



**Годовой отчет за 2023г.  
лаборатории молекулярно-генетических  
исследований**

**Госзадание № FNZM-2022-0008:** Изучение экологической адаптивности генетических ресурсов местных и автохтонных сортов винограда России и различных сортоформ табака для использования в селекционных и научных программах. Молекулярное маркирование генома винограда семейства Vitaceae Juss.»

**Этап 2023 года:** «Провести молекулярное генотипирование и маркирование сортов и форм винограда Ампелографической коллекции для улучшения технологии идентификации и паспортизации сортов и гибридов»



**Цель** – генотипирование и идентификация генотипов винограда различного происхождения и неидентифицированных образцов ампелографической коллекции «Магарач». Идентификация с помощью маркеров локусов хозяйственно-ценных признаков и резистентности к патогенам и усовершенствование метода ранней диагностики стenosпермокарпической бессемянности для оптимизации селекционных программ.

### Основные задачи:

- провести идентификацию неустановленных форм и бессемянных сортов АК «Магарач» по 9 SSR-маркерам и хлоротипу;
- определить генетическое разнообразие дикорастущих форм винограда Крыма с помощью генотипирования по 12 SSR-маркерам;
- сформировать информационную базу данных ДНК-профилей бессемянных сортов АК «Магарач» на основе результатов генотипирования;
- определить наличие локусов, детерминирующих формирование устойчивости к милдью у генотипов сортов винограда разной степени устойчивости;
- выявить характерный полиморфизм, обуславливающий бессемянность, методом секвенирования кодирующей последовательности гена VvAGL11 у бессемянных и семенных сортов;
- выполнить биоинформатический анализ результатов полногеномного секвенирования нового поколения NGS для поиска полиморфизма, обуславливающего бессемянность.



**Актуальность** – генотипирование позволяет с высокой достоверностью проводить сортовую идентификацию неустановленных образцов винограда и подтверждать сортовую принадлежность содержащихся образцов на АК «Магарач», что актуально для уточнения и расширения сортимента коллекции. Значительный научный интерес представляет изучение генетического разнообразия дикорастущих форм винограда в горном Крыму и местах древних поселений, в связи с возможностью использования их как доноров полезных признаков. Для импортозамещения и продовольственной безопасности РФ актуальной является задача удешевления и оптимизации селекционных программ с помощью усовершенствования МАС для получения новых сортов, обладающих хозяйственно-ценными качествами и устойчивостью к патогенам.

**Научная новизна** – впервые были получены новые знания о генотипах и аллельном полиморфизме микросателлитных маркеров селекционных сортов и дикорастущих форм винограда. Были идентифицированы сорта – доноры локусов, детерминирующих формирование устойчивости к милдью.

Получены новые фундаментальные знания на основе результатов секвенирования по Сэнгеру и биоинформатического анализа полногеномного секвенирования NGS сортов отечественного генофонда о значимости chr18: SNP 26,889,437 для возникновения бессемянности винограда.



# Материалы и методы

Исследования выполнены на базе лаборатории молекулярно-генетических исследований ССЦ.

В исследования были включены:

**Генотипирование:** 8 бессемянных селекционных сортов, 20 неидентифицированных образцов винограда из АК «Магарач», 54 образца дикорастущих форм винограда.

**Идентификация бессемянности:** 23 бессемянных, 15 семенных сортов; 10 гибридных форм F1 популяций (семенной x бессемянный) Флора x Руби Сидлис и Подарок Запорожью x Аленушка.

**Идентификация локусов устойчивости по милдью:** 9 сортов межвидового происхождения и 4 сорта *Vitis vinifera*.

**Использованы методы** мультиплексной ПЦР, фрагментного анализа, секвенирования и биоинформатики:

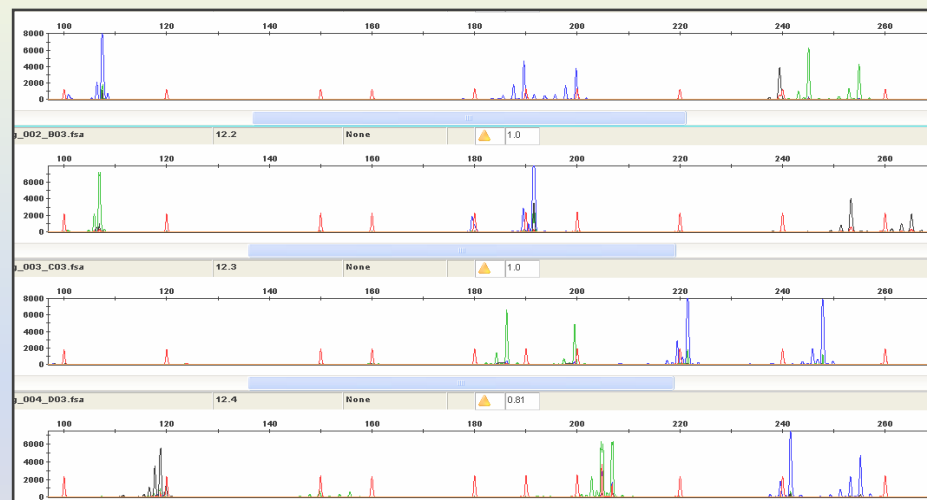
- Генотипирование выполнено по 9 ядерным (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79) и 3 хлоропластным (mp3, mp5, mp10) SSR-маркерам;
- Были использованы праймеры:
  - p3\_VvAGL11, VMC7F2 - сцепленные с локусом SDI, детерминирующим бессемянность;
  - UDV305, UDV737, GF 09-46 - сцепленные с локусами устойчивости к милдью.

Разделение продуктов амплификации методом капиллярного электрофореза и секвенирования по Сенгеру выполнено на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США).

Результаты фрагментного анализа обработаны с помощью ПО «Gene Mapper». Полиморфизм локусов рассчитан на Popgene. Анализ результатов секвенирования проведен в Sequencing Analysis Software и Ugene. Биоинформатический анализ NGS проведен с использованием комплекса консольных программных по триммингу, выравниванию, поиску вариаций и визуализации.

# Идентификация с помощью генотипирования по 12 SSR-маркерам неидентифицированных образцов и бессемянных сортов АК «Магарач»

Установлена сортовая принадлежность по 12-ти из 20-ти неидентифицированных образцов винограда, поддерживаемых на АК «Магарач».



Генетический профиль сорта Кишмиш розовый

# Определение генетического разнообразия дикорастущих форм винограда Крыма с помощью генотипирования по 12 SSR-маркерам

Маркеры	Размеры аллелей	Число аллелей
VVS2	133, 135, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 165	12
VVMD5	220, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 248, 268	13
VVMD7	233, 239, 243, 247, 249, 251, 257, 259, 261, 263, 265	11
VVMD25	237, 239, 241, 247, 249, 251, 255, 257, 259, 261, 265, 267	12
VVMD27	176, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 214	10
VVMD28	216, 228, 234, 236, 244, 246, 248, 252, 254, 258, 264, 266, 268, 270	14
VVMD32	234, 240, 248, 250, 252, 256, 258, 260, 262, 264, 272	11
VrZAG62	186, 188, 194, 196, 200, 202, 204, 216	8
VrZAG79	237, 243, 247, 249, 251, 255, 257, 259	8

Получены генетические профили по 54 дикорастущим образцам Крыма.

По 9 ядерным SSR-маркерам идентифицировано 99 аллелей. Среднее число аллелей на маркер составляет 11.

Установлены аллели с наибольшими частотами встречаемости: VVMD27<sup>190</sup> ( $p = 0.67$ ), VrZAG62<sup>194</sup> ( $p = 0.47$ ), VVMD32<sup>240</sup> ( $p = 0.44$ ). Наибольший полиморфизм длин аллелей отмечен в маркере VVMD28 (13 аллелей), наименьший – в VrZAG62 (7 аллелей). Исследуемые образцы относятся в основном A и D хлоротипам.

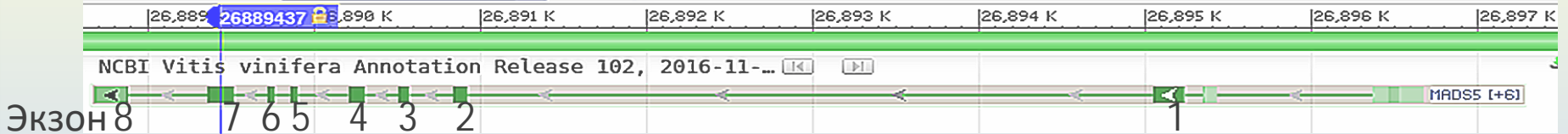
# Дифференциация генотипов сортов винограда разной степени устойчивости на наличие локусов, детерминирующих устойчивость к милдью

У 5 сортов межвидового происхождения (Гранатовый Магарача, Памяти Голодриги, Антей магарачский, Спартанец Магарача, Флора) был выявлен устойчивый к милдью гаплотип локуса  $Rpv3^{299-279}$ . Соответственно у 4-х неустойчивых сортов *Vitis vinifera* устойчивый гаплотип не выявлен.



# Выявление полиморфизма, обуславливающего бесплодность в локусе гена VvAGL11 методом секвенирования I поколения

## Графическое изображение гена VvAGL11 (NCBI)



SNP 26 889 437

Результаты секвенирования по Сэнгеру экзона 7 гена VvAGL11 с выделенным SNP 26 889 437 у бесплодного сорта Кишмиш Магарача (A/C) и семенного - Цитронный Магарача (C/C).



Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия

"МАГАРАЧ" РАН



# Выводы

1. Установлена сортовая принадлежность 12 неидентифицированных форм винограда АК «Магарач»;
2. Сформирована информационная база данных ДНК-профилей 42 бессемянных сортов АК «Магарач»;
3. Определено генетическое разнообразие по 9 nSSR-маркерам и хлоротип 54-х дикорастущих образцов винограда Крыма.
4. У 5 сортов выявлен устойчивый к милдью гаплотип локуса Rpv3.
5. По результатам валидации выделен наиболее эффективный маркер MAC по бессемянности – p3\_VvAGL11.
6. По результатам секвенирования и биоинформатического анализа генотипов 5-ти сортов отечественного генофонда подтверждена ключевая роль chr18: SNP 26,889,437 в формировании бессемянности винограда.



# Публикации

**За отчетный период по теме научной работы опубликовано 8 статей, из них 1 - в Scopus: Quartile Q1; 1 - в Scopus: Quartile Q4).**

1. Dong Y., Duan S., Xia Q., ... Spotar G., ... & Chen W. Dual domestications and origin of traits in grapevine evolution. *Science*. 2023. 379(6635). 892–901. DOI: 10.1126/science.add8655. Scopus: Quartile: Q1.
2. Likhovskoi V.V., Zlenko V.A., Spotar G.Y., Klimenko V.P. Marker-Assisted Selection of Grape Hybrids. *Nanobiotechnology Reports*. 2023. 18(3). 458–461. DOI:10.1134/S2635167622600080. Scopus: Quartile: Q4.
3. Турабекова Д.Б., Алейникова Н.В., Спотарь Г.Ю., Галкина Е.С., Болотянская Е.А., Хужамшукуров Н.А. К изучению видовой и функциональной структуры микробиома винограда в ампелоценозах Республики Узбекистан // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2023; 25 (1):43-50. DOI: 10.34919/IM.2023.25.1.006.
4. Лиховской В.В., Зленко В.А., Спотарь Г.Ю., Клименко В.П. Новые технологии генетической трансформации винограда // Российские нанотехнологии. 2023;18(3):393-396. DOI: 10.56304/S1992722323030068.
5. Лиховской В.В., Спотарь Г.Ю., Студенникова Н.Л., Котоловец З.В., Рыбаченко Н.А. Новая бессемянная форма винограда Партенитский // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2023;25(4): 341-348. DOI: 10.34919/IM.2023.11.40.003.
6. Корнильев Г.В., Рисованная В.И., Полулях А.А., Чижова А.М., Рязанкина Я.Ю. Идентификация сортов винограда ампелографической коллекции «Магарач» с использованием микросателлитных маркеров // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2023;82(4):57-68. DOI: 10.30679/2219-5335-2023-4-82-57-68
7. Корнильев Г.В., Рисованная В.И., Рязанкина Я.Ю. Определение сортовой принадлежности образцов ампелографической коллекции «Магарач» с использованием молекулярных маркеров // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2023;25(3):239-244. DOI: 10.34919/IM.2023.25.3.003
8. Корнильев Г.В., Рисованная В.И., Рязанкина Я.Ю. Диагностика *Agrobacterium* spp. на виноградниках Крыма с использованием молекулярно-генетических методов // Современное состояние и перспективы развития садоводства, виноградарства и питомниководства в Российской Федерации: сборник трудов по материалам Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора, доктора сельскохозяйственных наук Н. М. Куренного. ФГБОУ ВО Ставропольский государственный аграрный университет. 2023:117-121.

## Доклады



Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия  
основан в 1828 г.

МАГАРАЧ

Спотарь Г.Ю. Усовершенствование метода маркер-ассоциированной селекции для оптимизации селекционных программ на стenosпермокарпическую бессемянность винограда (*Vitis L.*) // Международная научно-практическая конференция «Современные тенденции науки, инновационные технологии в виноградарстве и виноделии», г. Ялта. 2023г.

- За счет средств гранта в форме субсидий № 075-15-2021-559 для развития Селекционно-семеноводческого центра
  - для оснащения лаборатории в корпусе №3 **подобрано и закуплено оборудование (57 позиций)**, включая секвенатор III поколения;
  - организовано **3 повышения квалификации** работников, включая стажировку по секвенированию и биоинформатике.
- Подана заявка на Грант РНФ **24-16-00086** «Разработка комплекса тест-систем идентификации аллелей генов хозяйственно-ценных признаков винограда для интенсификации создания новых сортов методами маркер-ассоциированной селекции»;
- **Хоздоговорные тематики 2023г.:**
  - выявление болезней вирусной, бактериальной и фитоплазменной этиологии: 2 договора - **60 000 руб**;
  - идентификация сортовой принадлежности: 11 договоров – **346 880 руб**;

**Всего: 406 880 руб.**





**Спасибо за внимание!!!**



Всероссийский национальный научно-исследовательский  
институт виноградарства и виноделия

**"МАГАРАЧ"** РАН