DOI: https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-2-180-187

Поступила 16.03.2023
Поступила после рецензирования 21.05.2023
Принята в печать 23.05.2023
© Вафин Р. Р., Михайлова И. Ю., Агейкина И. И., 2023

https://www.fsjour.com/jour
Научная статья
Open access

ИДЕНТИФИКАЦИЯ *UFGT*-ГЕН-АССОЦИИРОВАННЫХ ГРУПП *VITIS VINIFERA* L. РАЗРАБОТАННЫМ СПОСОБОМ ПЦР-ПДРФ-ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИНОГРАДА

Вафин Р. Р.,* Михайлова И. Ю., Агейкина И. И.

Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности, Москва, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:
Vitis vinifera L., виноград, UFGT, ген, ДНК, ПЦР, ПДРФ, электрофорез, SNP, идентификация

АННОТАЦИЯ

Ген *UFGT Vitis vinifera* L. является одним из диагностически значимых для генотестирования технических сортов винограда, а также производимых из них виноматериалов и вин. Ранее отработанная нами стратегия геноидентификации сортов винограда и ДНК-аутентификации виноматериалов на основе прямого секвенирования специфичного ПЦР-продукта длиной 99 bp дала импульс к прогнозной оценке применимости ПЦР-ПДРФ-анализа для детекции 5 диагностически значимых полиморфных позиций и последующей идентификации 13 *UFGT*-ген-ассоциированных групп *Vitis vinifera* L. Цель работы заключалась в идентификации *UFGT*-ген-ассоциированных групп *Vitis vinifera* L. детекцией диагностически значимых полиморфных позиций разработанным способом ПЦР-ПДРФ-генотипирования винограда. Объектами исследований послужили 24 образца технических сортов винограда, пробоподготовку которых проводили извлечением 50–100 мг мякоти зрелого плода или косточки с ее механическим измельчением в ступке и помещением в пробирку типа Эппендорф. Далее проводилось выделение нуклеиновых кислот при помощи коммерческих наборов innuPREP Plant DNA Kit или DiamondDNA Plant kit. Постановку ПЦР-ПДРФ с экстрагированной ДНК винограда осуществляли набором Phire Plant Direct PCR Master Mix и 4 подобранными рестриктазами (*Pst*I, *BsaX*I, *BtsIMutI* и *HinfI*) в соответствии с протоколами, представленными в материалах публикации. Детекцию ПЦР-ПДРФ-фрагментов выполняли визуализацией электрофореграмм в УФ-трансиллюминаторе после горизонтального электрофореза в 2,5% агарозном геле с окрашенным ТАЕ-буфером. Способ ПЦР-ПДРФ-генотипирования винограда, специально разработанный для идентификации *UFGT*-ген-ассоциированных групп *Vitis vinifera* L. детекцией диагностически значимых полиморфных позиций, продемонстрировал работоспособность при тестировании 24 образцов технических сортов винограда. При этом положительный результат был достигнут благодаря практической способности каждой из четырех подобранных рестриктаз дискриминировать строго определенную полиморфную позицию, генерируя характерные ПЦР-ПДРФ-профили тринадцати *UFGT*-ген-ассоциированных групп, семь из которых выявлено в ходе настоящего исследования. Таким образом, в результате проведенной работы установлена генотипическая принадлежность целого ряда протестированных сортов винограда: шесть образцов были идентифицированы как представители *UFGT*-ген-ассоциированной группы № 1; один образец относился к ген-ассоциированной группе № 2; два образца характеризовались признаком ассоциированной группы № 3; четыре образца принадлежали к группе № 4; один образец — к группе № 5; шесть образцов — к группе № 13.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию № FGUS-2022–0012 Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук.

БЛАГОДАРНОСТЬ: Авторы статьи выражают благодарность заведующей отделом технологии вина ВНИИПБиВП — филиала ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, кандидату технических наук Кузьминой Елене Ивановне за предоставленные образцы технических сортов винограда.

Received 16.03.2023
Accepted in revised 21.05.2023
Accepted for publication 23.05.2023
© Vafin R. R., Mikhailova I. M., Ageykina I. I., 2023

Available online at https://www.fsjour.com/jour
Original scientific article
Open access

IDENTIFICATION OF *UFGT*-GENE-ASSOCIATED GROUPS OF *VITIS VINIFERA* L. BY THE DEVELOPED METHOD OF PCR-RFLP GENOTYPING OF GRAPE

Ramil R. Vafin,* Irina Y. Mikhailova, Irina I. Ageykina

All-Russian Scientific Research Institute of Brewing, Beverage and Wine Industry, Moscow, Russia

KEY WORDS:
Vitis vinifera L., grape, UFGT, gene, DNA, PCR, RFLP, electrophoresis, SNP, identification

ABSTRACT

The *Vitis vinifera* L. *UFGT* gene is one of the diagnostically significant genes for genetic testing of technical grape varieties as well as wine materials and wines produced from them. The strategy for genetic identification of grape varieties and DNA authentication of wine materials that was previously developed by us and is based on direct sequencing of the specific PCR product with a length of 99 bp gave an impulse to prognostic assessment of feasibility

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: **Вафин, Р. Р., Михайлова, И. Ю., Агейкина, И. И.** (2023). Идентификация *UFGT*-ген-ассоциированных групп *Vitis vinifera* L. разработанным способом ПЦР-ПДРФ-генотипирования винограда. *Пищевые системы*, 6(2), 180-187. https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-2-180-187

FOR CITATION: **Vafin, R. R., Mikhailova, I. M., Ageykina, I. I.** (2023). Identification of *UFGT*-gene-associated groups of *Vitis vinifera* L. by the developed method of PCR-RFLP genotyping of grape. *Food Systems*, 6(2), 180-187. https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-2-180-187

of PCR-RFLP analysis for detection of five diagnostically significant polymorphic positions and the following identification of 13 *UFGT* gene-associated groups of *Vitis vinifera* L. The aim of this work consisted in identification of *UFGT* gene-associated groups of *Vitis vinifera* L. by detection of diagnostically significant polymorphic positions using the developed PCR-RFLP method for genotyping of grape. Objects of research were 24 samples of technical grape varieties. Their sample preparation was carried out by extracting 50–100 mg of mature grape pulp or stone with its mechanical comminution in a mortar and transfer to an Eppendorf-type tube. Then, nucleic acids were extracted using a commercial innuPREP Plant DNA Kit or DiamondDNA Plant kit. PCR-RFLP with the extracted grape DNA was performed with Phire Plant Direct PCR Master Mix and four selected restrictases (*Pst*I, *BsaX*I, *BtsIMutI* and *HinfI*) according to the protocols presented in the paper. The detection of the PCR-RFLP fragments was performed by visualization of electropherograms in a UV transilluminator after horizontal electrophoresis in 2.5% agarose gel with stained TAE buffer. The method for PCR-RFLP genotyping of grapes developed specially for identification of *UFGT* gene-associated groups of *Vitis vinifera* L. by detecting diagnostically significant polymorphic positions demonstrated its feasibility when testing 24 samples of technical grape varieties. With that, the positive result was achieved due to the practical ability of each of four selected restrictases to discriminate the strictly specified polymorphic position generating characteristic PCR-RFLP profiles of 13 *UFGT* gene-associated groups of *Vitis vinifera* L., seven of which were revealed during this study. Therefore, as a result of the performed study, the genotypic affiliation of several tested grape varieties was established: six samples were identified as representatives of the *UFGT* gene-associated group No.1; one sample was assigned to gene-associated group No.2; two samples were characterized by the trait of associated group No.3; four samples belonged to group No. 4; one sample to group No. 5; six samples to group No.13.

FUNDING: The article was published as part of the research topic № FGUS-2022–0012 of the state assignment of the V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of RAS.

ACKNOWLEDGMENT: The authors of the article express gratitude to the head of the wine technology department of VNIIPBiVP — Branch of Gorbatov Research Center for Food Systems, candidate of technical sciences Elena Ivanovna Kuzmina for providing samples of technical grape varieties.

1. Введение

Ген *UFGT Vitis vinifera* L. (UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase — уридиндифосфат-глюкоза: флавоноид 3-О-глюкозилтрансфераза) [1] является одним из диагностически значимых для генотестирования технических сортов винограда [2,3], а также производимых из них виноматериалов и вин [4,5]. При этом ДНК-анализ более протяженного локуса данного гена длиной 705 нуклеотидов может позволить идентифицировать не менее 21 *UFGT*-ген-ассоциированной группы винограда-сырья благодаря интерпретации детектируемых методом секвенирования 34 полиморфных позиций (33 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms, однонуклеотидные полиморфизмы) и 1 INDEL (INsertion/DELetion, инсерция/делеция) [3,6]. Тогда как анализ локуса меньшей длины (от 119 до 99 нуклеотидов) всего с 5 полиморфными позициями (4 SNPs и 1 INDEL) способен дискриминировать лишь 13 *UFGT*-ген-ассоциированных групп *Vitis vinifera* L. [6], но с потенциалом ДНК-аутентификации виноматериалов и вин [4,5].

Нацеливание на локус меньшей длины продиктовано сильной фрагментацией остаточной ДНК винограда, выделяемой из винного дебриса. Причем ее деградация и снижение концентрации происходит как в процессе винификации, так и при хранении уже готового продукта [7,8]. При этом доподлинно известно, что по мере старения вина уменьшается и выход экстрагируемой нуклеиновой кислоты *Vitis vinifera* L. [9,10].

Ранее отработанная нами стратегия геноидентификации сортов винограда и ДНК-аутентификации виноматериалов на основе прямого секвенирования специфичного ПЦР-продукта длиной 99 bp была реализована через интерпретацию детектируемых полиморфных позиций вариабельного локуса *UFGT*-гена *Vitis vinifera* L. [5]. Данная стратегия дала импульс к прогнозной оценке применимости ПЦР-ПДРФ-анализа (полимеразная цепная реакция — полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) для детекции 5 диагностически значимых полиморфных позиций и последующей идентификации 13 *UFGT*-ген-ассоциированных групп *Vitis vinifera* L. при тестировании сортового многообразия винограда, а также производимого из него виноматериала [11].

Если при генотестировании технических сортов винограда пробоподготовка преимущественно сводится к извлечению мякоти плода с последующим помещением отобранного материала в пробирку, то для пробоподготовки виноматериалов и вин потребуется центрифужная преципитация дебриса с применением осадителей и соосадителей [5]. Известны различные способы пробоподготовки, предусматривающие предварительную экспозицию вина в смеси подобранных реагентов в морозильной камере (–20 °С) в течение 1–2 недель [12,13], краткосрочную выдержку при комнатной температуре [14], а также ночную или трехсуточную экспозицию при –20 °С или –80 °С соответственно [15,16].

Наиболее распространенными подходами к выделению ДНК из мякоти плода винограда или из осажденного винного дебриса являются способы, построенные на модификации общеизвестного CTAB-метода [8]. К базовому перечню CTAB-модифицированных способов экстракции нуклеиновых кислот *Vitis vinifera* L. из виноматериалов и вин можно отнести условно именные технические приемы Siret [17], Savazzini & Martinelli [12], Pereira [13] и Bigliazzi [15], имеющие сходные и отличительные признаки. Также известно об использовании для выделения ДНК целого ряда коммерческих наборов: DNeasy Plant Mini Kit и QIAprep Spin Miniprep Kit производства Qiagen [18,19], а также QuickExtract Seed DNA Extraction Solution (Epicentre Biotechnologies) и NucleoSpin Food (Macherey-Nagel) [20,21].

Актуальность проводимой научной работы продиктована необходимостью расширения арсенала методологических подходов к геноидентификации технических сортов винограда, потенциально пригодных для ДНК-аутентификации виноматериалов. Научная новизна выражена в применении ПЦР-ПДРФ-анализа по локусу *UFGT*-гена *Vitis vinifera* L. для установления генотипической принадлежности тестируемых образцов винограда.

Цель настоящего исследования — идентификация *UFGT*-ген-ассоциированных групп *Vitis vinifera* L. детекцией диагностически значимых полиморфных позиций разработанным способом ПЦР-ПДРФ-генотипирования винограда.

2. Объекты и методы

Исследования проводили в Межотраслевом научно-техническом центре мониторинга качества пищевых продуктов Всероссийского научно-исследовательского института пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности — филиала ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН.

Таблица 1. **ПЦР-ПДРФ-протоколы амплификации локуса *UFGT*-гена *Vitis vinifera* L. с праймерами UFGT-F1 и UFGT-R2 и последующих эндонуклеазных расщеплений**

Table 1. **PCR-RFLP protocols for amplification of the *Vitis vinifera* L. *UFGT* gene locus with primers UFGT-F1 and UFGT-R2, and the following endonuclease cleavage**

ПЦР-протокол												
Реагенты				**Исходная концентрация**				**Рабочая концентрация**				**1 проба (мкл)**	**5 проб (мкл)**	**10 проб (мкл)**
H_2O												18	90	180
2X Phire Plant Direct PCR Master Mix				2×				1×				25	125	250
UFGT-F1				50 мкМ				1 мкМ				1	5	10
UFGT-R2				50 мкМ				1 мкМ				1	5	10
Проба ДНК												5		
ВСЕГО												50		
Последовательности олигонуклеотидных праймеров: UFGT-F1: 5′-CTTGGCTGCCGTTTTGGA-3′ (18 н.) UFGT-R2: 5′-AGGTAAAACCACCTGAGACT-3′ (20 н.)														
Режим термоциклирования (Терцик, Россия): ×1: 98 °C — 5 мин.; ×40: 98 °C — 10 сек, 58 °C — 10 сек, 72 °C — 10 сек. ×1: 72 °C — 1 мин.														
ПДРФ-протоколы														
Реагенты				**Исходная концентрация**				**Рабочая концентрация**				**1 проба (мкл)**	**5 проб (мкл)**	**10 проб (мкл)**
dH_2O												7,5	37,5	75
rCutSmart™ Buffer				10×				1×				2	10	20
*Pst*I	*BsaX*I	*BtsIMut*I	*Hinf*I	20U	2U	1U	10U	10U	1U	0,5U	5U	0,5	2,5	5
ПЦР-проба												10		
ИТОГО												20		
Температура и время инкубирования:								37 °C	37 °C	55 °C	37 °C	в течение 4 часов		

Объектами исследований служили 24 образца технических сортов винограда: «шардоне» (Севастопольская зона, Крым), «шардоне» (п. Солнечная Долина, Крым), «шардоне» (Вилла Виктория, Краснодарский край), «ркацители» (Кизлярский район, Республика Дагестан), «ркацители» (Дербентский район, Республика Дагестан), «левокумский устойчивый» (Ставропольский край), «мальбек» (п. Васильевка, Крым), «джават кара» (п. Солнечная Долина, Крым), «шабаш» (п. Коктебель, Крым), «алиготе» (п. Коктебель, Крым), «алиготе» (Фанагория, Краснодарский край), «саперави» (Фанагория, Краснодарский край), «эким кара» (п. Солнечная Долина, Крым), «мерло» (Севастопольская зона, Крым), «каберне совиньон»[1] (Россия), «каберне совиньон» (п. Васильевка, Крым), «каберне совиньон» (п. Солнечная Долина, Крым), «каберне совиньон» (Мильстрим, Краснодарский край), «каберне совиньон» (Вилла Виктория, Краснодарский край), «кефесия» (п. Солнечная Долина, Крым), «алиготе» (Бахчисарайский район, Крым), «саперави»[2] (Россия), «кокур белый» (п. Коктебель, Крым) и «кокур белый» (п. Солнечная Долина, Крым).

Пробоподготовку технических сортов винограда проводили извлечением 50–100 мг мякоти зрелого плода или косточки с ее механическим измельчением в ступке, с последующим помещением отобраннного биоматериала в пробирку типа Эппендорф.

Экстракцию нуклеиновых кислот *Vitis vinifera* L. из пробоподготовленного биоматериала выполняли набором innuPREP Plant DNA Kit (Analytik Jena GmbH, Germany) или DiamondDNA Plant kit («Алтайбиотех», Россия).

Постановку ПЦР-ПДРФ осуществляли набором Phire Plant Direct PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA) и 4 подобранными рестриктазами: *Pst*I, *BsaX*I, *BtsIMutI, HinfI* (New England Biolabs, USA) по протоколам, представленным в сводной Таблице 1.

[1] Данный образец винограда был получен без сведений о регионе произрастания.

[2] Данный образец винограда был получен без сведений о регионе произрастания.

Детекцию ПЦР-ПДРФ-фрагментов выполняли визуализацией электрофореграмм в УФ-трансиллюминаторе вслед за 2,5% агарозным гель-электрофорезом в ТАЕ-буфере, окрашенном этидием бромидом.

3. Результаты и обсуждение

В результате применения разработанного способа ПЦР-ПДРФ-генотипирования винограда детекцией диагностически значимых полиморфных позиций и идентификацией *UFGT*-ген-ассоциированных групп *Vitis vinifera* L. была подтверждена и установлена генотипическая принадлежность целого ряда протестированных сортов.

Представители *UFGT*-ген-ассоциированной группы № 1 *Vitis vinifera* L. генерировали специфичные ПЦР-ПДРФ-профили, наглядно продемонстрированные на Рисунке 1.

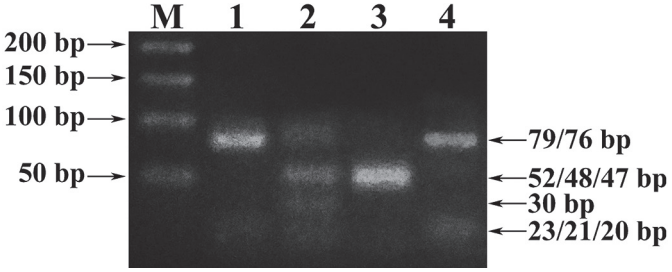

Рисунок 1. **Электрофореграмма ПЦР-ПДРФ-профилей *UFGT*-ген-ассоциированной группы № 1 *Vitis vinifera* L.**

Figure 1. **Electropherogram of the PCR-RFLP profiles of *UFGT* gene-associated group No.1 of *Vitis vinifera* L.**

Примечание: M — маркер длин ДНК (50+ bp DNA Ladder); 1 — PstI-ПДРФ-фрагменты (76/23 bp); 2 — BsaXI-ПДРФ-фрагменты (48/30/21 bp); 3 — BtsIMutI-ПДРФ-фрагменты (52/47 bp); 4 — HinfI-ПДРФ-фрагменты (79/20 bp)

К *UFGT*-ген-ассоциированной группе № 1 относились следующие образцы винограда: «шардоне» (Севастопольская зона, Крым), «шардоне» (п. Солнечная Долина, Крым), «шардоне» (Вилла Виктория, Краснодарский край), «ркацители» (Кизлярский район, Республика Дагестан), «ркацители»

(Дербентский район, Республика Дагестан), «левокумский устойчивый» (Ставропольский край).

При этом вывод о причастности шести вышеперечисленных образцов винограда именно к *UFGT*-ген-ассоциированной группе № 1 сделан на основании результатов эндонуклеазного расщепления ампликона по четырем использованным рестриктазам, которые генерируют картину электрофоретического разделения ПЦР-ПДРФ-фрагментов, свойственную исключительно представителям данной группы.

Достоверность полученных результатов подкреплена ранее проведенным нами исследованием, по результату которого сорта «шардоне», «ркацители» и «левокумский устойчивый» были соотнесены к *UFGT*-ген-ассоциированной группе № 1 [5]. Исследование проводилось в рамках отработанной стратегии геноидентификации интерпретацией детектируемых полиморфных позиций вариабельного *UFGT*-гена *Vitis vinifera* L. с использованием метода прямого секвенирования ПЦР-продукта. Депонированная в GenBank NCBI нуклеотидная последовательность локуса *UFGT*-гена сорта винограда «шардоне» с регистрационным номером JF522483, представленная в Таблице 2, выбрана в качестве референсной. Ее профили полиморфных позиций и рассчитанных ПЦР-ПДРФ-фрагментов стандартны для всех представителей *UFGT*-ген-ассоциированной группы № 1 [5,11].

Один представитель *UFGT*-ген-ассоциированной группы № 2 *Vitis vinifera* L. — технический сорт винограда «мальбек» (п. Васильевка, Крым) — формировал характерные для нее ПЦР-ПДРФ-профили, приведенные на Рисунке 2.

Полученный результат ПЦР-ПДРФ-анализа фактически подтвердил генотипическую принадлежность сорта «мальбек», ранее установленную методом прямого секвенирования ПЦР-продукта [5].

Два других представителя *UFGT*-ген-ассоциированной группы № 3 *Vitis vinifera* L. имели свойственные ей ПЦР-ПДРФ-профили, представленные на Рисунке 3.

В *UFGT*-ген-ассоциированную группу № 3 вошли образцы технических сортов винограда «джават кара» (п. Солнечная Долина, Крым) и «шабаш» (п. Коктебель, Крым), генотипическая принадлежность которых была установлена впервые.

Ряд представителей *UFGT*-ген-ассоциированной группы № 4 *Vitis vinifera* L. характеризовались специфичными ПЦР-ПДРФ-профилями, запечатленными на Рисунке 4.

В *UFGT*-ген-ассоциированную группу № 4 зашли следующие образцы винограда: «алиготе» (п. Коктебель, Крым), «алиготе» (Фанагория, Краснодарский край), «саперави» (Фанагория, Краснодарский край) и «эким кара» (п. Солнечная Долина, Крым), генотипическая принадлежность которых также была установлена впервые.

Единственный представитель *UFGT*-ген-ассоциированной группы № 5 *Vitis vinifera* L. — технический сорт винограда «мерло» (Севастопольская зона, Крым) — генерировал специфичные ПЦР-ПДРФ-профили, наглядно продемонстрированные на Рисунке 5.

Депонированная в GenBank NCBI нуклеотидная последовательность локуса *UFGT*-гена сорта винограда «мерло» с регистрационным номером JF522450 выбрана в качестве референсной (Таблица 2). Ее профили полиморфных позиций и рассчитанных ПЦР-ПДРФ-фрагментов стандартны для всех представителей *UFGT*-ген-ассоциированной группы № 5 [4,10].

Следующие представители *UFGT*-ген-ассоциированной группы № 13 *Vitis vinifera* L. формировали характерные для нее ПЦР-ПДРФ-профили, отображенные на Рисунке 6.

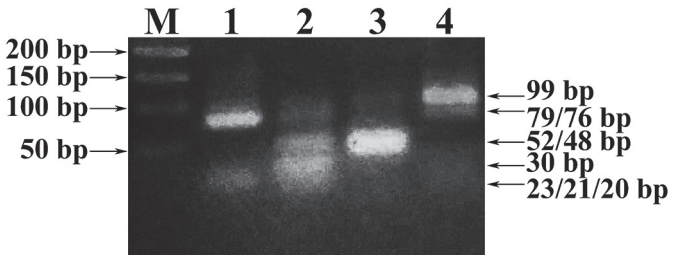

Рисунок 2. **Электрофореграмма ПЦР-ПДРФ-профилей *UFGT*-ген-ассоциированной группы № 2 *Vitis vinifera* L.**

Figure 2. **Electropherogram of the PCR-RFLP profiles of *UFGT* gene-associated group No.2 of *Vitis vinifera* L.**

Примечание: M — маркер длин ДНК (50+ bp DNA Ladder); 1 — PstI-ПДРФ-фрагменты (76/23 bp); 2 — BsaXI-ПДРФ-фрагменты (48/30/21 bp); 3 — BtsIMutI-ПДРФ-фрагменты (52/47 bp); 4 — HinfI-ПДРФ-фрагменты (99/79/20 bp)

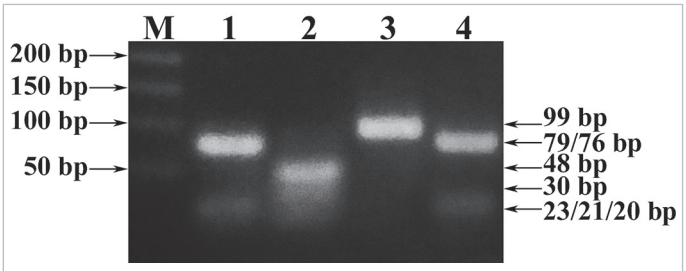

Рисунок 3. **Электрофореграмма ПЦР-ПДРФ-профилей *UFGT*-ген-ассоциированной группы № 3 *Vitis vinifera* L.**

Figure 3. **Electropherogram of the PCR-RFLP profiles of *UFGT* gene-associated group No.3 of *Vitis vinifera* L.**

Примечание: M — маркер длин ДНК (50+ bp DNA Ladder); 1 — PstI-ПДРФ-фрагменты (76/23 bp); 2 — BsaXI-ПДРФ-фрагменты (48/30/21 bp); 3 — BtsIMutI-ПДРФ-фрагменты (99 bp); 4 — HinfI-ПДРФ-фрагменты (79/20 bp)

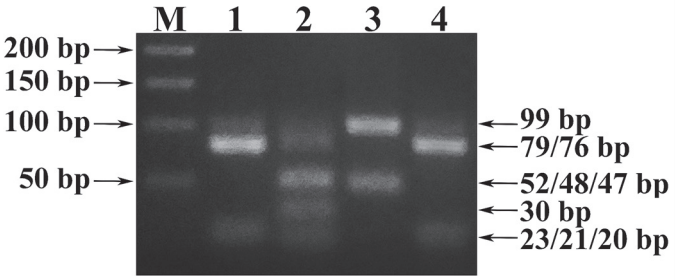

Рисунок 4. **Электрофореграмма ПЦР-ПДРФ-профилей *UFGT*-ген-ассоциированной группы № 4 *Vitis vinifera* L.**

Figure 4. **Electropherogram of the PCR-RFLP profiles of *UFGT* gene-associated group No.4 of *Vitis vinifera* L.**

Примечание: M — маркер длин ДНК (50+ bp DNA Ladder); 1 — PstI-ПДРФ-фрагменты (76/23 bp); 2 — BsaXI-ПДРФ-фрагменты (48/30/21 bp); 3 — BtsIMutI-ПДРФ-фрагменты (99/52/47 bp); 4 — HinfI-ПДРФ-фрагменты (79/20 bp)

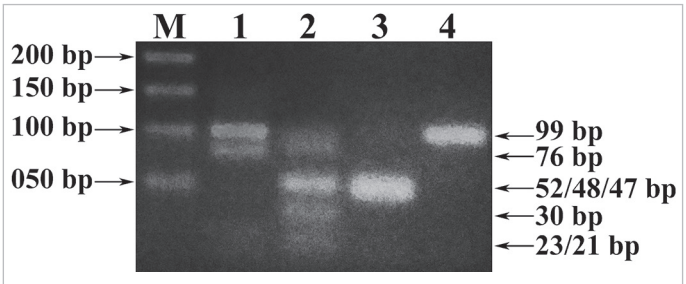

Рисунок 5. **Электрофореграмма ПЦР-ПДРФ-профилей *UFGT*-ген-ассоциированной группы № 5 *Vitis vinifera* L.**

Figure 5. **Electropherogram of the PCR-RFLP profiles of *UFGT* gene-associated group No.5 of *Vitis vinifera* L.**

Обозначения: M — маркер длин ДНК (50+ bp DNA Ladder); 1 — PstI-ПДРФ-фрагменты (99/76/23 bp); 2 — BsaXI-ПДРФ-фрагменты (48/30/21 bp); 3 — BtsIMutI-ПДРФ-фрагменты (52/47 bp); 4 — HinfI-ПДРФ-фрагменты (99 bp)

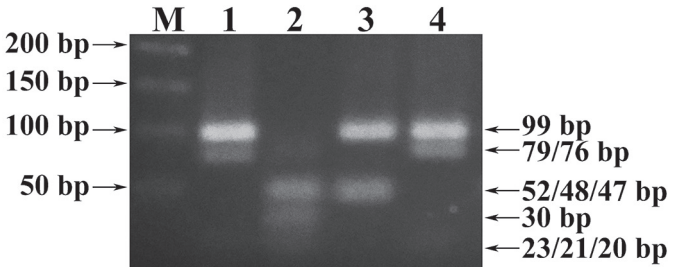

Рисунок 6. **Электрофореграмма ПЦР-ПДРФ-профилей *UFGT*-ген-ассоциированной группы № 13 *Vitis vinifera* L.**
Figure 6. **Electropherogram of the PCR-RFLP profiles of *UFGT* gene-associated group No.13 of *Vitis vinifera* L.**

Примечание: М — маркер длин ДНК (50+ bp DNA Ladder); 1 — PstI-ПДРФ-фрагменты (99/76/23 bp); 2 — BsaXI-ПДРФ-фрагменты (48/30/21 bp); 3 — BtsIMutI-ПДРФ-фрагменты (99/52/47 bp); 4 — HinfI-ПДРФ-фрагменты (99/79/20 bp)

В *UFGT*-ген-ассоциированную группу № 13 входили шесть протестированных образцов винограда: «каберне совиньон» (Россия), «каберне совиньон» (п. Васильевка, Крым), «каберне совиньон» (п. Солнечная Долина, Крым), «каберне совиньон» (Мильстрим, Краснодарский край), «каберне совиньон» (Вилла Виктория, Краснодарский край) и «кефесия» (п. Солнечная Долина, Крым).

Еще четыре образца винограда имели признаки разносортицы, так как результаты ПЦР-ПДРФ-анализа с нуклеиновыми кислотами *Vitis vinifera* L., экстрагированными из разных выборок одной промаркированной партии, не сходились. Это относилось к следующим образцам:

- «алиготе» (Бахчисарайский район, Крым) с 1-й и 4-й группой по *UFGT*-гену;
- «саперави» (Россия) с 3-ей и 13-й группой по *UFGT*-гену;
- «кокур белый» (п. Коктебель, Крым) с 1-й и 4-й группой по *UFGT*-гену;
- «кокур белый» (п. Солнечная Долина, Крым) со 2-й и 11-й группой по *UFGT*-гену.

Сами же ПЦР-ПДРФ-профили *UFGT*-ген-ассоциированной группы № 11 *Vitis vinifera* L. представлены на электрофореграмме Рисунка 7.

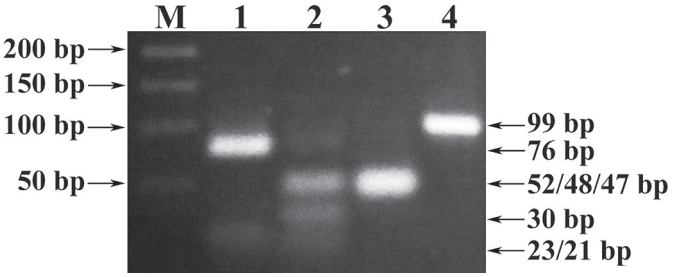

Рисунок 7. **Электрофореграмма ПЦР-ПДРФ-профилей *UFGT*-ген-ассоциированной группы № 11 *Vitis vinifera* L.**
Figure 7. **Electropherogram of the PCR-RFLP profiles of *UFGT* gene-associated group No.11 of *Vitis vinifera* L.**

Примечание: М — маркер длин ДНК (50+ bp DNA Ladder); 1 — PstI-ПДРФ-фрагменты (76/23 bp); 2 — BsaXI-ПДРФ-фрагменты (48/30/21 bp); 3 — BtsIMutI-ПДРФ-фрагменты (52/47 bp); 4 — HinfI-ПДРФ-фрагменты (99 bp)

Таким образом, в результате ПЦР-ПДРФ-генотипирования винограда у протестированных образцов в общей сложности выявлено семь из тринадцати *UFGT*-ген-ассоциированной групп *Vitis vinifera* L. Подтверждена или установлена впервые генотипическая принадлежность целого ряда сортов винограда: «шардоне» (группа № 1), «ркацители» (группа № 1), «левокумский устойчивый» (группа № 1), «мальбек» (группа № 2), «джават кара» (группа № 3), «шабаш» (группа № 3), «алиготе» (группа № 4), «саперави» (группа № 4), «эким кара» (группа № 4), «мерло» (группа № 5), «каберне совиньон» (группа № 13), «кефесия» (группа № 13).

Ряд исследованных образцов представляли из себя смесь разносортового винограда, что вскрылось при их генотестировании разработанным способом ПЦР-ПДРФ-анализа, который может быть задействован и для определения сортовой чистоты при выборе сырья для виноделия. Их генотипическая принадлежность с повторным отбором материала на исследование будет изучена в дальнейшей работе.

Рассчитанные ПЦР-ПДРФ-профили *UFGT*-ген-ассоциированных групп *Vitis vinifera* L., согласуемые с их профилями полиморфных позиций, представлены в сводной Таблице 2, сформированной в результате систематизации ранее полученных данных [3,5,11].

Таблица 2. Профили полиморфных позиций *UFGT*-ген-ассоциированных групп *Vitis vinifera* L. и сгенерированных ПЦР-ПДРФ-фрагментов
Table 2. **Profiles of polymorphic positions of *UFGT* gene-associated groups of *Vitis vinifera* L. and generated PCR-RFLP fragments**

№ п. п.	Референсные сорта винограда	GenBank A/N	ПЦР-продукт (bp)	Полиморфные позиции (INDEL*/SNPs)				
				21*	22	39	56	80
				ПДРФ-фрагменты (bp)				
				*Pst*I		*BsaX*I	*Bts*I*Mut*I	*Hinf*I
01	Chardonnay	JF522483	99	–	G	C	C	G
				76/23		48/30/21	52/47	79/20
02	Rabigato	JF522420	99	–	G	C	C	R
				76/23		48/30/21	52/47	99/79/20
03	Fernao Pires	JF522408	99	–	G	C	T	G
				76/23		48/30/21	99	79/20
04	Tinto Cao	JF522519	99	–	G	C	Y	G
				76/23		48/30/21	99/52/47	79/20
05	Merlot	JF522450	99	–	K	C	C	C
				99/76/23		48/30/21	52/47	99
06	Touriga Franca	JF522516	99	–	K	C	C	S
				99/76/23		48/30/21	52/47	99/79/20
07	Freisa	JF522497	99	–	G	C	Y	S
				76/23		48/30/21	99/52/47	99/79/20
08	Pedro Ximenez	JF522405	99	–	G	M	Y	G
				76/23		99/48/30/21	99/52/47	79/20
09	Cabernet Sauvignon	ND	100	T	G	C	Y	S
				100		48/30/22	100/53/47	100/80/20
10	Sousao	ND	100	T	G	C	T	S
				100		48/30/22	100	100/80/20
11	Cannonao	JF522522	99	–	G	C	C	C
				76/23		48/30/21	52/47	99
12	Parda	JF522443	99	–	G	M	C	G
				76/23		99/48/30/21	52/47	79/20
13	Rondinella	JF522509	99	–	K	C	Y	S
				99/76/23		48/30/21	99/52/47	99/79/20

Примечание: ND — No Data; A — Adenine; T — Thymine; G — Guanine; C — Cytosine; Y — C или T; S — G or C; K — G or T; R — A or G; M — A or C.

При этом *UFGT*-ген-ассоциированная группа № 9 с заявленной инсерцией тимина (T) в положении 21* продукта амплификации анализируемого локуса гена на деле может быть ее лишена. Об этом свидетельствуют результаты ПЦР-ПДРФ-анализа разных образцов сорта «каберне совиньон», относящих их к группе № 13, тем самым внося ясность в неверно интерпретированный ранее результат капиллярного секвенирования относительно ложной INDEL в анали-

зируемом локусе *Vitis vinifera* L. [5]. Еще одним аргументом в пользу отнесения сорта «каберне совиньон» к *UFGT*-ген-ассоциированной группе № 13 может служить ранее депонированная итальянскими селекционерами последовательность анализируемого локуса гена данного сорта с отсутствующей инсерцией тимина, чей регистрационный номер (GenBank A/N: JF522384) был упомянут в одной из наших публикаций [5].

Дополнительно следует отметить, что из всех референсных сортов винограда, указанных по порядку в Таблице 2, только типовые представители *UFGT*-ген-ассоциированых групп № 9 и № 10 не имеют депонированных в GenBank NCBI нуклеотидных последовательностей локуса *UFGT*-гена, при том что их результаты выравнивания секвенированной ДНК все же представлены в первоисточнике [3].

UFGT-ген *Vitis vinifera* L. — одна из диагностически значимых [4], но не единственная генетическая мишень для генотестирования сортового многообразия винограда и ДНК-аутентификации производимой из него продукции [5]. Идентификационный потенциал еще двух генов, *F3H* (flavanone 3-hydroxylase — флаванон-3-гидроксилаза) [22] и *LDOX* (leucoanthocyanidin dioxygenase — лейкоантоцианидин диоксигеназа) [23], впервые был раскрыт в тематическом научном труде S. Gomes et al. (2018) [24] и далее изучен в последующих исследованиях [7,2].

Анализ методологических подходов к геноидентификации технических сортов винограда, пригодных для ДНК-аутентификации виноматериалов, указывает на более высокий идентификационный потенциал *UFGT* по отношению к *F3H* и *LDOX*. Этот потенциал связан с большим количеством диагностически значимых полиморфных позиций во фланкируемом локусе анализируемого гена [8]. Поэтому выбор именно этой генетической мишени для исследования был приоритетным.

Полученные в ходе настоящей работы практические результаты подтвердили ранее проведенную прогнозную оценку о применимости ПЦР-ПДРФ-анализа для детекции диагностически значимых полиморфных позиций и последующей идентификации *UFGT*-ген-ассоциированных групп *Vitis vinifera* L. при тестировании сортового многообразия винограда [11].

Таким образом, в качестве инструмента детекции полиморфных позиций вариабельного локуса *UFGT*-гена и идентификации ген-ассоциированных групп *Vitis vinifera* L. был задействован разработанный нами способ ПЦР-ПДРФ-анализа, при помощи которого был выявлен неверно интепретированный ранее результат капиллярного секвенирования [5]. Использование предложенного способа как по отдельности [11], так и в связке с прямым секвенированием специфичного ПЦР-продукта длиной 99 bp [5] направлено на повышение точности геноидентификации технических сортов винограда. А его применимость в части ДНК-аутентификации виноматериалов и вин будет изучена в будущем.

Наряду с этим особого внимания заслуживают и другие аналитические инструменты ДНК-технологий [25,26], включая анализ кривых плавления с высокой разрешающей способностью (HRM-анализ) на ПЦР-платформах с флуоресцентно-гибридизационной детекцией [3,4] и биосенсоры [24, 27]. Также в этот список можно включить недавно протестированный портативный графеновый сенсорный чип с высокой разрешающей способностью в части распознавания однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) даже в исследуемых образцах с крайне низкой концентрацией нуклеиновых кислот *Vitis vinifera* L. [28].

Вышеперечисленные подходы задают вектор будущих исследований с комплексным ДНК-анализом по трем генетическим мишеням (*UFGT*, *F3H*, *LDOX*). А одной из первостепенных задач станет прогнозная оценка применимости ПЦР-ПДРФ-генотипирования винограда и по локусам генов *F3H* и *LDOX* с последующей практической оценкой работоспособности разрабатываемых способов, ожидаемо менее дорогостоящих и более доступных в использовании. При этом практическая значимость проведенных и планируемых исследований направлена на внедрение разработок в систему менеджмента качества сырья и продукции на основе разрабатываемых стандартов для винодельческой промышленности.

4. Заключение

Способ ПЦР-ПДРФ-генотипирования винограда, разработанный для идентификации *UFGT*-ген-ассоциированных групп *Vitis vinifera* L. детекцией диагностически значимых полиморфных позиций, продемонстрировал работоспособность при тестировании 24 образцов технических сортов винограда. Положительный результат был достигнут благодаря практической способности каждой из подобранных рестриктаз дискриминировать определенную полиморфную позицию, генерируя ПЦР-ПДРФ-профили 13 *UFGT*-ген-ассоциированных групп, семь из которых выявлено в ходе настоящего исследования. Потенциал предложенного способа, примененного при тестировании сортового многообразия винограда, будет дальше изучен на предмет ДНК-аутентификации мезги, сусла, виноматериалов и вин в контексте прослеживаемости этапов винификации.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. National Institutes of Health (NIH). National Library of Medicine (NLM). National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2022). UFGT anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 2 [Vitis vinifera (wine grape)]. Gene ID: 100233099, updated on 24-Aug-2022. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100233099 Accessed May 15, 2023
2. Barrias, S., Pereira, L., Rocha, S., de Sousa, T. A., Ibáñez, J., Martins-Lopes, P. (2023). Identification of Portuguese traditional grapevines using molecular marker-based strategies. *Scientia Horticulturae*, 311, Article 111826. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.111826
3. Pereira, L., Martins-Lopes, P. (2015). Vitis vinifera L. Single-nucleotide polymorphism detection with high-resolution melting analysis based on the UDP-glucose: Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase gene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(41), 9165–9174. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03463
4. Pereira, L., Gomes, S., Castro, C., Eiras-Dias, J. E., Brazão, J., Graça, A. et al. (2017). High Resolution Melting (HRM) applied to wine authenticity. *Food Chemistry*, 216, 80–86. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.185
5. Galstyan, A. G., Semipyatniy, V. K., Mikhailova, I. Yu., Gilmanov, K. K., Bigaeva, A. V., Vafin, R. R. (2021). Methodological Approaches to DNA Authentication of Foods, Wines and Raw Materials for Their Production. *Foods,* 10(3), Article 595. https://doi.org/10.3390/foods10030595
6. Vafin, R. R., Mikhailova, I. Y., Semipyatny, V. K., Gilmanov, Kh. Kh., Bigaeva, A. V., Lazareva, E. G. (2020). Raw materials identification and manufactured products authentication technologies. *News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series Chemistry and Technology,* 6(444), 119–126. https://doi.org/10.32014/2020.2518–1491.106
7. Teixeira, R. J. S., Gomes, S., Malheiro, V., Pereira, L., Fernandes, J. R., Mendes-Ferreira, A. et al. (2021). A multidisciplinary fingerprinting approach for authenticity and geographical traceability of Portuguese wines. *Foods*, 10(5), Article 1044. https://doi.org/10.3390/foods10051044
8. Oganesyants, L. A., Vafin, R. R., Galstyan, A. G., Semipyatniy, V. K., Khurshudyan, S. A., Ryabova, A. E. (2018). Prospects for DNA authentication in wine production monitoring. *Foods and Raw Materials*, 6(2), 438–448. https://doi.org/10.21603/2308–4057–2018–2–438–448
9. Pereira, L., Gomes, S., Barrias, S., Gomes, E. P., Baleiras-Couto, M., Fernandes, J. R. et al. (2018). From the field to the bottle — An integrated strategy for wine authenticity. *Beverages*, 4(4), Article 71. https://doi.org/10.3390/beverages4040071

10. Catalano, V., Moreno-Sanz, P., Lorenzi, S., Grando, M. S. (2016). Experimental review of DNA-based methods for wine traceability and development of a Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) genotyping assay for quantitative varietal authentication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 64(37), 6969–6984. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02560
11. Вафин, Р. Р., Михайлова, И. Ю., Агейкина, И. И. (2023). Прогнозирование применимости ПЦР-ПДРФ-анализа для тестирования сортового многообразия винограда. *Пищевая промышленность*, 1, 6–9. https://doi.org/10.52653/PPI.2023.1.1.001
12. Savazzini, F., Martinelli, L. (2006). DNA analysis in wines: Development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification. *Analytica Chimica Acta*, 563(1–2), 274–282. https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.078
13. Pereira, L., Guedes-Pinto, H., Martins-Lopes, P. (2011). An enhanced method for Vitis vinifera L. DNA extraction from wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(4), 547–552. https://doi.org/10.5344/ajev.2011.10022
14. Drábek, J., Stávek, J., Jalůvková, M., Jurček, T., Frébort, I. (2008). Quantification of DNA during winemaking by fluorimetry and Vitis vinifera L.-specific quantitative PCR. *European Food Research and Technology*, 226(3), 491–497. https://doi.org/10.1007/s00217–007–0561–8
15. Bigliazzi, J., Scali, M., Paolucci, E., Cresti, M., Vignani, R. (2012). DNA extracted with optimized protocols can be genotyped to reconstruct the varietal composition of monovarietal wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(4), 568–573. https://doi.org/10.5344/ajev.2012.12014
16. Işçi, B., Yildirim, H. K, Altindisli A. (2014). Evaluation of methods for DNA extraction from must and wine. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(3), 238–243. https://doi.org/10.1002/jib.129
17. Siret, R., Boursiquot, J. M., Merle, M. H., Cabanis, J. C., This, P. (2000). Toward the authentication of varietal wines by the analysis of grape (Vitis vinifera L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 5035–5040. https://doi.org/10.1021/jf991168a
18. Scali, M., Elisa, P., Jacopo, B., Mauro, C., Vignani, R. (2014). Vineyards genetic monitoring and Vernaccia di San Gimignano wine molecular fingerprinting. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5(2), 142–154. https://doi.org/10.4236/abb.2014.52018
19. Siret, R., Gigaud, O., Rosec, J. P., This, P. (2002). Analysis of grape Vitis vinifera L. DNA in must mixtures and experimental mixed wines using microsatellite markers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3822–3827. https://doi.org/10.1021/jf011462e
20. Hârţa, M., Pamfil, D., Pop, R., Vicaş, S. (2011). DNA fingerprinting used for testing some Romanian wine varieties. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture,* 68(1), 143–148. https://doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:7041
21. di Rienzo, V., Miazzi, M. M., Fanelli, V., Savino, V., Pollastro, S., Colucci, F. et al. (2016). An enhanced analytical procedure to discover table grape DNA adulteration in industrial musts. *Food Control*, 60, 124–130. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.015
22. National Institutes of Health (NIH). National Library of Medicine (NLM). National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2022). F3H flavanone 3-hydroxylase [Vitis vinifera (wine grape)]. Gene ID: 100233079, updated on 28-Aug-2022. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100233079 Accessed May 15, 2023
23. National Institutes of Health (NIH). National Library of Medicine (NLM). National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2022). LDOX leucoanthocyanidin dioxygenase [Vitis vinifera (wine grape)]. Gene ID: 100233142, updated on 29-Aug-2022. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100233142 Accessed May 15, 2023
24. Gomes, S., Castro, C., Barrias, S., Pereira, L., Jorge, P., Fernandes J. R. et al. (2018). Alternative SNP detection platforms, HRM and biosensors, for varietal identification in Vitis vinifera L. using F3H and LDOX genes. *Scientific Reports*, 8(1), Article 5850. https://doi.org/10.1038/s41598–018–24158–9
25. Azizi, M. M. F., Lau, H. Y., Abu-Bakar, N. (2021). Integration of advanced technologies for plant variety and cultivar identification. *Journal of Biosciences*, 46, Article 91. https://doi.org/10.1007/s12038–021–00214-x
26. Villano, C., Aiese Cigliano, R., Esposito, S., D'Amelia, V., Iovene, M., Carputo, D. et al. (2022). DNA-based technologies for grapevine biodiversity exploitation: State of the art and future perspectives. *Agronomy,* 12(2), Article 491. https://doi.org/10.3390/agronomy12020491
27. Barrias, S., Fernandes, J. R., Eiras-Dias, J. E., Brazão, J., Martins-Lopes, P. (2019). Label free DNA-based optical biosensor as a potential system for wine authenticity. *Food Chemistry*, 270, 299–304. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.058
28. Purwidyantri, A., Azinheiro, S., Roldán, A. G., Jaegerova, T., Vilaça, A., Machado, R. et al. (2023). Integrated approach from sample-to-answer for grapevine varietal identification on a portable graphene sensor chip. *ACS Sensors*, 8(2), 640–654. https://doi.org/10.1021/acssensors.2c02090

REFERENCES

1. National Institutes of Health (NIH). National Library of Medicine (NLM). National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2022). UFGT anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 2 [Vitis vinifera (wine grape)]. Gene ID: 100233099, updated on 24-Aug-2022. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100233099 Accessed May 15, 2023
2. Barrias, S., Pereira, L., Rocha, S., de Sousa, T. A., Ibáñez, J., Martins-Lopes, P. (2023). Identification of Portuguese traditional grapevines using molecular marker-based strategies. *Scientia Horticulturae*, 311, Article 111826. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.111826
3. Pereira, L., Martins-Lopes, P. (2015). Vitis vinifera L. Single-nucleotide polymorphism detection with high-resolution melting analysis based on the UDP-glucose: Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase gene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(41), 9165–9174. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03463
4. Pereira, L., Gomes, S., Castro, C., Eiras-Dias, J. E., Brazão, J., Graça, A. et al. (2017). High Resolution Melting (HRM) applied to wine authenticity. *Food Chemistry*, 216, 80–86. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.185
5. Galstyan, A. G., Semipyatniy, V. K., Mikhailova, I. Yu., Gilmanov, K. K., Bigaeva, A. V., Vafin, R. R. (2021). Methodological approaches to DNA authentication of foods, wines and raw materials for their production. *Foods,* 10(3), Article 595. https://doi.org/10.3390/foods10030595
6. Vafin, R. R., Mikhailova, I. Y., Semipyatny, V. K., Gilmanov, Kh. Kh., Bigaeva, A. V., Lazareva, E. G. (2020). Raw Materials Identification and Manufactured Products Authentication Technologies. *News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series Chemistry and Technology,* 6(444), 119–126. https://doi.org/10.32014/2020.2518–1491.106
7. Teixeira, R. J. S., Gomes, S., Malheiro, V., Pereira, L., Fernandes, J. R., Mendes-Ferreira, A. et al. (2021). A multidisciplinary fingerprinting approach for authenticity and geographical traceability of Portuguese wines. *Foods*, 10(5), Article 1044. https://doi.org/10.3390/foods10051044
8. Oganesyants, L. A., Vafin, R. R., Galstyan, A. G., Semipyatniy, V. K., Khurshudyan, S. A., Ryabova, A. E. (2018). Prospects for DNA authentication in wine production monitoring. *Foods and Raw Materials*, 6(2), 438–448. https://doi.org/10.21603/2308–4057–2018–2–438–448
9. Pereira, L., Gomes, S., Barrias, S., Gomes, E. P., Baleiras-Couto, M., Fernandes, J. R.et al. (2018). From the field to the bottle — An integrated strategy for wine authenticity. *Beverages*, 4(4), Article 71. https://doi.org/10.3390/beverages4040071
10. Catalano, V., Moreno-Sanz, P., Lorenzi, S., Grando, M. S. (2016). Experimental review of DNA-based methods for wine traceability and development of a Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) genotyping assay for quantitative varietal authentication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 64(37), 6969–6984. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02560
11. Vafin, R. R., Mikhailova I. Yu., Ageykina I. I. (2023). Predicting the applicability of PCR-RFLP analysis for testing grape varietal diversity. *Food Industry*, 1, 6–9. https://doi.org/ 10.52653/PPI.2023.1.1.001 (In Russian)
12. Savazzini, F., Martinelli, L. (2006). DNA analysis in wines: Development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification. *Analytica Chimica Acta*, 563(1–2), 274–282. https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.078
13. Pereira, L., Guedes-Pinto, H., Martins-Lopes, P. (2011). An enhanced method for Vitis vinifera L. DNA extraction from wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(4), 547–552. https://doi.org/10.5344/ajev.2011.10022
14. Drábek, J., Stávek, J., Jalůvková, M., Jurček, T., Frébort, I. (2008). Quantification of DNA during winemaking by fluorimetry and Vitis vinifera L.-specific quantitative PCR. *European Food Research and Technology*, 226(3), 491–497. https://doi.org/10.1007/s00217–007–0561–8
15. Bigliazzi, J., Scali, M., Paolucci, E., Cresti, M., Vignani, R. (2012). DNA extracted with optimized protocols can be genotyped to reconstruct the varietal composition of monovarietal wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(4), 568–573. https://doi.org/10.5344/ajev.2012.12014
16. Işçi, B., Yildirim, H. K, Altindisli A. (2014). Evaluation of methods for DNA extraction from must and wine. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(3), 238–243. https://doi.org/10.1002/jib.129
17. Siret, R., Boursiquot, J. M., Merle, M. H., Cabanis, J. C., This, P. (2000). Toward the authentication of varietal wines by the analysis of grape (Vitis vinifera L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 5035–5040. https://doi.org/10.1021/jf991168a
18. Scali, M., Elisa, P., Jacopo, B., Mauro, C., Vignani, R. (2014). Vineyards genetic monitoring and Vernaccia di San Gimignano wine molecular fingerprinting. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5(2), 142–154. https://doi.org/10.4236/abb.2014.52018
19. Siret, R., Gigaud, O., Rosec, J. P., This, P. (2002). Analysis of grape Vitis vinifera L. DNA in must mixtures and experimental mixed wines using microsatellite markers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 50(13), 3822–3827. https://doi.org/10.1021/jf011462e
20. Hârţa, M., Pamfil, D., Pop, R., Vicaş, S. (2011). DNA fingerprinting used for testing some Romanian wine varieties. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture,* 68(1), 143–148. https://doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:7041
21. di Rienzo, V., Miazzi, M. M., Fanelli, V., Savino, V., Pollastro, S., Colucci, F. et al. (2016). An enhanced analytical procedure to discover table grape DNA adulteration in industrial musts. *Food Control*, 60, 124–130. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.015

22. National Institutes of Health (NIH). National Library of Medicine (NLM). National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2022). F3H flavanone 3-hydroxylase [Vitis vinifera (wine grape)]. Gene ID: 100233079, updated on 28-Aug-2022. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100233079 Accessed May 15, 2023
23. National Institutes of Health (NIH). National Library of Medicine (NLM). National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2022). LDOX leucoanthocyanidin dioxygenase [Vitis vinifera (wine grape)]. Gene ID: 100233142, updated on 29-Aug-2022. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100233142 Accessed May 15, 2023
24. Gomes, S., Castro, C., Barrias, S., Pereira, L., Jorge, P., Fernandes J. R. et al. (2018). Alternative SNP detection platforms, HRM and biosensors, for varietal identification in Vitis vinifera L. using F3H and LDOX genes. *Scientific Reports*, 8(1), Article 5850. https://doi.org/10.1038/s41598–018–24158–9
25. Azizi, M. M. F., Lau, H. Y., Abu-Bakar, N. (2021). Integration of advanced technologies for plant variety and cultivar identification. *Journal of Biosciences*, 46, Article 91. https://doi.org/10.1007/s12038–021–00214-x
26. Villano, C., Aiese Cigliano, R., Esposito, S., D'Amelia, V., Iovene, M., Carputo, D. et al. (2022). DNA-based technologies for grapevine biodiversity exploitation: State of the art and future perspectives. *Agronomy,* 12(2), Article 491. https://doi.org/10.3390/agronomy12020491
27. Barrias, S., Fernandes, J. R., Eiras-Dias, J. E., Brazão, J., Martins-Lopes, P. (2019). Label free DNA-based optical biosensor as a potential system for wine authenticity. *Food Chemistry*, 270, 299–304. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.058
28. Purwidyantri, A., Azinheiro, S., Roldán, A. G., Jaegerova, T., Vilaça, A., Machado, R. et al. (2023). Integrated approach from sample-to-answer for grapevine varietal identification on a portable graphene sensor chip. *ACS Sensors*, 8(2), 640–654. https://doi.org/10.1021/acssensors.2c02090

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	**Affiliation**
Рамиль Ришадович Вафин — доктор биологических наук, профессор РАН, заместитель заведующего, Межотраслевой научно-технический центр мониторинга качества пищевых продуктов, Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности 119021, Москва, ул. Россолимо, 7 Тел.: +7–937–778–88–21 E-mail: vafin-ramil@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000–0003–0914–0053 * автор для контактов	**Ramil R. Vafin**, Doctor of Biological Science, Professor of RAS, Deputy Head, Intersectoral Scientific and Technical Center for Monitoring the Quality of Food Products, All-Russian Scientific Research Institute of Brewing, Beverage and Wine Industry 7, Rossolimo Str., 119021, Moscow, Russia Tel.: +7–937–778–88–21 E-mail: vafin-ramil@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000–0003–0914–0053 * corresponding author
Ирина Юрьевна Михайлова — научный сотрудник, Межотраслевой научно-технический центр мониторинга качества пищевых продуктов, Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности 119021, Москва, ул. Россолимо, 7 Тел.: +7–916–250–88–76 E-mail: irina-mikhailova54@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000–0002–9180–1043	**Irina Y. Mikhailova**, Researcher, Intersectoral Scientific and Technical Center for Monitoring the Quality of Food Products, All-Russian Scientific Research Institute of Brewing, Beverage and Wine Industry 7, Rossolimo Str., 119021, Moscow, Russia Tel.: +7–916–250–88–76 E-mail: irina-mikhailova54@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000–0002–9180–1043
Ирина Игоревна Агейкина — младший научный сотрудник, Межотраслевой научно-технический центр мониторинга качества пищевых продуктов, Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности 119021, Москва, ул. Россолимо, 7 Тел.: +7–915–101–75–84 E-mail: agira_@ro.ru ORCID: https://orcid.org/0000–0002–5667–1335	**Irina I. Ageykina**, Iunior Researcher, Intersectoral Scientific and Technical Center for Monitoring the Quality of Food Products, All-Russian Scientific Research Institute of Brewing, Beverage and Wine Industry 7, Rossolimo Str., 119021, Moscow, Russia Tel.: +7–915–101–75–84 E-mail: agira_@ro.ru ORCID: https://orcid.org/0000–0002–5667–1335
Критерии авторства	**Contribution**
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	**Conflict of interest**
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.