

УДК 634.84.09: 575.222.72: 575.113

UDC 634.84.09: 575.222.72: 575.113

DOI 10.30679/2219-5335-2020-3-63-1-13

DOI 10.30679/2219-5335-2020-3-63-1-13

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ  
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ  
МЕТОДОВ ДЛЯ СОРТОВОЙ  
ИДЕНТИФИКАЦИИ  
И УСКОРЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ  
ЛАТЕНТНЫХ ФОРМ  
ФИТОПАТОГЕНОВ В РЕШЕНИИ  
ЗАДАЧ ПИТОМНИКОВОДСТВА  
ВИНОГРАДА**

**USE OF MOLECULAR  
GENETIC METHODS  
FOR VARIETAL IDENTIFICATION  
AND ACCELERATED  
DIAGNOSTICS  
OF PHYTOPATHOGENS  
LATENT FORMS  
IN THE PROBLEMS SOLVING  
OF GRAPE NURSERY**

Котляр Виктория Константиновна  
младший научный сотрудник  
лаборатории сортоизучения  
и селекции винограда  
e-mail: [mayyyiva@gmail.com](mailto:mayyyiva@gmail.com)

Kotlyar Victoriya Konstantinovna  
Junior Research Associate  
of Cultivar's Study and Breeding  
of Grapes Laboratory  
e-mail: [mayyyiva@gmail.com](mailto:mayyyiva@gmail.com)

Ильницкая Елена Тарасовна  
канд. биол. наук  
зав. лабораторией сортоизучения  
и селекции винограда  
e-mail: [ilnitskaya79@mail.ru](mailto:ilnitskaya79@mail.ru)

Ilnitskaya Elena Tarasovna  
Cand. Biol. Sci.  
Head of Cultivar's Study and Breeding  
of Grapes Laboratory  
e-mail: [ilnitskaya79@mail.ru](mailto:ilnitskaya79@mail.ru)

Макаркина Марина Викторовна  
младший научный сотрудник  
лаборатории сортоизучения  
и селекции винограда  
e-mail: [konec\\_citatu@mail.ru](mailto:konec_citatu@mail.ru)

Makarkina Marina Victorovna  
Junior Research Associate  
of Cultivar's Study and Breeding  
of Grapes Laboratory  
e-mail: [konec\\_citatu@mail.ru](mailto:konec_citatu@mail.ru)

Лободина Елена Вадимовна  
младший научный сотрудник  
селекционно-биотехнологической  
лаборатории

Lobodina Elena Vadimovna  
Junior Research Associate  
of Breeding and Biotechnology  
Laboratory

*Федеральное государственное  
бюджетное научное учреждение  
«Северо-Кавказский федеральный  
научный центр садоводства,  
виноградарства, виноделия»,  
Краснодар, Россия*

*Federal State Scientific  
Budget Institution  
«North-Caucasian Federal  
Scientific Center of Horticulture,  
Viticulture, Winemaking»,  
Krasnodar, Russia*

Виноград является ценным культурным растением для человека. Его используют в свежем виде, в качестве сырья для соковой, винодельческой и консервной промышленности, перерабатывают на различные виды сушёных изделий. Из общего количества производимого в мире винограда 80-90 % используется

Grapes are a valuable cultural plant for human. It is used fresh, as a raw material for the juice, wine and canning industries, and for the various types of dried products. Of the total number of grapes produced in the world, 80-90 % is used for processing into wines, juices

для переработки на вина, соки и другие продукты, до 10 % винограда потребляется в свежем виде и 5-6% идет на сушку. Промышленное ведение высококачественных виноградных насаждений и питомников невозможно без применения научных знаний, которые позволяют выявить наиболее продуктивные сорта винограда для конкретных агроклиматических зон, определить чистосортность растений, диагностировать фитопатогены в посадочном материале и существующих насаждениях. Одними из самых эффективных методов для решения задач питомниководства являются молекулярно-генетические, которые широко применяются для ДНК-паспортизации, определения происхождения винограда и идентификации патогенов в посадочном материале. ДНК-профилирование позволяет отсеивать мутантные формы на раннем этапе или отбирать их для проведения дальнейших исследований. Диагностика патогенов в маточных насаждениях и посадочном материале включает в себя идентификацию болезнетворных организмов и раннее выявление бессимптомно протекающих заболеваний (вирусов, фитоплазменных инфекций, трахеомикозов, бактериального рака). К методам контроля посадочного материала, которые повсеместно применяются в питомниководстве, можно отнести: иммуноферментный анализ, помещение в маточные насаждения индикаторных растений, метод ПЦР и «глубокое секвенирование». Использование этих методов в питомниководстве позволяет верно идентифицировать сортовую принадлежность материала на ранних этапах, вовремя выявить наличие патогенов и совершить своевременный комплекс защитных мероприятий, что в последующем обеспечит эффективное развитие и высокое качество маточных насаждений.

*Ключевые слова:* ВИНОГРАД, ДНК-ПАСПОРТИЗАЦИЯ, ПАТОГЕНЫ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ, ГЛУБОКОЕ СЕКВИНИРОВАНИЕ

and other products, up to 10 % of the grapes are consumed fresh and 5-6 % goes to drying. Industrial management of high-quality grape plantations and nurseries is impossible without the use of scientific knowledge that allows you to identify the most productive grape varieties for specific agro-climatic zones, determine the purity of plants and the diagnose the phytopathogens in the planting material and existing plantations. One of the most effective methods for solving problems of nursery management is molecular genetic, which are widely used for DNA certification, determining the origin of grapes and for identifying pathogens in the planting material. DNA profiling allows us to screen out mutant forms at an early stage or select them for further research. Diagnostics of pathogens in the uterine plantations and planting material includes the identification of pathogenic organisms and early detection of asymptomatic diseases (viruses, phytoplasmic infections, tracheomycosis, bacterial cancer). Methods of control of planting material, which are widely used in nursery management, include the enzyme immunoanalysis, placement the indicator plants into the uterine plantations, PCR method and «deep sequencing». The use of these methods in the nursery allows to correctly identify the varietal identity of the material on the early stages, to identify the presence of pathogens harmful, and make timely set of protective measures that later will ensure the effective development and high quality of the uterine plants.

*Key words:* GRAPES, DNA-CERTIFICATION, PATHOGENS, IDENTIFICATION, REAL-TIME PCR, DEEP SEQUENCING

**Введение.** Виноград является ценным культурным растением. Его используют в свежем виде, в качестве сырья для соковой, винодельческой и консервной промышленности, перерабатывают на различные виды сушеных изделий [1].

По данным Международной организации винограда и вина (МОВВ), площадь виноградников в мире стабилизировалась на уровне 9,5-10,0 млн. га, а валовое производство винограда неуклонно растет, достигая в последние годы 60-70 млн. т в год. Из общего количества производимого в мире винограда 80-90 % используется для переработки на вина, соки и другие продукты, до 10 % винограда потребляется в свежем виде и 5-6 % идёт на сушку [2].

Промышленное ведение высококачественных виноградных насаждений и питомников невозможно без качественной научно-производственной базы с задачами выявления наиболее продуктивных сортов винограда в конкретных климатических условиях, определения чистосортности материала и диагностики фитопатогенов в маточных насаждениях.

Одними из наиболее эффективных методов для решения задач питомниководства являются молекулярно-генетические методы, которые широко применяются для ДНК-паспортизации (уточнения чистосортности и происхождения винограда) и для идентификации патогенов в посадочном материале, что является очень важным в питомниководстве.

**Обсуждение.** ДНК-маркерные технологии всё шире привлекаются в процесс селекции, полезны они и для целей питомниководства. Базы данных ДНК-маркерного анализа генотипов винограда перспективны для использования в работе питомниководческих и селекционных центров. Так, данные о ДНК-паспортах сортов могут быть успешно использованы для определения чистосортности посадочного материала и соответствия его заявленному сорту [3].

К самым значимым из таких можно отнести международную базу ДНК-паспортов VIVC, созданную немецким Федеральным исследовательским центром культивируемых растений [4]. Это энциклопедическая база данных, содержащая описание около 23000 сортов и линий видов *Vitis*. Данные, содержащиеся в ней, постоянно обновляются.

Использование ДНК-паспортизации для сортовой идентификации обусловлено с одной стороны огромным разнообразием существующих генотипов винограда, с другой – большой физиологической и фенотипической схожестью ряда сортов винограда. Одни сорта являются близкородственными, другие обладают практически аналогичным набором фенотипических признаков, однако могут проявлять разный уровень устойчивости к тем или иным заболеваниям и по-разному показывают себя в одних и тех же климатических условиях. Кроме того, ДНК-профилирование позволяет выявлять мутантные формы на раннем этапе или отбирать их для проведения дальнейших исследований.

Для ДНК-паспортизации и идентификации сортовой принадлежности посадочного материала широко применяются следующие микросателлитные маркеры: VVS2, ZAG62, ZAG 79, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVMD25, VVMD32, определяющие наличие аллелей в исследуемом образце [5-7].

Работы по ДНК-паспортизации широко распространены во многих странах, в том числе и в России. Ярким примером международного сотрудничества может послужить фундаментальная работа, проведенная Университетом Дэвиса в США, Департаментом сельскохозяйственных и экологических наук в Италии, Институтом садоводства, виноградарства и энологии в Грузии, а также хорватскими, азербайджанскими, испанскими и французскими учеными. Результаты их исследований включают в себя около 1378 различных сортов винограда из 12-ти стран мира [8].

Глобальная работа по ДНК-паспортизации была проведена и в Азиатском регионе, в результате которой была представлена молекулярная характеристика 61 китайской виноградной лозы и 33 иностранных сортов, созданная с использованием десяти микросателлитных ДНК-маркеров [9].

В России продолжается работа по ДНК-паспортизации Анапской ампелографической коллекции [10-11] и коллекции института «Магарач» [12].

На базе ФГБНУ СКФНЦСВВ ведутся работы по паспортизации аборигенных (донских, дагестанских, абхазских и т.д.) сортов, а также идентификации из хозяйственно ценных признаков [13-16].

Для питомниководства особое значение имеют методы определения качества посадочного материала и идентификации в нём различных патогенов. Сертифицированный посадочный материал должен быть свободен от бактериального рака, вирусных и фитоплазменных болезней. Молекулярно-генетические методы позволяют совершать диагностику на наличие патогенов в посадочном материале и в маточных насаждениях.

Диагностика патогенов в маточных насаждениях и посадочном материале включают в себя идентификацию болезнетворных организмов и раннее выявление бессимптомно протекающих заболеваний (вирусов, фитоплазменных инфекций, трахеомикозов, бактериального рака).

Пять патогенов являются обязательными при исследовании сертифицированного посадочного материала согласно требованиям, предъявляемым Евросоюзом: GFLV (вирус короткоузлия), ArMV (вирус мозаики), GLRaV-1 и GLRaV-3 (вирус скручивания листьев), GFkV (вирус мраморности – только для подвоя).

Каждая страна может добавить требования по любым дополнительным тестам, которые необходимы на региональном уровне, например: в Италии являются обязательными тесты для GVA (Вирус винограда А), GVB (Вирус винограда В), GLRaV-2 – GLRaV-7 (скручивание листьев).

К карантинным организмам в РФ по винограду, согласно ГОСТу, относятся:

- бактериальное увядание (некроз) (*Xylophilus ampelinus* Willems. et al.);
- золотистое пожелтение винограда (Grapevine flavescence dorée phytoplasma);
- болезнь Пирса (*Xylella fastidiosa*) [17].

К основным методам контроля посадочного материала, которые повсеместно применяются в питомниководстве, можно отнести иммунофер-

ментный анализ (ИФА), метод высадки в маточные насаждения индикаторных растений, метод ПЦР и «глубокое секвенирование».

Метод иммуноферментного анализа является широко распространённым и самым старым из тех, что применяются для идентификации фитопатогенов винограда. Его достоинство заключается в относительной простоте методологии и универсальности. Однако он значительно уступает методу ПЦР в точности [18].

Растения индикаторы могут применяться в питомниководстве винограда для обнаружения фитопатогена не в одном организме, а в целом маточном насаждении. Поскольку виноград является одной из склонных к мутациям культур, под воздействием химических веществ, он склонен к образованию разных веток мутаций. Одна из наиболее распространённых мутаций совмещает в себе карликовость и гиперчувствительность к фитопатогенам [19]. Растения, сочетающие в себе эти признаки, широко используются в роли индикаторов возникновения заражения маточного насаждения.

Метод ПЦР (полимеразной цепной реакции) повсеместно используется в питомниководстве для идентификации патогенов, в том числе и на Юге России [20]. Все большую популярность получает метод ПЦР в реальном времени (real-time PCR) за счет своего удобства и скорости анализа.

Принципиальной особенностью ПЦР в реальном времени является возможность детекции накопления продуктов амплификации непосредственно во время проведения амплификации. Подобный подход позволяет отказаться от стадии электрофореза, что ведет к резкому уменьшению вероятности контаминации исследуемых проб продуктами амплификации, а также позволяет снизить требования, предъявляемые к ПЦР лаборатории, кроме того уменьшается время, требуемое для проведения анализа [21].

Метод ПЦР в реальном времени эффективен для идентификации вирусов, фитоплазменных инфекций, трахеомикозов и бактериального рака, особенно при использовании мультиплексной маркерной системы, так как она позволяет проводить идентификацию при помощи нескольких маркеров сразу.

Для идентификации следующих вирусных заболеваний в посадочном материале разработан широкий спектр специфических ДНК-маркеров: GVA, GVB, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GFLV, GFKV, GRSPaV [22-29].

Для диагностики фитоплазменных инфекций в посадочном материале так же применим метод ПЦР в реальном времени. С его помощью были определены генетические последовательности более чем 9 различных патогенов, разработаны методики и маркеры для их идентификации [30].

ДНК-маркерный анализ используется так же для идентификации бактериального рака в посадочном материале, который вызывается бактериями *Agrobacterium vitis* и некоторыми штаммами *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes* [31]. Этот метод позволяет получить достаточно точный и быстрый результат. Одними из самых изученных являются такие гены как: *virC*, *virD*, *virF*, *pehA*, *23S rRNA* [32-35].

В основном агробактерии безвредны для растения, но в определённых условиях климата, и при наличии в них Ti-плазмид, они приводят к множественным повреждениям растения, образуя опухоли.

Для выявления изолятов, содержащих Ti-плазмиды разных типов, были разработаны тест-системы для детекции генов, определяющих синтез соответствующих опинов (OCTF/OCTR, NOPF/NOPR, VisF/VisR) [36].

В настоящее время работа с подбором маркеров для идентификации возбудителя бактериального рака продолжается, а методы прорабатываются и улучшаются [37].

Помимо ПЦР-диагностики, существуют такие недавно разработанные методы, как «глубокое секвенирование» (Deep Sequencing) и секвенирование нового поколения (Next Generation Sequencing) [38-41].

Эти методы используют для многократного прочтения генетического материала, которое необходимо для ресеквенирования и сборки новых геномов (*de novo*), транскриптомных и эпигеномных исследований. Помимо этого, они позволяют одновременно считывать миллионы и даже миллиарды коротких фрагментов. Такой рост производительности исследований

привел к возможности определения последовательности сразу десятков генов (в зависимости от их размера) за один запуск прибора [42].

Метод глубокого секвенирования успешно используется для идентификации патогенов в различных плодовых культурах, в воде, а также в почве, поскольку позволяет установить не только наличие патогена в исследуемом материале, но и определить его количество.

Основным недостатком метода является необходимость создание определенной инфраструктуры (компьютерная емкость и хранение информации). Требуется высокая квалификация кадрового состава для всестороннего анализа и интерпретации последующих данных.

**Выводы.** Молекулярно-генетические методы заняли прочную позицию в питомниководстве винограда и могут использоваться для разных целей: ДНК-паспортизации сортов, определения различных патогенов в посадочном материале.

Использование этих методов в питомниководстве позволяет верно идентифицировать сортовую принадлежность материала на ранних этапах, вовремя выявить наличие патогенов, губительных для всего маточного насаждения, подготовить и провести своевременный комплекс защитных мероприятий, что в последующем обеспечит эффективное развитие и обеспечит здоровье маточных насаждений.

#### Литература

1. Негруль А.М. Виноградарство //М.: Сельхозиздат, 1952. 426 с.
2. Международная организация вина и виноделия: официальный сайт. URL: <http://www.oiv.int/> (дата обращения: 14.02.2020).
3. Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В., Лободина Е.В. Базы данных анализа ДНК для целей селекции и питомниководства винограда // Научные труды СКФНЦСВВ. Т. 24. Краснодар: СКФНЦСВВ, 2019. С. 32-37. DOI: 10.30679/2587-9847-2019-24-32-37
4. Vitis International Variety Catalogue: официальный сайт. URL: <http://www.vivc.de/> (дата обращения: 14.02.2020).
5. Botta R., Scott N., Eynard I. Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing Vitis vinifera cultivars //Vitis - Journal of Grapevine Research. 2015. Т. 34. №. 2. 99 с.
6. Sefc K.M., Steinkellner H., Wagner H.W. Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevine // Vitis - Journal of Grapevine Research. 1997. Т. 36. С. 179-184.

7. 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. Т. 50. № 3. С. 243-246.
8. Riaz S., De Lorenzis G., Velasco D. Genetic diversity analysis of cultivated and wild grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions around the Mediterranean basin and Central Asia // BMC Plant Biol. 2018. №18. 137 с. DOI: [10.1186/s12870-018-1351-0](https://doi.org/10.1186/s12870-018-1351-0)
9. Li B., Jiang J., Fan X., Zhang Y., Sun H., Zhang G., Liu, C. Molecular characterization of Chinese grape landraces (*Vitis* L.) using microsatellite DNA markers // HortScience, 2017. №52(4). С. 533-540. DOI: 10.21273/HORTSCI11802-17
10. Лукьянов А.А., Большаков В.А., Ильницкая Е.Т. Создание базы данных и ДНК-паспортизация сортов Анапской ампелографической коллекции [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2018. №. 51. С. 49-58. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/18/03/05.pdf> DOI: 10.30679/2219-5335-2018-3-51-50-59 (дата обращения: 14.02.2020)
11. Лукьянов А.А., Никулушкина Г.Е., Коваленко А.Г., Ильницкая, Е.Т. Фенотипирование высококачественных технических сортов винограда селекции АЗОСВиВ в ампелографической коллекции [Электронный ресурс] // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2017. с.134. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/fenotipirovanie-vysokokachestvennyh-tehnicheskikh-sortov-vinograda-selektcii-azosviv-v-ampelograficheskoy-kollektcii> (дата обращения: 14.02.2020)
12. Генотипирование сортов винограда селекции Института «Магарач» на основе анализа аллельного полиморфизма SSR локусов / С.В. Гориславец и др. // Магарач. Виноградарство и виноделие. 2019. №21(4). С. 289-293. DOI 10.35547/IM.2019.21.4.002
13. Генетический полиморфизм редких и малораспространенных аборигенных донских генотипов *Vitis vinifera* L. / Е.Т. Ильницкая и др. // Магарач. Виноградарство и виноделие. 2019. Т. 21. № 3. С. 191-197. DOI 10.35547/IM.2019.21.3.002
14. Характеристика некоторых аборигенных дагестанских сортов винограда методом SSR-анализа и по их основным ампелографическим признакам листьев [Электронный ресурс] / Е.Т. Ильницкая и др. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 6. С. 617-622. URL: <https://vavilov.elpub.ru/jour/article/view/1179> DOI: 10.18699/VJ17.277 (дата обращения: 14.02.2020)
15. ДНК-маркерное изучение генетического потенциала устойчивости к милдью в гибридных формах от *Vitis amurensis* [Электронный ресурс] / Е.Т. Ильницкая и др. // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2020. № 61 (1). С. 44-53. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/20/01/04.pdf> DOI: 10.30679/2219-5335-2020-1-61-44-53 (дата обращения: 14.02.2020)
16. Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В., Токмаков С.В. Уточнение происхождения некоторых сортов винограда отечественной селекции по микросателлитным профилям [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2019. № 59 (5). С. 12-20. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/19/05/02.pdf> DOI: 10.30679/2219-5335-2019-5-59-12-20 (дата обращения: 14.02.2020)
17. ГОСТ Р 53050 – 2008. Материал для размножения винограда (черенки, побеги). Технические условия.
18. Uclés A., García A.V., García M.D.G., Real A.M.A. Benzimidazole and imidazole fungicide analysis in grape and wine samples using a competitive enzymelinked immunosorbent assay // Analytical Methods. 2015. Т. 7. №. 21. С. 9158-9165. DOI: 10.1039/C6AY90015A
19. Boss P.K., Thomas M.R. Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation // Nature. 2002. Т. 416. №. 6883. С. 847-850. DOI: 10.1038/416847a

20. Молекулярная диагностика бактериальных и вирусных фитопатогенов винограда, актуальных для сельского хозяйства Крыма / Е.В. Поротикова и др. // Магарач. Виноградарство и Виноделие. 2015. № 3. с.19
21. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. ПЦР в реальном времени. Учебное пособие. 2011. С. 27-29.
22. Goszczynski D.E., Jooste A.E.C. Identification of divergent variants of Grapevine virus A // European Journal of Plant Pathology. 2003. Т. 109. №. 4. С. 397-403. DOI: 10.1023/A:1023555018700
23. Saldarelli P., Minafra A., Martelli G.P. The nucleotide sequence and genomic organization of grapevine virus B // Journal of General Virology. 1996. Т. 77. №. 10. С. 2645-2652. DOI:10.1099/0022-1317-77-10-2645
24. Naidu R.A. The potential of spectral reflectance technique for the detection of Grapevine leafroll-associated virus-3 in two red-berried wine grape cultivars // Computers and Electronics in Agriculture. 2009. Т. 66. №. 1. С. 38-45. DOI: 10.1016/j.compag.2008.11.007.
25. Bertazzon N., Angelini E. Advances in the detection of Grapevine leafroll-associated virus 2 variants [Электронный ресурс] // Journal of Plant Pathology. 2004. С. 283-290. URL: [www.jstor.org/stable/41998982](http://www.jstor.org/stable/41998982) (дата обращения: 14.02.2020)
26. Cabaleiro C., Segura A. Field transmission of grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus citri* // Plant Disease. 1997. Т. 81. №. 3. С. 283-287. DOI: 10.1094/PDIS.1997.81.3.283
27. Rowhani A., Rowhani A., Chay C., Golino D.A., Falk B.W. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue // Phytopathology. 1993. Т. 83. №. 7. С. 749-758.
28. Sabanadzovic S., Abou-Ghanem N., Castellano M.A. Grapevine fleck virus-like viruses in *Vitis* // Archives of virology. 2000. Т. 145. №. 3. С. 553-565. DOI: 10.1007/s007050050046
29. Minafra A., Casati P., Elicio V. Serological detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPa V) by a polyclonal antiserum to recombinant virus coat protein // VITIS-Journal of Grapevine Research. 2015. Т. 39. №. 3. С. 115.
30. Angelini E., Bianchi G.L, Filippin L., Morassutti C. A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay // Journal of Microbiological methods. 2007. Т. 68. №. 3. С. 613-622. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.11.015
31. Kerr A., Panagopoulos C.G. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control // Phytopathology. 1977. №. 90. С. 172-179.
32. Johnson K.L., Zheng D., Kaewnum S., Reid C.L. Development of a magnetic capture hybridization real-time PCR assay for detection of tumorigenic *Agrobacterium vitis* in grapevines // Phytopathology. 2013. Т. 103. №. 6. С. 633-640.
33. Makarkina M.V., Pnitskaya E.T., Stepanov I.V. Identification of agrobacteria on grape plants with symptoms of crown gall lesions in ampelocenoses of Krasnodar Territory using the PCR method // Russian agricultural sciences. 2017. Т. 43. №. 5. С. 402-405. DOI: 10.3103/S106836741705010X
34. Eastwell K.C., Kenneth C., Leslie Willis G., Cavileer D.T. A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction // Plant Disease. 1995, №. 79(8). С. 822-827. DOI: 10.1094 / PD-79-0822
35. Bini F., Geider K., Bazzi C. Detection of *Agrobacterium vitis* by PCR using novel *virD2* gene-specific primers that discriminate two subgroups // European journal of plant pathology. 2008. №. 122(3). С. 403-411. DOI: 10.1007/s10658-008-9307-0
36. Canaday J., Gerard J.C., Crouzet P., Otten L. Organization and functional analysis of three T-DNAs from the vitopine Ti plasmid pTiS4 // Mol. Gen. Genet. 1992. №. 235. С. 292-303. DOI: 10.1007/BF00279373

37. Szegedi E., Bottka S. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium // *Vitis*. 2002. №. 41(1). с. 37-42.

38. Ramírez F., Dündar F., Diehl S., Grüning B.A., Manke T. DeepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data // *Nucleic acids research*. 2014. №. 42(1). C. 187-191. DOI: 10.1093/nar/gku365

39. Tennessen J.A., Bigham A.W., O'Connor T.D., Fu W., Kenny E.E., Gravel S., Kang H.M. Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes // *Science*. 2012. №. 337(6090) C. 64-69. DOI: 10.1126 / science.1219240

40. Malone J.H., Oliver B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome // *BMC biology*. 2011. T. 9. №. 1. C. 34. DOI: 10.1186/1741-7007-9-34

41. Zhang B., Jiang X., Zhang F., Wang T. Identification of *Plasmopara viticola* Responsive microRNAs in Grapevine by Deep-Sequencing // *International Journal of Agriculture and biology*. 2019. T. 22. №. 4. C. 801-807. DOI: 10.17957/IJAB/15.1133

42. Tirumalai V., Swetha C., Nair A., Pandit A. miR828 and miR858 regulate VvMYB114 to promote anthocyanin and flavonol accumulation in grapes // *Journal of experimental botany*. 2019. T. 70. №. 18. C. 4775-4792. DOI: 10.1093/jxb/erz264

### References

1. Negrul' A.M. *Vinogradarstvo* //M.: Sel'hozizdat, 1952. 426 s.
2. Mezhdunarodnaya organizaciya vina i vinodeliya: oficial'nyj sajt. URL: <http://www.oiv.int/> (data obrashcheniya: 14.02.2020).
3. Il'nickaya E.T., Makarkina M.V., Lobodina E.V. Bazy dannyh analiza DNK dlya celej selekcii i pitomnikovodstva vinograda // *Nauchnye trudy SKFNCSVV*. T. 24. Krvsnodar: SKFNCSVV, 2019. S. 32-37. DOI: 10.30679/2587-9847-2019-24-32-37
4. *Vitis International Variety Catalogue*: oficial'nyj sajt. URL: <http://www.vivc.de/> (data obrashcheniya: 14.02.2020).
5. Botta R., Scott N., Eynard I. Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing *Vitis vinifera* cultivars // *Vitis - Journal of Grapevine Research*. 2015. T. 34. №. 2. 99 c.
6. Sefc K.M., Steinkellner H., Wagner H.W. Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevine // *Vitis - Journal of Grapevine Research*. 1997. T. 36. S. 179-184.
7. 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. S. 243-246.
8. Riaz S., De Lorenzis G., Velasco D. Genetic diversity analysis of cultivated and wild grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions around the Mediterranean basin and Central Asia // *BMC Plant Biol*. 2018. №18. 137 s. DOI: 10.1186/s12870-018-1351-0
9. Li B., Jiang J., Fan X., Zhang Y., Sun H., Zhang G., Liu, C. Molecular characterization of Chinese grape landraces (*Vitis* L.) using microsatellite DNA markers // *Hort Science*, 2017. №52(4). S. 533-540. DOI: 10.21273/HORTSCII1802-17
10. Luk'yanov A.A., Bol'shakov V.A., Il'nickaya E.T. Sozdanie bazy dannyh i DNK-pasportizaciya sortov Anapskoj ampelograficheskoj kollekcii [Elektronnyj resurs] // *Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii*. 2018. №. 51. S. 49-58. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/18/03/05.pdf> DOI: 10.30679/2219-5335-2018-3-51-50-59 (data obrashcheniya: 14.02.2020)
11. Luk'yanov A.A., Nikulushkina G.E., Kovalenko A.G., Il'nickaya, E.T. Fenotipirovanie vysokokachestvennyh tekhnicheskikh sortov vinograda selekcii AZOSViV v ampelograficheskoj kollekcii [Elektronnyj resurs] // *Politematicheskij setevoj elektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2017. c. 134. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/fenotipirovanie-vyskokachestvennyh-tehnicheskikh-sortov-vinograda-selekcii-azosviv-v-ampelograficheskoj-kollekcii> (data obrashcheniya: 14.02.2020)

12. Genotipirovanie sortov vinograda selekcii Instituta «Magarach» na osnove analiza allel'nogo polimorfizma SSR lokusov / S.V. Gorislavec i dr. // Magarach. Vinogradarstvo i vinodelie. 2019. №21 (4). С. 289-293. DOI 10.35547/IM.2019.21.4.002

13. Geneticheskij polimorfizm redkih i malorasprostranennyh aborigennyh donskih genotipov *Vitis vinifera* L. / E.T. Il'nickaya i dr. // Magarach. Vinogradarstvo i vinodelie. 2019. Т. 21. № 3. S. 191-197. DOI 10.35547/IM.2019.21.3.002

14. Harakteristika nekotoryh aborigennyh dagestanskih sortov vinograda metodom SSR-analiza i po ih osnovnym ampelograficheskim priznakam list'ev [Elektronnyj resurs] / E.T. Il'nickaya i dr. // Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii. 2017. Т. 21. № 6. S. 617-622. URL: <https://vavilov.elpub.ru/jour/article/view/1179> DOI: 10.18699/VJ17.277 (data obrashcheniya: 14.02.2020)

15. DNK-markernoe izuchenie geneticheskogo potenciala ustojchivosti k mild'yu v gibridnyh formah ot *Vitis amurensis* [Elektronnyj resurs] / E.T. Il'nickaya i dr. // Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii. 2020. № 61 (1). S. 44-53. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/20/01/04.pdf> DOI: 10.30679/2219-5335-2020-1-61-44-53 (data obrashcheniya: 14.02.2020)

16. Il'nickaya E.T., Makarkina M.V., Tokmakov S.V. Utochnenie proiskhozhdeniya nekotryh sotov vinograda otechestvennoj selekcii po mikrosatellitnym profilyam [Elektronnyj resurs] // Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii. 2019. № 59 (5). S. 12-20. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/19/05/02.pdf> DOI: 10.30679/2219-5335-2019-5-59-12-20 (data obrashcheniya: 14.02.2020)

17. GOST R 53050 – 2008. Material dlya razmnozheniya vinograda (cherenki, pobegi). Tekhnicheskie usloviya.

18. Uclés A., García A.V., García M.D.G., Real A.M.A. Benzimidazole and imidazole fungicide analysis in grape and wine samples using a competitive enzymelinked immunosorbent assay // Analytical Methods. 2015. Т. 7. №. 21. S. 9158-9165. DOI: 10.1039/C6AY90015A

19. Boss P.K., Thomas M.R. Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation // Nature. 2002. Т. 416. №. 6883. S. 847-850. DOI: 10.1038/416847a

20. Molekulyarnaya diagnostika bakterial'nyh i virusnyh fitopatogenov vinograda, aktual'nyh dlya sel'skogo hozyajstva Kryma / E.V. Porotikova i dr. // Magarach. Vinogradarstvo i Vinodelie. 2015. № 3. s.19

21. Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu. PCR v real'nom vremeni. Uchebnoe posobie. 2011. С. 27-29.

22. Goszczynski D.E., Jooste A.E.C. Identification of divergent variants of Grapevine virus A // European Journal of Plant Pathology. 2003. Т. 109. №. 4. S. 397-403. DOI: 10.1023/A:1023555018700

23. Saldarelli P., Minafra A., Martelli G.P. The nucleotide sequence and genomic organization of grapevine virus B // Journal of General Virology. 1996. Т. 77. №. 10. S. 2645-2652. DOI:10.1099/0022-1317-77-10-2645

24. Naidu R.A. The potential of spectral reflectance technique for the detection of Grapevine leafroll-associated virus-3 in two red-berried wine grape cultivars // Computers and Electronics in Agriculture. 2009. Т. 66. №. 1. S. 38-45. DOI: 10.1016/j.compag.2008.11.007.

25. Bertazon N., Angelini E. Advances in the detection of Grapevine leafroll-associated virus 2 variants [Elektronnyj resurs] // Journal of Plant Pathology. 2004. S. 283-290. URL: [www.jstor.org/stable/41998982](http://www.jstor.org/stable/41998982) (data obrashcheniya: 14.02.2020).

26. Cabaleiro C., Segura A. Field transmission of grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus citri* // Plant Disease. 1997. Т. 81. №. 3. S. 283-287. DOI: 10.1094/PDIS.1997.81.3.283

27. Rowhani A., Rowhani A., Chay C., Golino D.A., Falk B.W. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue // *Phytopathology*. 1993. T. 83. №. 7. S. 749-758.
28. Sabanadzovic S., Abou-Ghanem N., Castellano M.A. Grapevine fleck virus-like viruses in *Vitis* // *Archives of virology*. 2000. T. 145. №. 3. S. 553-565. DOI: 10.1007/s007050050046
29. Minafra A., Casati P., Elicio V. Serological detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPa V) by a polyclonal antiserum to recombinant virus coat protein // *VITIS-Journal of Grapevine Research*. 2015. T. 39. №. 3. S. 115.
30. Angelini E., Bianchi G.L, Filippin L., Morassutti C. A new Taq-Man method for the identification of phytoplasmas associated with grape-vine yellows by real-time PCR assay // *Journal of Microbiological methods*. 2007. T. 68. №. 3. S. 613-622. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.11.015
31. Kerr A., Panagopoulos C.G. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control // *Phytopathology*. 1977. №. 90. S. 172-179.
32. Johnson K.L., Zheng D., Kaewnum S., Reid C.L. Development of a magnetic capture hybridization real-time PCR assay for detection of tumorigenic *Agrobacterium vitis* in grapevines // *Phytopathology*. 2013. T. 103. №. 6. S. 633-640.
33. Makarkina M.V., Ilitskaya E.T., Stepanov I.V. Identification of agrobacteria on grape plants with symptoms of crown gall lesions in ampelocenoses of Krasnodar Territory using the PCR method // *Russian agricultural sciences*. 2017. T. 43. №. 5. S. 402-405. DOI: 10.3103/S106836741705010X
34. Eastwell K.C., Kenneth C., Leslie Willis G., Cavileer D.T. A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction // *Plant Disease*. 1995, №. 79(8). S. 822-827. DOI: 10.1094 / PD-79-0822
35. Bini F., Geider K., Bazzi C. Detection of *Agrobacterium vitis* by PCR using novel virD2 gene-specific primers that discriminate two sub-groups // *European journal of plant pathology*. 2008. №. 122(3). S. 403-411. DOI: 10.1007/s10658-008-9307-0
36. Canaday J., Gerard J.C., Crouzet P., Otten L. Organization and functional analysis of three T-DNAs from the vitopine Ti plasmid pTiS4 // *Mol. Gen. Genet*. 1992. №. 235. C. 292-303. DOI: 10.1007/BF00279373
37. Szegedi E., Bottka S. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium // *Vitis*. 2002. №. 41(1). s. 37-42.
38. Ramírez F., Dündar F., Diehl S., Grüning B.A., Manke T. Deep-Tools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data // *Nucleic acids research*. 2014. №. 42(1). S. 187-191. DOI: 10.1093/nar/gku365
39. Tennessen J.A., Bigham A.W., O'Connor T.D., Fu W., Kenny E.E., Gravel S., Kang H.M. Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes // *Science*. 2012. №. 337(6090) S. 64-69. DOI: 10.1126 / science.1219240
40. Malone J.H., Oliver B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome // *BMC biology*. 2011. T. 9. №. 1. S. 34. DOI: 10.1186/1741-7007-9-34
41. Zhang B., Jiang X., Zhang F., Wang T. Identification of Plasmopara viticola Responsive microRNAs in Grapevine by Deep-Sequencing // *International Journal of Agriculture and biology*. 2019. T. 22. №. 4. S. 801-807. DOI: 10.17957/IJAB/15.1133
42. Tirumalai V., Swetha C., Nair A., Pandit A. miR828 and miR858 regulate VvMYB114 to promote anthocyanin and flavonol accumulation in grapes // *Journal of experimental botany*. 2019. T. 70. №. 18. S. 4775-4792. DOI: 10.1093/jxb/erz264