5	5	3.7±1.8	1	7	3.7±1.3	1	5	3.7±1.8	3	7	3±1.2	1	5	161.3±0.9	160	163	3014.8±37 .3	2944.6	3071.7
‘Шилохвостный’	БЧМ	7±0	7	7	2.3±1.3	1	5	3±1.2	1	5	2.3±0.7	1	3	2.3±0.7	1	3	155.7±0.9	154	157	3029±42.6	2944.6	3081.5
‘Жемчуг Саба’	ЗЕВ	7.7±0.7	7	9	2.3±0.7	1	3	1.7±0.7	1	3	3.7±0.7	3	5	3±1.2	1	5	130.3±0.9	129	132	2243.3±33 .6	2181.4	2296.9
‘Изабелла’	МВГ	7.7±0.7	7	9	6.3±1.8	3	9	6.3±1.8	3	9	7±1.2	5	9	6.3±0.7	5	7	180.3±0.9	178	182	3640±45.3	3613.7	3678.2
‘Молдавский’	В	5.7±0.7	5	7	7±1.2	5	9	5.7±0.7	5	7	7±1.2	5	9	6.3±0.7	5	7	178.7±1.3	176	180	3612±50.8	3523.2	3671.7
‘Грюнер Сильванер’	ЗЕВ	4.3±0.7	3	5	6.3±0.7	5	7	5.7±0.7	5	7	5.7±1.8	3	9	5.7±2.4	5	9	164.7±1.2	163	167	3088.9±39 .6	3012.9	3145.9
‘Алиготе’	ЗЕВ	7±1.2	5	9	5±1.2	3	7	5±1.2	3	7	2.3±1.3	1	5	3±1.2	1	5	177.7±1.7	174	177	3420±40.2	3348.6	3462.2
‘Шампанчик цимлянский’	ЗЕВ	2.3±0.7	1	3	3.7±0.7	3	5	3±1.2	1	5	5±1.2	3	7	5±0	5	5	177.3±1.9	175	181	3350±50.8	3297.3	3457.7
‘Сильванер розовый’	ЗЕВ	2.3±0.7	1	3	5.7±0.7	5	7	4.3±0.7	3	5	5±1.2	3	7	4.3±1.8	1	7	163.7±0.3	163	164	3113.4±26 .4	3061.2	3145.9

‘Мускат черный’	ЗЕВ	3.7±1.3	1	5	5±2.3	3	7	5±1.2	3	7	4.3±0.7	3	5	3.7±1.8	1	7	171.7±1.2	170	174	3300.1±49 .6	3202.6	3364.5
‘Мускат Магарача’	В	2.3±0.7	1	3	5.7±0.7	5	7	4.3±0.7	3	5	7±1.2	5	9	5±1.2	3	7	165±1.2	163	167	3484.3±56 .7	3375.2	3565.4
‘Йорк Мадера’	СМГ	5.7±0.7	5	7	7±1.2	5	9	6.3±1.8	3	9	7±0	7	7	6.3±0.7	5	7	178±0.6	176	180	3623.6±45 .2	3583.5	3673.2
‘Мозак белый’	ЗЕВ	3.7±0.7	3	5	5.7±1.8	3	9	5±1.2	3	7	5.7±1.8	3	9	5±2	1	7	178±0.6	176	180	3632.3±38 .5	3596.7	3657.7
‘Рислинг’	ЗЕВ	6.3±0.7	5	7	3.7±1.8	1	7	4.3±1.3	3	7	1.7±0.7	1	3	1.7±0.7	1	3	182.7±1.3	180	184	3528.8±48 .2	3432.3	3577.7
‘Гран нуар де ля Кальмет’	ЗЕВ	5±1.2	3	7	2.3±0.7	1	3	3.7±0.7	3	5	2.3±0.7	1	3	2.3±0.7	1	3	176.7±1.5	174	180	3323±52.6	3296.2	3475.7
‘Кабассия’	ЗЕВ	4.3±0.7	3	5	3±1.2	1	5	3±1.2	1	5	2.3±0.7	1	3	1.7±0.7	1	3	177.3±1.2	176	182	3635±45.4	3583.6	3682.2
‘Красноstop золотистый’	ЗЕВ	3.7±0.7	3	5	2.3±0.7	1	3	3±1.2	1	5	3.7±0.7	3	5	3.7±0.7	3	5	177.3±0.7	175	178	3312±40.7	3285.2	3376.5
‘Турига’	ЗЕВ	3±0	3	3	3±1.2	1	5	3±1.2	1	5	3.7±0.7	3	5	3.7±0.7	3	5	177.7±0.7	175	181	3425±42.6	3356.7	3487.2
‘Старый горюн’	БЧМ	3±0	3	3	2.3±0.7	1	3	3±0	3	3	1.7±0.7	1	3	1.7±0.7	1	3	180.7±0.7	178	182	3641±45.3	3613.8	3683.2
‘Майский черный’	ЗЕВ	1.7±0.7	1	3	3.7±0.7	3	5	3±0	3	3	4.3±0.7	3	5	4.3±0.7	3	5	181±0.6	180	182	3499.8±41 .8	3432.3	3576.3
‘Донзелино’	ЗЕВ	3.7±0.7	3	5	5±1.2	3	7	5±1.2	3	7	1.7±0.7	1	3	2.3±0.7	1	3	175±1	174	177	3384.5±38 .2	3318.2	3450.5
‘Вердо серый’	ЗЕВ	4.3±1.3	3	7	6.3±0.7	5	7	6.3±0.7	5	7	3.7±0.7	3	5	3±1.2	1	5	182.3±0.3	182	183	3528.5±29 .1	3475.9	3576.3
‘Варюшкин’	БЧМ	4.3±0.7	3	5	3.7±0.7	3	5	3.7±0.7	3	5	7±0	7	7	5±0	5	5	173.3±1.5	171	176	3446±48.1	3353.5	3514.9

‘Серсиаль’	ГСРА	3.7±0.7	3	5	1.7±0.7	1	3	1.7±0.7	1	3	2.3±0.7	1	3	2.3±0.7	1	3	182±0.6	181	183	3490.1±29 .2	3432.3	3525.8
‘Слитной’	БЧМ	7±0	7	7	2.3±0.7	1	3	2.3±0.7	1	3	4.3±0.7	3	5	3.7±1.3	1	5	186±0.6	185	187	3732.2±42 .7	3653.3	3799.8
‘Виерул – 59’	СМКУГ	9±0	9	9	8.3±0.7	7	9	7±1.2	5	9	6.3±0.7	5	7	5.7±0.7	5	7	181±1.5	179	184	3606±44.6	3530.8	3685.3
‘Юбилейный Магарача’	СМКУГ	4.3±0.7	3	5	5.7±1.3	3	7	5.7±1.3	3	7	6.3±0.7	5	7	6.3±1.3	5	9	179.7±0.9	175	181	3395.4±50 .8	3326.6	3475.4
‘Кишмиш дербентский’	В	9±0	9	9	5.7±0.7	5	7	5.7±0.7	5	7	4.3±0.7	3	5	4.3±0.7	3	5	129.7±1.5	127	132	2556.2±57 .7	2441.5	2624.6
‘Г-154’	ВВГ	4.3±0.7	3	5	6.3±0.7	5	7	5.7±0.7	5	7	5.7±0.7	5	7	6.3±1.3	5	9	144.3±0.7	143	145	2796±36.3	2723.7	2838.5
‘Шоколадный’	СМКУГ	4.3±0.7	3	5	8.3±0.7	7	9	7±0	7	7	8.3±0.7	7	9	7±1.2	5	9	162±1	160	163	3277.7±42 .7	3192.3	3322.2
‘Нарын-Кала’	В	4.3±0.7	3	5	4.3±0.7	3	5	4.3±0.7	3	5	5.7±0.7	5	7	5.7±0.7	5	7	149.7±9.7	139	169	2811.2±13 .8	2793.7	2838.5
‘Агат донской’	ЕАГ	4.3±0.7	3	5	4.3±0.7	3	5	4.3±0.7	3	5	6.3±0.7	5	7	6.3±0.7	5	7	144±0	144	144	2631.7±29 .5	2583.3	2685.1
‘Грочанка’	ЗЕВ	3.7±1.3	1	5	7.7±0.7	7	9	5.7±0.7	5	7	8.3±0.7	7	9	7±0	7	7	123.3±0.3	123	124	2057.8±23 .9	2017.7	2100.3
‘Богатырский’	ЗЕВхВ	2.3±0.7	1	3	6.3±0.7	5	7	6.3±0.7	5	7	5.7±0.7	5	7	6.3±1.3	5	9	153.3±0.3	153	154	3024±33.9	2956.3	3060.8
‘Сеянец Маленгра’	ЗЕВ	5.7±0.7	5	7	4.3±0.7	3	5	4.3±1.3	3	7	3±0	3	3	4.3±0.7	3	5	142.3±0.3	142	143	2562±39.8	2498.6	2635.5
‘Тамбовский ранний’	ВВГ	5±0	5	5	1.7±0.7	1	3	1.7±0.7	1	3	3.7±0.7	3	5	4.3±0.7	3	5	132.7±0.3	132	133	2536.6±50 .9	2435.5	2596.9
‘Урожайный’	СМКУГ	7.7±1.3	5	9	6.3±0.7	5	7	5.7±0.7	5	7	6.3±0.7	5	7	5.7±0.7	5	7	180.3±0.9	178	182	3615±34.5	3583.5	3645.2

‘Суворовец’	ЕАГ	4.3±0.7	3	5	6.3±0.7	5	7	5.7±0.7	5	7	5.7±0.7	5	7	6.3±0.7	5	7	178.7±0.9	176	180	3625±29. 3	3613.2	3685.7
‘Дунавски лазур’	СМКУГ	7±0	7	7	6.3±0.7	5	7	5.7±0.7	5	7	9±0	9	9	8.3±0.7	7	9	177.3±0.9	175	179	3420±39.2	3343.3	3470.5
‘Лоза Гагарина’	ВВГ	6.3±0.7	5	7	4.3±0.7	3	5	4.3±0.7	3	5	6.3±0.7	5	7	6.3±0.7	5	7	131±0.6	130	132	2563±50.9	2462	2624.6
‘Ливадийский черный’	ВВГ	7±1.2	5	9	7.7±0.7	7	9	5.7±0.7	5	7	6.3±0.7	5	7	6.3±0.7	5	7	146.3±1.8	143	149	3011.6±34 .1	2946.1	3060.8
‘Мускат аксайский’	ЕАГ	9±0	9	9	4.3±0.7	3	5	4.3±0.7	3	5	4.3±0.7	3	5	4.3±1.8	5	7	179.3±0.9	175	179	3423±45.6	3348.2	3462.4
‘Мускат одесский’	СМКУГ	9±0	9	9	6.3±0.7	5	7	5.7±0.7	5	7	4.3±0.7	3	5	5.7±1.3	3	7	160.3±0.9	159	162	3209.8±43 .5	3123.7	3258.2
‘Слава Дербента’	В	6.3±0.7	5	7	7.7±0.7	7	9	5.7±0.7	5	7	6.3±0.7	5	7	6.3±0.7	5	7	145.7±1.7	144	149	3040.7±58 .9	2932.4	3135
НСР0.05		2.0			2.6			2.5			2.3			2.8			9.1			116.9		

Приложение 7 – Пошаговый протокол выделения ДНК и сборки библиотеки

Протокол выделения ДНК

1. Взвесьте ≤ 20 мг лиофилизированной ткани и поместите в пробирку размером 2 мл два стеклянных шарика и растительный материал, далее заморозьте листья с использованием жидкого азота и с помощью гомогенизатора разбейте образцы.
2. После измельчения гомогената сначала добавляйте 400 мкл буфера AP1, а затем 4 мкл РНКазы А и перемешивайте на вортексе. Затем инкубируйте 10 мин при 65°C. Во время инкубации переверните пробирку 2–3 раза.
3. Добавьте 130 мкл. буфера РЗ, пипетируйте и инкубируйте на льду 5 минут, а затем центрифугируйте лизат в течение 5 минут при 20 000 x g (14 000 об/мин). Далее перенесите лизат в спин-колонку QIAshredder, помещенную в пробирку для сбора, затем центрифугируйте в течение 2 минут при 20 000 x g. (14 000 об/мин).
4. Аккуратно, не захватывая остатки гранул, перенесите в новую пробирку, добавляйте 1,5 объема буфера AW1 и перемешайте дозатором.
5. Далее перенесите 650 мкл смеси в спин-колонку DNeasy Mini, помещенную в 2-миллилитровую пробирку для сбора и центрифугируйте в течение 1 мин. при ≥ 6000 x g (≥ 8000 об/мин). Вылейте жидкость и повторите этот шаг с оставшимся материалом.
6. Поместите спин-колонку в новую пробирку. Добавьте 500 мкл буфера AW2, центрифугируйте в течение 1 мин при ≥ 6000 x g и вылейте жидкость.
7. Далее повторите шаг 9 при оборотах центрифуги 20 000 x g (14 000 об/мин) в течение 2 минут.
8. Перенесите спин-колонку в новую микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл или 2 мл. Добавьте 100 мкл буфера АЕ инкубируйте 5 мин при комнатной температуре (15–25°C). Центрифугируйте в течение 1 мин при ≥ 6000 x g. Отберите всю жидкость из пробирки, повторите шаг 8.

Протокол сборки библиотеки. Фрагментация и очистка**Фрагментация и очистка**

1. Используйте 1–4 мкг ДНК, растворенной в 150 мкл воды, свободной от нуклеаз, в микроцентрифужной пробирке объемом 1,5 мл. Убедитесь, что ДНК полностью растворилась и перемешалась.
2. Перенесите ДНК в верхнюю камеру g-TUBE (завинчивающейся крышкой вверх) и плотно закройте крышку.
3. Поместите g-TUBE в настольную центрифугу (закрутите крышку вверх) и вращайте

пробирки со скоростью, необходимой для достижения желаемого размера фрагментов, в соответствии с инструкциями производителя. Проверьте g-TUBE, чтобы убедиться, что вся жидкость слита на дно.

4. Переверните g-TUBE, загрузите в ротор (завинтите крышку) и снова центрифугируйте с той же скоростью и продолжительностью. Проба будет собрана в завинчивающейся крышке.
5. Откройте g-TUBE (завинчивающейся крышкой вниз) и соберите всю жидкость.
6. Проверьте фрагменты ДНК с помощью биоанализатора Agilent 2100.

Восстановление (или ремонт) ДНК и подготовка концов (SQK-LSK109)

7. Подготовьте реагенты NEBNext FFPE DNA Repair Mix и NEBNext End Repair / dA-Tailing Module в соответствии с инструкциями производителя.
8. В пробирке для ПЦР объемом 0,2 мл смешайте следующее:

Реагент	Объем
Фрагментированная ДНК (1 мкг)	48 мкл
Буфер для восстановления ДНК NEBNext FFPE	3,5 мкл
Смесь для восстановления ДНК NEBNext FFPE	2 мкл
Конечный реакционный буфер Ultra II	3,5 мкл
Ферментная смесь для конечных препаратов Ultra II	3 мкл
Общий	60 мкл

Осторожно встряхните дно пробирки щелчками пальца, чтобы перемешать, и ненадолго покрутите, чтобы собрать всю жидкость на дно пробирки.

9. Инкубируйте 5 минут при 20°C и 5 минут при 65°C, используя термоциклер.
10. Ресуспенсируйте шарики SPRI, встряхивая, для следующих шагов. Перед использованием шарики необходимо уравновесить до комнатной температуры в течение не менее 30 минут.
11. Перенесите фрагменты ДНК с готовыми концами в микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл.
12. Добавьте 60 мкл ресуспандированных шариков и перемешайте переворачиванием.
13. Чтобы способствовать связыванию ДНК с шариками, инкубируйте смесь на ротаторе Nula Mixer, вращая в течение 5 мин при комнатной температуре.
14. Коротко вращайте и осаждайте шарики на магнитном штативе в течение 2–5 минут, пока

жидкость не станет прозрачной и бесцветной, и слейте пипеткой супернатант.

15. Держите пробирку на магнитной стойке и промойте шарики, добавив 200 мкл свежеприготовленного 70-процентного этанола (в воде, свободной от нуклеаз). Используйте пипетку, чтобы удалить и выбросить 70-процентный этанол.
16. Повторите этап очистки.
17. Не вынимая пробирку из магнитного штатива, осторожно покрутите. Не задевая шарики, осторожно удалите остаточный этанол. Дайте шарикам высохнуть на воздухе в течение ~30 секунд и не пересушивайте их (избегайте больших трещин в шарике).
18. Добавьте 62 мкл воды, свободной от нуклеаз, к шарикам, переместите пробирку в ротатор Nula Mixer и инкубируйте при вращении в течение 2 мин при комнатной температуре.
19. Поместите пробирку обратно на магнитную стойку. Когда элюат станет прозрачным и бесцветным, перенесите 61 мкл и элюируйте в новую микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл Eppendorf DNA LoBind.
20. Проверьте концентрацию библиотеки с помощью Qubit. Концентрация должна составлять > 700 ng.

Лигирование адаптера и очистка

21. Центрифугируйте Adapter Mix (AMX) and Quick T4 Ligase и поместите на лед.
22. Разморозьте Ligation Buffer (LNB) при комнатной температуре. Перемешайте пипетированием и положите на лед.
23. Разморозьте Elution Buffer (EB) при комнатной температуре. Перемешайте буфер на вортексе, центрифугируйте и поместите на лед.
24. Разморозьте Long Fragment Buffer (LFB) при комнатной температуре, перемешайте щелчком пальца по пробирке, затем покрутите пробирку на центрифуге и поместите на лед.
25. В пробирке Eppendorf DNA LoBind на 1,5 мл перемешайте в следующем порядке:

Реагент	Объем
Образец ДНК из вышеуказанного шага	60 мкл
Буфер для лигирования (LNB)	25 мкл
NEBNext Quick T4 ДНК-лигаза	10 мкл
Adapter Mix (AMX)	5 мкл
Общий	100 мкл

Осторожно встряхните дно пробирки щелчками пальца, чтобы перемешать, и ненадолго

покрутите, чтобы собрать всю жидкость на дно пробирки.

26. Инкубируйте смесь для лигирования в течение 10 мин при комнатной температуре.
27. Ресуспендируйте шарики SPRI для этапов очистки.
28. Добавьте 40 мкл ресуспендированных шариков для связывания ДНК и перемешайте щелчками пальца по пробирке.
29. Инкубируйте пробирку с помощью ротатора Nula mixer в течение 5 мин при комнатной температуре.
30. Поместите пробирку на магнитный штатив. Когда жидкость станет прозрачной и бесцветной, удалите жидкость.
31. Добавьте 250 мкл ligation buffer (LFB), чтобы промыть шарики. Перемешайте вручную и поместите на магнитный штатив, чтобы получить гранулы. Когда элюат станет прозрачным и бесцветным, удалите супернатант с помощью пипетки.
32. Держите пробирку на магнитной стойке и промойте шарики, добавив 200 мкл свежеприготовленного 70-процентного этанола (в воде, свободной от нуклеаз). Используйте пипетку, чтобы удалить и выбросить 70-процентный этанол. Повторите этап стирки.
33. Не вынимая пробирку из магнитного штатива, осторожно покрутите. Не задевая шарики, осторожно уберите остаточный супернатант. Дайте шарикам высохнуть на воздухе в течение ~30 с, избегая пересушивания гранул.
34. Добавьте 17 мкл elution buffer (EB) к шарикам. Снимите пробирку со штатива и инкубируйте на ротаторе Nula Mixer, вращая в течение 10 минут при комнатной температуре.
35. Поместите пробирку на магнитный штатив, пока элюат не станет прозрачным и бесцветным.
36. Перенесите 15 мкл элюата в новую микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл.
37. Проверьте концентрацию библиотеки с помощью Qubit. Концентрация должна составлять > 430 ng. Библиотека ДНК (SQK-LSK109) готова к загрузке на проточную ячейку, и не должны храниться на льду до использования.

Загрузка образца ДНК (SQK-LSK109)

1. Разморозьте sequencing buffer (SQB), loading beads (LB), flush tether (FLT) и одну пробирку flush buffer (FLB) при комнатной температуре. Затем поместите их на лед.
2. Откройте крышку кассеты MinION и вставьте одну проточную кювету. Сдвиньте крышку заливного отверстия по часовой стрелке, чтобы открыть заливное отверстие.
3. Установите пипетку P1000 на 200 мкл. Вставьте наконечник в заливочный порт и поверните колесо, чтобы извлечь 20–30 мкл буфера из заливного порта. Убедитесь, что множество пор постоянно закрыто.
4. Приготовьте затравочную смесь: добавьте 30 мкл смешанного FLT в пробирку со

смешанным FLB и перемешайте пипеткой.

5. Загрузите 800 мкл заправочной смеси в заливной порт. Следует соблюдать осторожность, чтобы не допустить попадания пузырьков воздуха. Используйте заправленную проточную кювету в течение 5 мин.
6. Добавьте 37,5 мкл SQB, 25,5 мкл LB (тщательно перемешайте перед использованием) и 12 мкл библиотеки ДНК.
7. Откройте крышку порта для пробы SpotON и загрузите 200 мкл заправочной смеси в заправочный порт, избегая образования пузырьков воздуха.
8. Перед загрузкой перемешайте подготовленную библиотеку.
9. По каплям загрузите 75 мкл библиотеки в порт для образцов (sample port) SpotON.
10. Закройте пробоотборный порт SpotON и заливной порт (priming port). Закройте крышку MinION.

Необходимые материалы и оборудование

1. Tissuelyser LT (Qiagen)
2. DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)
3. Пробирки 1,5 мл и 2 мл
4. Стекланные шарики
5. SPRI beads
6. Covaris g-TUBE
7. NEBNext FFPE Repair Mix
8. NEBNext End Repair/dA-Tailing Module
9. NEBNext Quick Ligation Module
10. 70% ethanol
11. Nuclease-free water
12. SQK-LSK109 Ligation 1D
13. Флуорометр Qubit
14. Спектрофотометр NanoDrop
15. Настольная центрифуга
16. Биоанализатор
17. Ротатор Hula Mixer
18. Магнитный штатив
19. Термоциклер
20. MinION (Oxford Nanopore Technologies)
21. Проточная ячейка FLO-MIN106
22. Компьютер