

На правах рукописи

Агаханов

Магамедгусейн Магамедганифович

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

Специальность: 06.01.05 – Селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Санкт-Петербург

2022

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР)

Научный руководитель:

Ухатова Юлия Васильевна

Кандидат биологических наук, заместитель директора института по научно-организационной работе, заведующий ЦКП «Лаборатория искусственного выращивания и оздоровления генофонда растений», ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова», г. Санкт-Петербург

Официальные оппоненты:

Лиховской Владимир Владимирович

Доктор сельскохозяйственных наук, директор института, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «МАГАРАЧ» РАН», г. Ялта

Ильницкая Елена Тарасовна

Кандидат биологических наук, заведующий лабораторией селекции, сортоизучения и сохранения генофонда, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия», г. Краснодар

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Чеченский государственный университет имени А.А. Кадырова», г. Грозный

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 006.041.02. при Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова по адресу: 190031, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова и на сайте института:

<https://www.vir.nw.ru/blog/2022/06/29/agahanov-mm/>

Автореферат разослан «__» _____ 20... г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Елена Вячеславовна Рогозина

Общая характеристика работы

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 являются крайне актуальными и необходимыми для дальнейшего развития селекции винограда.

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

Известно, что виноград поражают более 80 фитопатогенов (Porotikova et al., 2021), включая грибы, вирусы и бактерии (Pearson, Goheen, 1988; Carisse, 2016; Calonnec et al., 2016; Лиховской, 2018). 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 высоких инфекционных фонах; 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’ – представителя вида *V. rotundifolia*, оценены по эффективности введения в культуру *in vitro* образцы винограда.

Апробация результатов работы на международных и всероссийских конференциях: VII Съезде ВОГИС, посвященном 100-летию кафедры генетики СПбГУ (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).

Теоретическая и практическая значимость

- В ходе трехлетних полевых наблюдений были фенотипированы образцы из ампелографической коллекции ВИР по фенологическим фазам и по устойчивости к грибным заболеваниям. Выявлен автохтонный образец 'Кара яй изюм', выделившийся по признаку абсолютной устойчивости к грибным заболеваниям. В результате скрещиваний с этим образцом создан растительный 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 ДООС 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 ДООС 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.

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.

Благодарности. Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю за постоянное внимание к работе; всем коллегам, способствовавшим реализации данного исследования. Автор глубоко признателен зав. отд. АИС ГРР д.с-х.н Л.Ю. Новиковой за помощь в проведении статистической обработки результатов. Автор выражает благодарность к.с-х.н. В.А. Носульчаку и к.б.н. Е.Н. Кислину за практические навыки и теоретические знания при изучении разнообразия ампелографической коллекции. Автор выражает благодарность за помощь специалисту ДОО ВИР Н.К. Казарову.

Исследование выполнено при финансовой поддержке проектов РФФИ № 20-316-80059 «Создание картирующих популяций и генетических карт для поиска генов хозяйственно-ценных признаков у винограда (*V. vinifera* L.)» и № 19-316-90007 «Полногеномное секвенирование иммунного к грибным заболеваниям вида *V. rotundifolia* Michx. для выявления интрогрессий в геномах отдаленных гибридов, полученных с его участием» и госзадания ВИР по теме НИР № 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» и № 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».

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 опытно-селекционной станции – филиала ВИР (далее – КРОСС ВИР) и ДОО ВИР.

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 наименований, из них 303 на иностранных языках, 7 электронных ресурсов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы приведены сведения о ботанических особенностях винограда, генетическом разнообразии ампелографической коллекции ВИР, о наиболее распространенных болезнях винограда и вредителях; современных

методах изучения генетического разнообразия и полногеномного анализа, а также данные о создании дублетных *in vitro* коллекций.

Глава 2. Материалы и методы исследований

Исходным материалом для исследований послужила выборка из 85 образцов винограда коллекции ВИР: 84 из ампелографической коллекции ДООС ВИР и один образец североамериканского вида *V. rotundifolia* – единственный сорт ‘Dixie’, поддерживаемый в живом виде на КрОСС ВИР.

В настоящей работе использовали полевые (фенологические наблюдения, фитопатологическую оценку, проведение скрещиваний) и лабораторные (молекулярно-генетические и биотехнологические) методы исследования.

Фенологические наблюдения проводили в 2018-2020 гг. согласно методическим рекомендациям 1978 года Всероссийского научно-исследовательского института виноградарства и виноделия (ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко) на 73 генотипах винограда, относящихся к разным эколого-географическим группам. 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.

Оценку устойчивости проводили в 2018-2020 гг. согласно методическим рекомендациям (OIV, 2009), по девятибалльной шкале: где 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). При характеристике сортов за 3 года изучения получены данные по устойчивости образцов коллекции к милдью и оидиуму.

Получение и описание гибридов. Скрещивания были проведены в 2020 году. В качестве материнских форм использовали сорта с функционально-женским типом цветка (‘Альзуб’, ‘Джунга’, ‘Аг чакракар’, ‘Коз узюм’, ‘Чол бер’, ‘Махбор цибил’, ‘Гимра’, ‘Ири тумут’), характеризующиеся чувствительностью к грибным заболеваниям (милдью, оидиуму). В качестве опылителя был выбран автохтонный сорт, демонстрирующий устойчивость к обоим заболеваниям (милдью, оидиуму) на высоких инфекционных фонах. 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 по выделению на них капелек, а также и по расцветанию бутонов некастрированных соцветий (Бузин, 1937; Ларькина и др., 2015). Для скрещиваний использовали пыльцу от одного растения сорта ‘Кара яй изюм’, которую наносили на подготовленные к опылению соцветия одного растения у каждого материнского

сорта. Опыление проводили при помощи кисточки, в интервале с 6 до 10 часов. В результате были получены 8 популяций. Для генетического анализа из каждой популяции было отобрано по 10 растений. Генетическое родство гибридов в популяции определялось с помощью микросателлитного анализа. Для амплификации микросателлитных фрагментов использовали 10 пар праймеров: scu10vv, scu11vv, scu15vv, udv107, vvib01, vvip31, vviv67, vvmd5, vvmd6, vvs3, которые были рекомендованы в литературных источниках для анализа наиболее полиморфных SSR-локусов (Thomas et al., 1993; Bowers et al. 1996; Scot et al., 2000; Di Gaspero et al. 2005; Merdinoglu et al. 2005).

В 2021 году проведена оценка устойчивости гибридов F₁ к грибным заболеваниям на естественных инфекционных фонах и SSR-анализ с использованием 10 микросателлитных праймеров.

Для анализа генетического разнообразия ампелографической коллекции была сформирована выборка из 73 образцов. ДНК выделяли из свежих и лиофилизированных листьев модифицированным СТАВ-методом с добавлением 2-меркаптоэтанола (Rahimah et al., 2006). Для амплификации микросателлитных фрагментов использовали 8 пар флюоресцентно меченых праймеров: scu 15vv, vvs2, vvmd27, vvmd31, vvih54, vvip31, scu11vv, vvib01 (Thomas et al., 1993; Bowers et al. 1996 b; Bowers et al. 1999a; Scot et al., 2000; Merdinoglu et al. 2005).

Для полногеномного секвенирования был использован сорт ‘Dixie’ – образец вида *V. rotundifolia*. ДНК выделяли из молодых лиофилизированных листьев с использованием коммерческого набора DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Секвенирование производили с использованием прибора MinION (Oxford Nanopore Technologies). Для сборки генома методом *de novo* применяли алгоритм (pipeline) minimap2 -miniasm (Li, 2016). Дополнительно был применен альтернативный подход к получению сборки генома сорта ‘Dixie’ – гибридным методом (Antipov et al., 2016). Для оценки качества сборки и ее фрагментированности геномная сборка сорта ‘Dixie’, 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).

Изучение винограда в культуре *in vitro*. Генетическое разнообразие винограда требует апробации современных способов дублирования образцов, в том числе, в культуре *in vitro*. В рамках настоящего диссертационного исследования мы изучали показатели культивирования в стерильных условиях (введение в культуру *in vitro*) 10 сортов винограда на питательной среде Мурасиге Скуга (МС, 1962) + 1 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП). Для предотвращения большого выпада эксплантов сбор черенков проводили в период покоя, черенки проращивали на световых установках при температуре +25...+30°C. Для микроразмножения и укоренения использовали питательную среду МС с добавлением 1 мг/л БАП +

0,1 мг/л индолил-3-масляной кислоты (ИМК). Были изучены способность к микроразмножению и межсортные различия по уровню коэффициента микрклонального размножения (КМР). Кроме того, изучали морфогенетический потенциал – измеряли высоту микрорастений винограда. В качестве эксплантов использовали по 10 верхушечных почек каждого генотипа. Через шесть недель культивирования на питательной среде МС + 1 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИМК подсчитывали КМР. Опыт проводили в трех повторностях.

Статистическая обработка результатов. Опыты проводили в трехкратной повторности. Статистическую обработку проводили методами вариационной статистики (дисперсионного анализа, t-критерий Стьюдента, коэффициента ранговой корреляции Спирмена R_s) при уровне значимости 0,05. Влияние групп происхождения образцов винограда было исследовано критерием Краскела-Уоллиса (непараметрический аналог дисперсионного анализа) в пакете Statistica 13.3. Для обработки полученной информации о размерах аллелей микросателлитных 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-in period 100 000, MCMC 600 000, admixture model, вероятное количество кластеров указывалось от 2 до 15.

Глава 3. Результаты исследований

Фенологические исследования. Данные фенологических наблюдений с 2018-2020 гг. показали, что согласно международному классификатору OIV (1983), по продолжительности периода от начала распускания почек до полной зрелости ягод – от 96 до 185 суток, в коллекции представлены сорта всех сроков созревания – от сверхранних до очень поздних. Сумма активных температур (в течение всего периода вегетации) выше 10°C варьировала от 2057,8 до 3723°C.

Оценка устойчивости к болезням. Анализ устойчивости, проявленной образцами коллекции за три года, показал, что 93% образцов изученной выборки восприимчивы к поражению милдью и оидиумом в средней и высокой степени, также выявлены образцы с устойчивостью к этим патогенам (рис. 1). Оценка устойчивости к болезням 80 гибридных растений поколения F_1 , проведенная в 2021 году, позволила выявить фенотипы с иммунитетом (балл 9) и высокой устойчивостью (балл 7) к болезням. Баллом 1 оценивали полное 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 сеянца. У четырех гибридных сеянцев также отсутствовали симптомы милдью листьев.

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', 'Дунаевски лазур') и к милдью гроздей ('Грочанка', 'Дунаевски лазур').

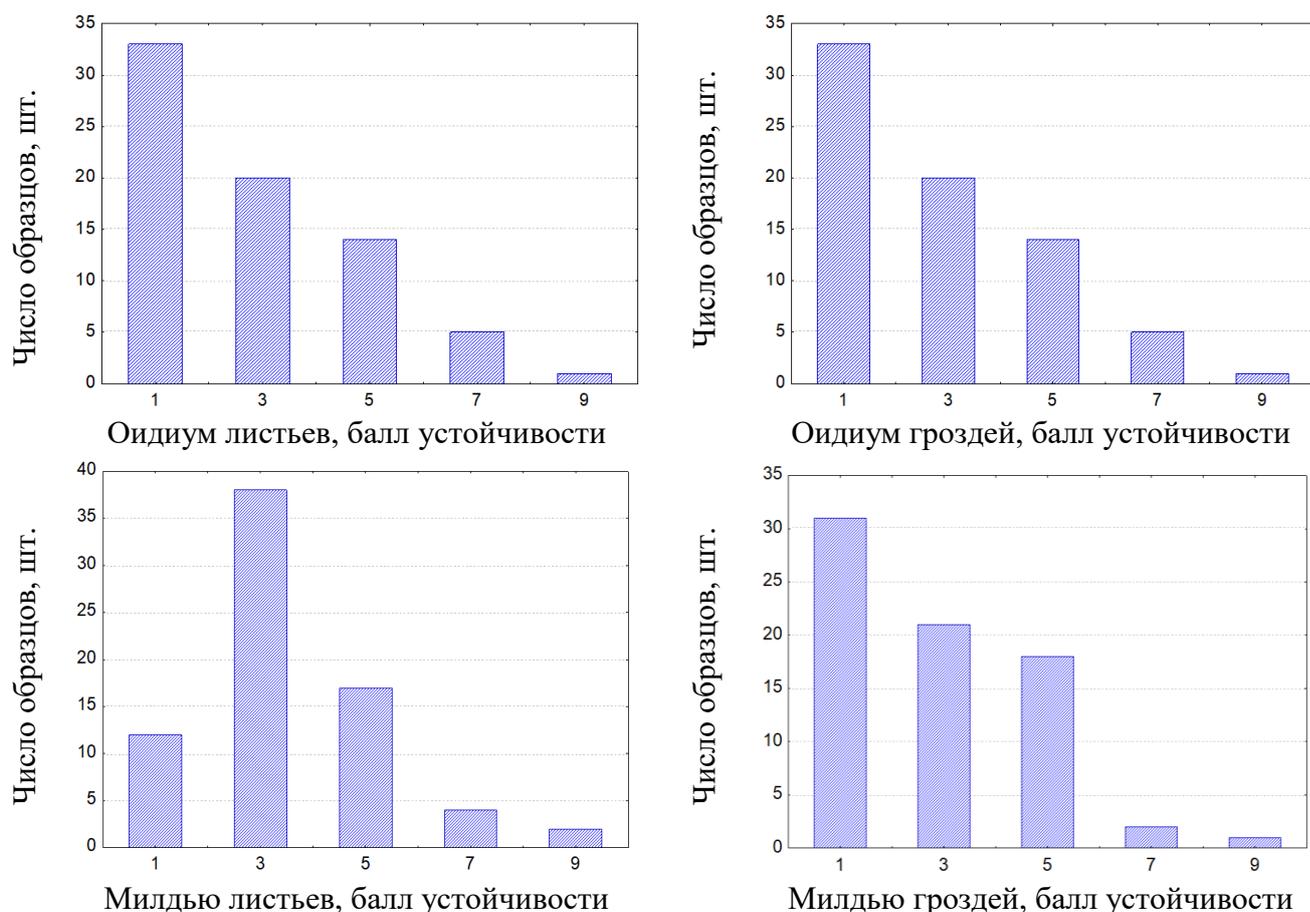


Рисунок 1 – Оценка устойчивости коллекционных образцов винограда к милдью и оидиуму ДООС ВИР, 2020 г.

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

Построенные гистограммы отражают распределение образцов по изученным характеристикам устойчивости листьев и гроздей к милдью и оидиуму (рис. 1).

Нами выявлен высокоустойчивый образец – автохтонный сорт 'Кара яй изюм', проявляющий устойчивость к грибным заболеваниям во все годы исследования, в том числе на высоких оомицетных фонах в 2020 года. Далее этот автохтонный устойчивый образец был использован в качестве отцовской формы в скрещиваниях с неустойчивыми сортами с женским типом

цветка для получения гибридных популяций F₁ с целью последующего изучения и использования в селекции.

Сравнили силу роста и устойчивость не только отдельных образцов, но и групп различного происхождения по А.М. Негрулю (табл. 1). Критерий Краскела-Уоллиса показал, что между группами есть достоверные различия по силе роста ($p=0,004$) и всем показателям устойчивости: 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 ($p=0,000$).

Таблица 1 – Характеристики групп образцов различного происхождения, по устойчивости к оидиуму и милдью (баллы)

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

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 наиболее высокая 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 группа МВГ (6.8), показатели устойчивости которых достоверно превышают показатели более чувствительных образцов из группы ЗЕВ (3.9). К 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 заметно выделяются образцы группы МВГ ‘Виерул-59’, ‘Юбилейный Магараца’, ‘Урожайный’, ‘Дунавски лазур’, ‘Йорк мадера’, ‘Шоколадный’, ‘Изабелла’, ‘Бианка’, ‘Мускат одесский’. В качестве контроля выбран сорт винограда ‘Ахтамар’, проявляющий максимальную неустойчивость к грибным заболеваниям (милдью, оидиум) на высоком инфекционном фоне.

Образцы группы МВГ имели более высокую силу роста, чем образцы группы ЗЕВ (4.3) и В (6.3). Исследование корреляции признаков образцов (таблица 2) показало, что сила роста не связана с устойчивостью к болезням. 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, соответственно.

Таблица 2 – Результаты анализа корреляционных связей между признаками устойчивости и силой роста образцов винограда

Признак	Сила роста	Оидиум листьев	Оидиум гроздей	Милдью листьев	Милдью гроздей
Сила роста	1,00	-0,06	-0,04	0,06	-0,00
Оидиум листьев	-0,06	1,00	0,94	0,60	0,70
Оидиум гроздей	-0,04	0,94	1,00	0,57	0,68
Милдью листьев	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.

Генотипирование гибридных популяций. 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 3.

Таблица 3 – Изменчивость микросателлитных локусов по результатам генотипирования 80 растений, составивших сборную гибридную популяцию сеянцев винограда от скрещиваний ♂ ‘Кара яй изюм’ с неустойчивыми сортами с женским типом цветка

Локус	scu10v v	scu11v v	scu15v v	udv10 7	vvib0 1	vvip3 1	vviv6 7	vvmd 5	vvmd 6	vvs3 9
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
PIC, 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).

В результате анализа 10 проанализированных микросателлитных локусов у изученных гибридов было выявлено 93 аллеля (от 6 до 11 на локус). Кроме того, был рассчитан коэффициент информативности PIC для каждого маркера, значения которого варьировали в диапазоне 0.560–0.875.

Было выделено восемь генетических кластеров (К) и проведена оценка генетического разнообразия гибридов винограда (рис. 2). Результаты анализа полученных данных в программе Structure 2.3.4 показали, что изученные гибриды могут быть отнесены к восьми группам.

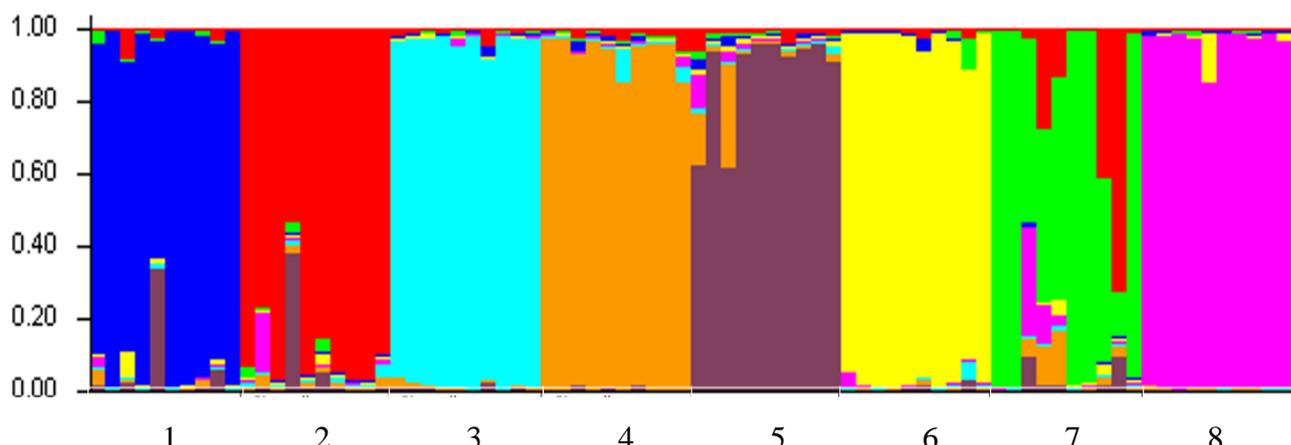


Рисунок 2 – Анализ популяционной структуры 80 гибридных форм винограда
Примечание: гибриды от скрещиваний: 1 – ♀ ‘Альзуб’ × ♂ ‘Кара яй изюм’; 2 – ♀ ‘Джунга’ × ♂ ‘Кара яй изюм’; 3 – ♀ ‘Аг чакракар’ × ♂ ‘Кара яй изюм’; 4 – ♀ ‘Коз узюм’ × ♂ ‘Кара яй изюм’; 5 – ♀ ‘Чол бер’ × ♂ ‘Кара яй изюм’; 6 – ♀ ‘Махбор цибил’ × ♂ ‘Кара яй изюм’; 7 – ♀ ‘Гимра’ × ♂ ‘Кара яй изюм’; 8 – ♀ ‘Ири тумут’ × ♂ ‘Кара яй изюм’

Анализ популяционной структуры по результатам микросателлитного маркирования позволяет сделать вывод о том, что гибриды от скрещивания 3 (♀ ‘Аг чакракар’ × ♂ ‘Кара яй изюм’), 6 (♀ ‘Махбор цибил’ × ♂ ‘Кара яй изюм’) и 8 (♀ ‘Ири тумут’ × ♂ ‘Кара яй изюм’) не имеют признаков генетического засорения и потенциально могут быть использованы для селекционных целей. Данные генотипы сохраняются в условиях ДОС ВИР.

Генетическое разнообразие коллекции винограда ДОС ВИР. Выборка из 73 образцов винограда из коллекции ДОС ВИР была проанализирована с использованием восьми микросателлитных праймеров, выбранных в качестве наиболее полиморфных и информативных (табл. 4).

Для восьми проанализированных микросателлитных локусов было выявлено 111 аллеля. Для каждого маркера был рассчитан коэффициент информативности PIC, значения которого были достаточно высоки и варьировали в пределах 0,61–0,81 (табл. 4).

По данным микросателлитного анализа, в структуре генетического разнообразия изученных образцов выделено четыре кластера (рис. 3).

Таблица 4 – Изменчивость микросателлитных локусов по результатам генотипирования 73 образцов винограда, сохраняемых в условиях ДОС ВИР

Локус	scu15vv	vvs2	vvmd27	vvmd31	vvih54	vvip31	scu11vv	vvib01
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)

Каждая из первых трех групп содержит образцы винограда одного и того же географического происхождения и представляет собой отдельную эколого-географическую группу, четвертый кластер включал в основном образцы гибридного происхождения (рис. 3).

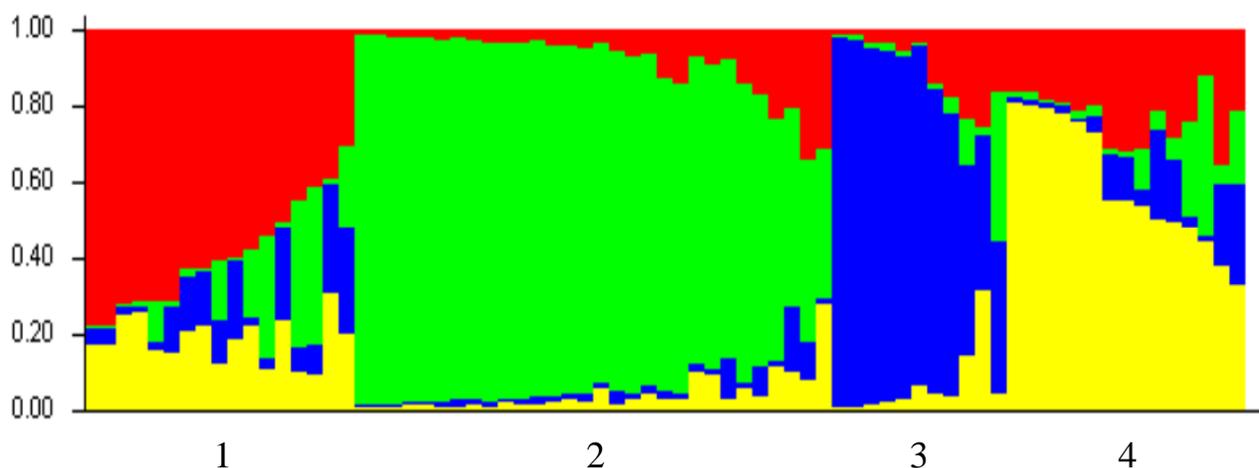


Рисунок 3 – Структура генетического разнообразия образцов винограда сохраняемых в условиях ДОС ВИР

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. 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.

Полногеномное секвенирование *V. rotundifolia* (сорт ‘Dixie’). Метод *de novo*. В результате с двух ячеек MinION (тип R9.4.1) было получено всего 1 748 466 прочтений (далее – ридов) (табл. 5).

Таблица 5 – Общая статистика “сырых” данных секвенирования генома сорта ‘Dixie’ методом *de novo*

Статистический показатель	Значение
Средняя длина рида (п.н.)	5,987.6
Среднее качество рида (Phred)	12.3
Медиана длины рида (п.н.)	4,142.0
Медиана качества рида (Phred)	12.5
Общее количество ридов	1,748,466
N50 длины рида (п.н)	9,514
Всего прочитано нуклеотидов (п.н.)	10,469,195,297

После декодирования сырого сигнала fast5 в fastq/fastx и коррекции ошибок с помощью *guppy* было получено 1 738 535 ридов. Для полученных ридов был произведён контроль качества с помощью *pyroQC*, 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 п.н., второй – 14600 п.н. Медианы длин ридов составили 3500 п.н. для первой ячейки и 6380 п.н. для второй, соответственно (табл. 6).

Таблица 6 – Основные статистические характеристики сиквенса генома сорта ‘Dixie’

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

На следующем этапе анализа данных провели фильтрацию прочтений низкого качества, коротких прочтений и наиболее вероятных прочтений инородной ДНК с помощью *minimap2*. Всего был обнаружен и удален 41501 рид (~2%), характеризующийся 100% сходством с референсным геномом человека. Для последующего анализа были сохранены риды, имеющие показатель качества по

шкале Phred не менее 8 и длину прочтения более 500 п.н. После фильтрации по этим показателям было получено 1635299 высококачественных ридов, составивших в общей сложности более 10 млрд (10 197 618 064) п.н. Отфильтрованные риды низкого качества составили 5,9% от общего числа прочтений.

Принимая во внимание опубликованный (Canaguier et al., 2017) размер генома культурного винограда *V. vinifera* в ~ 486 Мб (млн. п.н.), можно предположить, что полученный объем данных обеспечивает почти 21-кратное “покрытие” секвенируемого генома сорта ‘Dixie’. Такая глубина чтения позволяет осуществлять как гибридную сборку генома этого вида с комбинированием длинных и коротких чтений, так и сборку методом *de novo* без использования референсного генома.

Гибридная сборка. Алгоритм гибридной сборки включает в себя сборку коротких чтений графами Де Брюина и последующем закрытии “пропусков” сборки с помощью длинных ридов. По результатам комбинирования коротких и длинных прочтений нами были протестированы разные длины k-меров (21, 33, 55, 77 п.н.). В качестве наиболее результативной алгоритм автоматически выявил длину k-меров 77 п.н. Геномная сборка сорта ‘Dixie’, полученная с использованием метода *de novo* и гибридного метода, была протестирована на основные статистические показатели с помощью программы *Quast* (Gurevich et al., 2013) (табл. 7). Общая длина сборки составила 539 млн. п.н., что соотносится с аналогичным показателем для референсного генома *V. vinifera* в ~486 Мб (Canaguier et al., 2017).

По результатам сравнения двух подходов к получению геномной сборки сорта ‘Dixie’ установлено, что оба метода имеют свои преимущества и недостатки. Гибридный метод позволяет получить большее количество скаффолдов, однако при этом сборка получается намного более фрагментированной, чем при сборке методом *de novo*. 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 чтениями.

Таблица 7 – Основные характеристики полногеномной сборки генома сорта ‘Dixie’, полученной двумя методами

Показатели качества сборки	п.н. (гибридный метод)	п.н. (метод <i>de novo</i>)
Количество контигов (≥ 0 п.н.)	809 308	2 039
Количество контигов (≥ 1000 п.н.)	43 425	2 037
Количество контигов (≥ 5000 п.н.)	15 430	2 020
Количество контигов (≥ 10000 п.н.)	9 292	1 998
Количество контигов (≥ 25000 п.н.)	4 056	1 808
Количество контигов (≥ 50000 п.н.)	1 516	1 493
Общая длина скаффолдов (сборки) (≥ 0 п.н.)	539 724 633	386 122 654
Количество скаффолдов	84 025	2 039
Самый длинный скаффолд	319 841	2 353 788
N50	24 761	374 653
N75	6 901	173 204
L50	4 103	293
L75	12 305	669
GC%	33,31	33,94

Полученные разными способами две версии геномной сборки сорта ‘Dixie’ 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 геномной сборки и доступных баз данных повторяющихся элементов с помощью программы Repeat Masker (Tarailo-Graovac, Chen, 2009). Для сборки, полученной гибридным методом, было выявлено повторов общей протяженностью 1 651 434 п.н., для сборки методом *de novo* - почти в 3,5 раза меньше (484 681 п.н.).

Для **функциональной аннотации** и оценки степени фрагментированности геномная сборка сорта ‘Dixie’, полученная двумя различными способами, была проанализирована с помощью BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) (Neto et al., 2015; Seppey et al., 2019). Для анализа двух версий геномной сборки сорта ‘Dixie’ было использовано 1614 последовательностей ортологичных генов из базы данных BUSCO высших растений (*Embryophyta*) *embryophyta_odb* 10.2019-11-20. На рисунке 4 представлены результаты оценки полноты

представленности последовательностей ортологичных генов в сборке, полученной методом *de novo* и гибридным методом.

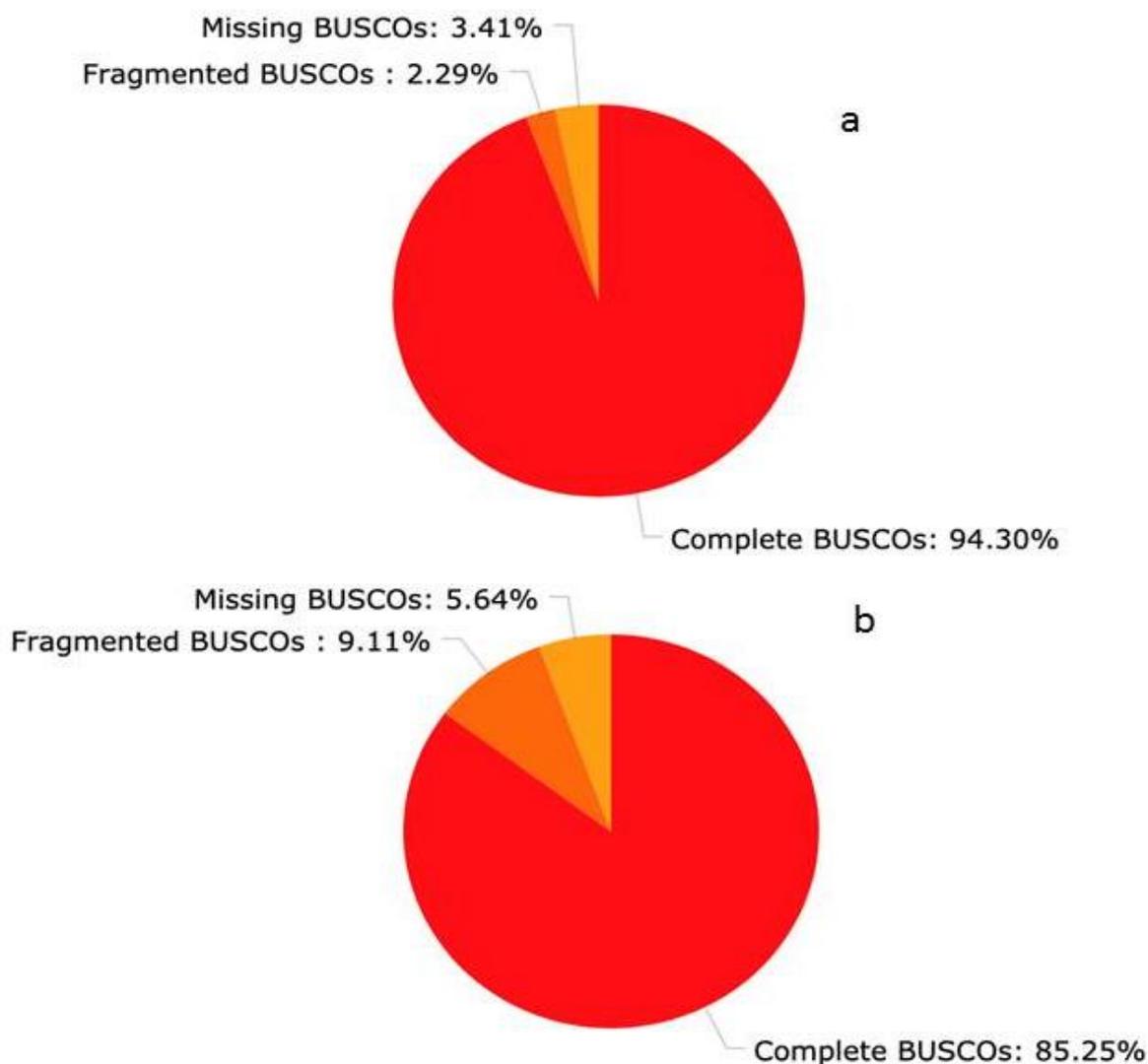


Рисунок 4 – Представленность последовательностей ортологичных генов из базы данных BUSCO высших растений (*Embryophyta*) в сборке генома *V. rotundifolia*, полученной методом *de novo* (a) и гибридным методом (b)

Примечание: красная область – процент ортологичных генов, последовательности которых были найдены полностью (Complete BUSCOs); оранжевая область – процент фрагментированных ортологичных генов (Fragmented); желтая область – 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*.

Предложенная нами сборка генома устойчивого к фитопатогенам образца – сорта ‘Dixie’ может быть также 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 представляло выравнивание полученной сборки на хромосому 12 в геноме *V. vinifera*, где ранее был картирован ген *RUN1/RPV*, ассоциированный с устойчивостью к оидиуму (*RUN1*) и милдью (*RPV1*), а также другие гены устойчивости.

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 сорта ‘Dixie’ и *V. vinifera* участков, 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 млн. п.н. (мегабаз). После этого полученные участки выравнивания гибридной сборки геномов *V. rotundifolia* и *V. vinifera* 12X были сопоставлены с геномом *V. vinifera* 12X. Известно, что хромосома 12 несёт в себе большое количество различий между геномом *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.

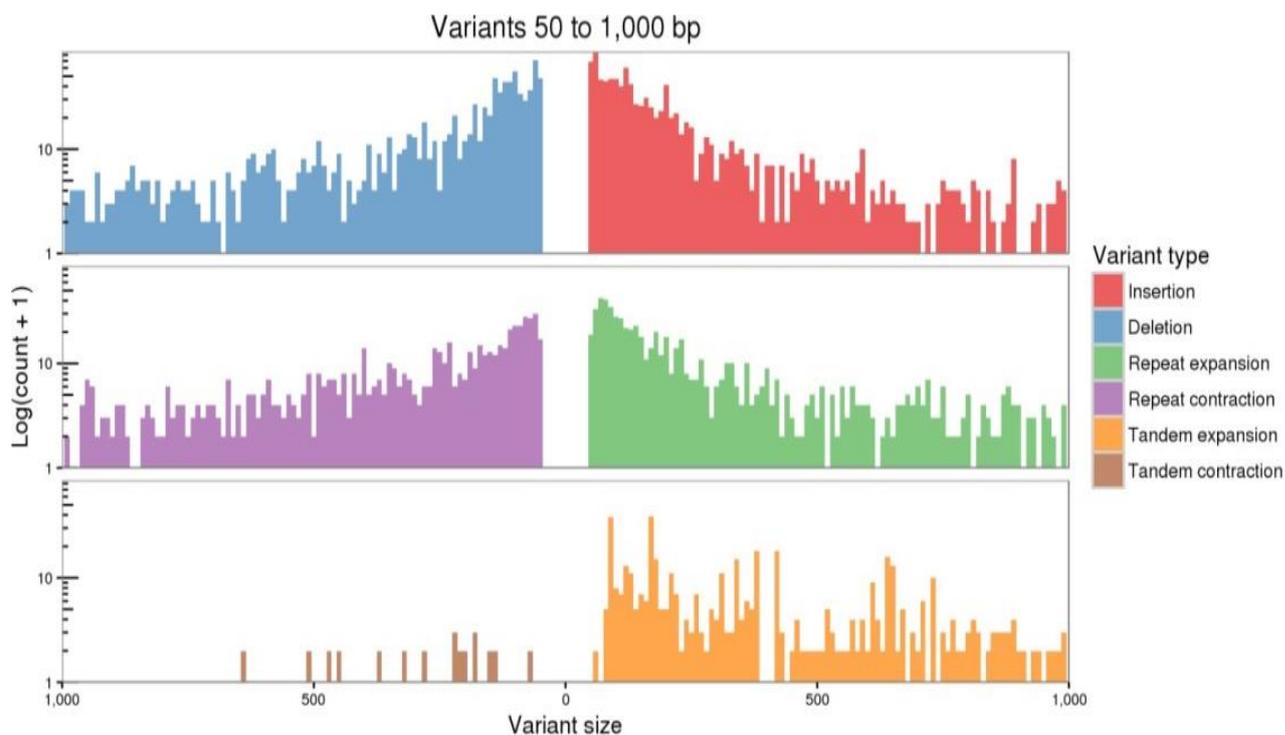


Рисунок 5 – Графическое представление различий между хромосомой 12 сборок *V. rotundifolia* и *V. vinifera*.

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

Всего было получено 4.43 М.п.о сборки, несущих в себе явные различия на 12 хромосоме по сравнению с *V. vinifera* (рисунок 5). Впервые было проведено геномное секвенирование устойчивого к грибным заболеваниям образца вида *V. rotundifolia* – сорта ‘Dixie’, сравнение геномов *V. vinifera* и *V. rotundifolia* и выравнивание полученной сборки на хромосому 12 в геноме *V. vinifera*.

Как известно, что *V. rotundifolia* и *V. vinifera* принадлежат к семейству *Vitaceae* J., 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). Так, *V. vinifera* имеет 19 хромосом ($2n=38$), а *V. rotundifolia* 20 ($2n=40$) (Chu et al., 2018). Хромосома 7 *V. vinifera* является результатом слияния хромосом 7 и 20 *V. rotundifolia*. На рисунке 6 можно увидеть, что хромосома 7 сборки *V. rotundifolia* короче хромосомы *V. vinifera* ~ на 6 т. п.н. и показаны графически различия.

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 Bioproject 649974, 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).

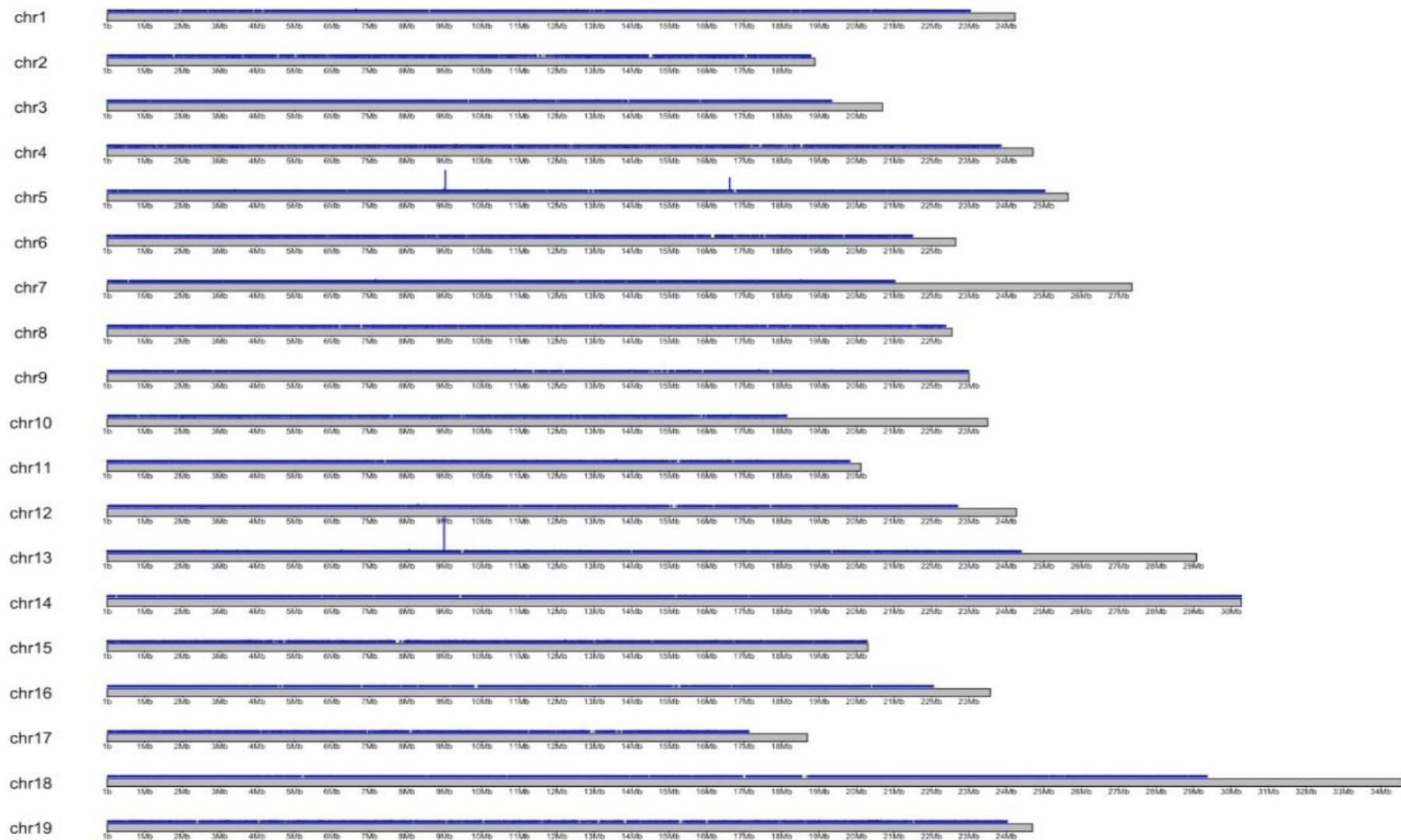


Рисунок 6 – Сборка *V. rotundifolia* выровненная на сборку *V. vinifera*

Примечание: синим цветом представлены регионы выравнивания. Высота пиков означает большее количество регионов в данном месте выравнивания.

Введение в культуру *in vitro*. Для надежного сохранения изученных образцов винограда проводили введение в культуру *in vitro*.

Степень приживаемости апикальных меристем при введении в культуру *in vitro* на питательной среде МС + 1мг/л БАП достигала 70 – 95%. Наибольший процент инфицированности грибной инфекцией наблюдали у сортов ‘Кишмиш мускатный’ (20%), ‘Рислинг’ (15%), ‘Баят Капы’ (15%), ‘Серсиналь’ (10%), ‘Кишмиш Ваткана’ (10%), ‘Бианка’ (10%). Экспланты ‘Чол бер’, ‘Ахтамар’ и ‘Джунга’ (95%, 90%, 85%) показали самый высокий уровень приживаемости. Показатель высоты микрорастений винограда был наибольшим на 30 сут. у сортов ‘Кишмиш мускатный’ (4,1±0,6), ‘Чол бер’ (3,9±1,2), ‘Рислинг’ (3,8±0,8).

Кроме того, была изучена способность к микроразмножению 10 сортов винограда и отмечены достоверные ($p < 0,000$) межсортовые различия по уровню КМР (табл. 8).

Таблица 8 – Коэффициент микроразмножения 10 образцов винограда

№	Образец	Номер по каталогу ВИР	Группа	КМР
1	‘Кишмиш мускатный’	41712	В	4,2±0,2a
2	‘Рислинг’	41824	ЗЕВ	3,9±0,2a
3	‘Чол бер’	41677	В	3,7±0,3a
4	‘Серсиналь’	41852	ГСРА	3,4±0,2a
5	‘Ахтамар’	41758	В	3,3±0,2ac
6	‘Джунга’	41664	В	3,2±0,2ac
7	‘Бианка’	41918	СМКУГ	2,3±0,2bc
8	‘Баят капы’	–	БЧМ	2,1±0,2b
9	‘Семильон’	49415	ЗЕВ	2,0±0,3b
10	‘Кишмиш Ваткана’	41752	В	2,0±0,2b

Примечание: одинаковыми буквами обозначены не различающиеся по критерию Тьюки образцы. Группы сортов по происхождению, согласно А.М. Негрулю: ГСРА – Северо Африканская группа (convar Nord-Africa Gram.), В – Восточная группа (*V. vinifera* convar. *orientalis* Negr.), БЧМ – Бассейн черного моря (*V. vinifera* convar. *pontica* Negr.), ЗЕВ – Западно-Европейская группа (*V. vinifera* convar. *occidentalis* Negr.), ВВГ – Внутривидовые гибриды.

Наибольшим КМР характеризовались образцы ‘Кишмиш мускатный’, ‘Рислинг’, ‘Чол бер’, ‘Серсиналь’ (КМР 3,2 – 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 $\text{КМР} \geq 3,1$ 60% изученной выборки образцов винограда. Остальные образцы требуют более индивидуального подбора состава питательной среды для получения высоких показателей микроразмножения.

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 высоких естественных инфекционных фонах, 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'). Выявлен устойчивый автохтонный сорт 'Кара яй изюм', проявивший устойчивость к обоим грибным заболеваниям во все годы исследования.

Оценка устойчивости к болезням гибридов F_1 винограда, полученных от скрещиваний 'Кара яй изюм' (σ) 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 (σ 'Аг чакракар' \times σ 'Кара яй изюм'), 6 (σ 'Махбор цибил' \times σ 'Кара яй изюм') и скрещивание 8 (σ 'Ири тумут' \times σ '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 ДООС ВИР. Первый кластер объединил 18 образцов, представляющих западноевропейскую эколого-географическую группу сортов винограда (*V. vinifera* convar. *occidentalis* Negr.). Второй кластер включал 28 сортов винограда, относящихся к восточной эколого-географической группе *V. vinifera* convar. *orientalis* Negr. В третий кластер вошли автохтонные сорта Дагестана, представляющие эколого-географическую группу сортов бассейна Черного моря (*V. vinifera* 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 т.п.н., 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 микрклональному размножению образцы винограда различных групп происхождения. Установлено достоверное влияние генотипа на коэффициент микрклонального размножения ($p < 0,05$).

Предложения для селекционной практики

1. Селекционным учреждениям рекомендуется использовать в селекционных программах для создания сортов винограда с разными сроками созревания выделившиеся по результатам изучения сверххранние сорта: 'Грочанка', 'Кишмиш дербентский', 'Жемчуг Саба', 'Лоза Гагарина', 'Тамбовский ранний', 'Шасла мускатная' и очень поздние сорта: 'Джагар', 'Гок кала', 'Молдавский', 'Йорк Мадера', 'Мозак белый', 'Кабассия', 'Суворовец', 'Гегард', 'Рушаки', 'Изабелла', 'Старый горюн', 'Урожайный', 'Кара узюм ашхабадский', 'Виерул-59', 'Рислинг', 'Майский черный', 'Серсиаль', 'Вердо серый', 'Тавлинский поздний', 'Слитной'.

2. Селекционным учреждениям рекомендуется использовать в селекционных программах для создания сортов винограда, устойчивых к грибным болезням, следующие сорта: 'Кара яй изюм', 'Виерул-59', 'Шоколадный', 'Грочанка', 'Ливадийский черный', 'Слава Дербента', 'Йорк Мадера', 'Варюшкин', 'Дунаевски лазур', выделившиеся по устойчивости к милдью и оидиуму.

Перечень работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах из перечня ВАК:

Агаханов М. М., Григорьева Е. А., Потокина Е. К., Ульянич П. С., Ухатова Ю. В. Сборка генома *Vitis rotundifolia* Michx. с использованием методов секвенирования третьего поколения (Oxford Nanopore Technologies) //Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2021. – Т. 182. – №. 2. – С. 63-71. DOI: 10.30901/2227-8834-2021-2-63-71

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. DOI: 10.30901/2227-8834-2018-3-224-234

Прочие издания, в том числе материалы конференций:

NCBI: National Center for Biotechnology Information. Bio-project 649974. *Vitis rotundifolia* cultivar: Dixie. *Vitis rotundifolia* Michx. whole genome sequencing and assembly using nanopore technology (Oxford Nanopore Technologies). Accession: PRJNA649974. Registration date: Nov. 10, 2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/649974> [accessed Dec. 07, 2020].

Григорьева Е. А., **Агаханов М. М.**, Александрова И. В., Волков В. А. Полногеномное секвенирование культурных и дикорастущих форм винограда (*Vitis vinifera* L.) //Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 5. – №. 1. – С. 13-18.

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. DOI: 10.18699/SBB-2020-42

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.

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. DOI: 10.18699/Letters2019-5-2

Агаханов М.М., Ухатова Ю.В. Изучение случайного переопыления гибридов F₁ винограда // Материалы III Международного биотехнологического симпозиума «Био-Азия Алтай 2021». – 2021. – С. 159-160

Агаханов М. М., Волков В. А., Кислин Е. Н. Генетическая структура ампелографической коллекции дагестанской опытной станции ВИР по результатам микросателлитного анализа //VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы. – 2019. – С. 838-838.

Агаханов М. М., Ухатова Ю. В. Изучение влияния регуляторов роста при введении винограда в культуру *in vitro* //125 лет прикладной ботаники в России. – 2019. – С. 67-67. DOI: 10.30901/978-5-907145-39-9

Агаханов М. М., Ульянич П. С. Использование SSR-маркеров в систематике и филогении рода *Vitis* L. //Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии. – 2019. – С. 39-39.

Волков В. А., Григорьева Е. А., **Агаханов М. М.**, Ульянич П. С., Потокина Е. К. Полногеномное секвенирование винограда на платформе MinION и поиск CpG-сайтов метилирования //125 years of Applied Botany in Russia. – 2019. – С. 123-123. DOI: 10.30901/978-5-907145-39-9

Агаханов М. М., Ульянич П. С., Потокина Е. К. Генетическое разнообразие коллекции винограда Дагестанского филиала ВИР по результатам микросателлитного анализа //125 лет прикладной ботаники в России. – 2019. – С. 108-108. DOI:10.30901/978-5-907145-39-9

Тираж