



ФГБУН

Всероссийский национальный научно-исследовательский институт
виноградарства и виноделия «Магарач» РАН



Задание № FNZM-2022-0009
Развитие биотехнологических систем
сохранения, оздоровления и размножения винограда,
создания новых генотипов с экономически значимыми признаками

Этап 2: Исследовать современные научные подходы, позволяющие разработать эффективные технологии клонального микроразмножения винограда

Руководитель:

Клименко В.П. , гл. науч. сотр., зав. лабораторией генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда, д-р с.-х. наук, ст. науч. сотр.

Ответственные исполнители:

Зленко В.А. , вед. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда, канд. с.-х. наук, доцент;

Павлова И.А. , вед. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда, канд. биол. наук, ст. науч. сотр.;

Хватков П.А. , ст. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда, канд. биол. наук.

Исполнители:

Лушай Е.А. , мл. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда;

Абдурашитова А.С. , мл. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда;

Григоренко М.И. , мл. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда;

Малетич Г.К, мл. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда;

Всего 8 исследователей, в т.ч. 8 научных сотрудников



Всероссийский национальный научно-исследовательский
институт виноградарства и виноделия
основан в 1928 г.
«МАГАРАЧ» РАН

Ялта 2023

Цель исследований – получение знаний в области современных научных подходов, позволяющих разработать эффективные технологии клонального микроразмножения винограда, а также в выявлении взаимосвязи уровня экспрессии гетерологичного целевого гена в трансгенных растениях с уровнем их холодостойкости.

Задачи исследований:

- получить проростки, развившиеся из соматических эмбриоидов, и растения-регенеранты различных генотипов винограда в культуре *in vitro*;
- провести анализ уровня экспрессии гена *cspA-plant* в закаленных и незакаленных трансгенных растениях методом ОТ-РВ-ПЦР;
- провести промораживание закаленных и незакаленных трансгенных и контрольных растений винограда и оценить их холодоустойчивость методом учета оттока электролитов;
- продолжить пополнение и поддержание банка крымских автохтонных и перспективных сортов винограда *in vitro*;
- разработать стратегию повышения эффективности технологии клонального микроразмножения перспективных сортов винограда, подготовить обновленные методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда.

Методы исследований:

- Соматический эмбриогенез и регенерация растений
- Генетическая трансформация
- Культивирование образцов вегетирующей коллекции в системе *in vitro*

База проведения исследований: лаборатория генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда (ФГБУН «ВНИИВИВ «МАГАРАЧ» РАН»); лаборатория биоинженерии растений (ФГБУН НБС-ННЦ), г. Ялта.

Актуальность: в соответствии с программой ФНИ работы в области биотехнологии позволят создать новые эффективные технологии культивирования и клонального микроразмножения растений, технологии контроля за переносом целевых генов в селекции, технологии регенерации растений из тканей и клеток, что может быть использовано для создания новых генотипов, получения трансгенных линий, получения оздоровленного посадочного материала для создания маточных насаждений винограда.

Новизна исследований:

- Научная новизна данной научно-исследовательской работы заключается, прежде всего, в получении современных знаний, позволяющих разработать эффективные технологии клонального микроразмножения винограда.
- Впервые исследуется возможность создания стрессоустойчивых форм винограда путем экспрессии генов CSD.
- Вегетирующая коллекция винограда *in vitro* пополнена новыми сортообразцами.
- Разработаны обновленные методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда.

Влияние регуляторов роста на развитие растений винограда из зародышей семян с неразвитым эндоспермом скрещивания Рута соматклон № 49 × Мускат Крыма на I и II этапах культивирования, г. Ялта, 2023 г.

Вариант (I этап культивирования)	Развитие побегов и корней у проростков на I этапе культивирования		Развитие растений из проростков после их пересадки на твердую среду РG без регуляторов роста, II этап культивирования		
	длина побегов, см	длина корней, см	длина побегов, см	количество корней, шт.	длина корней, см
Кинетин, 5 мг/л	2,4	4,5	3,2	3,7	6,3
Кинетин, 5 мг/л + GA, 0,2 мг/л	3,4	6,0	5,0	5,0	14,0
Кинетин, 5 мг/л + IBA, 5 мг/л	2,8	1,7	4,0	4,3	2,3
Кинетин, 5 мг/л + IBA, 5 мг/л + GA, 0,2 мг/л	2,3	5,0	3,2	6,3	7,0
BAР, 0,5 мг/л	1,8	2,3	2,1	2,0	3,9
BAР, 0,5 мг/л + GA, 0,2 мг/л	1,7	4,0	2,5	2,0	5,6
BAР, 0,5 мг/л + IBA, 5 мг/л	2,0	1,5	3,0	1,0	2,0
BAР, 0,5 мг/л + IBA, 5 мг/л + GA, 0,2 мг/л	0,3	6,2	0,6	6,0	8,0
НСР ₀₅	0,8	1,6	1,1	1,7	3,2

Влияние регуляторов роста, добавленных в жидкую модифицированную среду РГ (I этап), на развитие растений винограда из недоразвитых зародышей после пересадки на твердую безгормональную среду РГ (II этап), г. Ялта, 2023 г.

Вариант (I этап культивирования)	Развитие растений из проростков после их пересадки на твердую среду РГ без регуляторов роста, II этап культивирования											
	длина побегов, см				количество корней, шт.				длина корней, см			
	А	Б	В	Г	А	Б	В	Г	А	Б	В	Г
Кинетин, 5 мг/л	1,5	0,3	1,8	0	4,0	2,0	2,0	0	9,0	0,5	0,7	0
Кинетин, 5 мг/л + GA, 0,2 мг/л	0	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0
Кинетин, 5 мг/л + IBA, 5 мг/л	0,9	4,0	3,0	0,0	5,0	5,0	3,0	0	10,0	5,0	1,0	0
Кинетин, 5 мг/л + IBA, 5 мг/л + GA, 0,2 мг/л	0	2,5	0,3	2,3	0	2,0	0	4,3	0	3,0	0	3,8
ВАР, 0,5 мг/л	3,0	0	2,0	0,3	1,0	0	1,0	1,0	14,0	0	0,5	1,8
ВАР, 0,5 мг/л + GA, 0,2 мг/л	7,0	0	3,0	0,3	4,0	0	0	0	13,0	0	0	0
ВАР, 0,5 мг/л + IBA, 5 мг/л	0	0,3	1,0	0,3	0	0	0	1,0	0	0	0	1,7
ВАР, 0,5 мг/л + IBA, 5 мг/л + GA, 0,2 мг/л	0,3	2,0	0,6	0,0	2,0	1,0	1,0	0	7,0	12,0	1,0	0
НСР ₀₅	2,0	1,3	1,0	0,6	1,7	1,5	0,9	1,2	4,9	3,5	0,4	1,2



Получение растений из зиготических зародышей винограда в условиях *in vitro*, г. Ялта, 2023 г.

Сегмент семени с зародышем

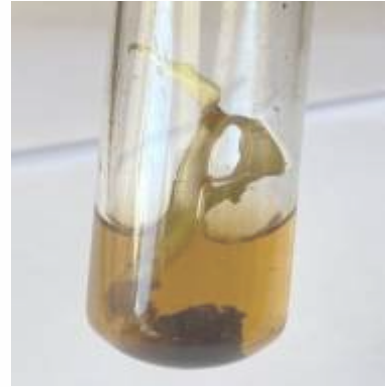
I этап. Зародыши семян высаживают на варианты жидкой модифицированной среды PG с добавлением 5 мг/л кинетина, 0,5 мг/л БАП, 5 мг/л ИМК, 0,2 мг/л гибберелловой кислоты в различных комбинациях.

II этап. Проростки высаживают на твердую безгормональную среду PG.

III этап. Проростки высаживают в жидкую модифицированную среду PG с добавлением 1,5 мг/л БАП.

IV этап. Агрегаты пролиферирующих почек или побегов субкультивируют в жидкую безгормональную среду PG.

V этап. Побеги высаживают на твердую безгормональную среду PG.



Развитие проростка,
№89 Сфинкс x №97 E-342



Образование растения,
№89 Сфинкс x №97 E-342

Исследования по подбору оптимальных концентраций веществ для развития проэмбриогенных каллусов и клеток в суспензионных культурах подвоя Рюгжери 140, г. Ялта, 2023 г.



Глобулярные эмбриониды с добавкой 10 мг/л аденина, 5 мг/л Са-пантотената и 5 мг/л D,L-фенилаланина



Проэмбриогенные клетки с добавкой 10 мг/л аденина, 5 мг/л Са-пантотената и 5 мг/л D,L-фенилаланина



Проэмбриогенный каллус на среде с добавками 5 мг/л никотиновой кислоты, 1 мг/л 2,4-D, 0,2 мг/л ВАР и 5 мг/л D,L-фенилаланина



Проэмбриогенный каллус на среде с добавками 5 мг/л никотиновой кислоты, 1 мг/л 2,4-D, 0,2 мг/л ВАР

Для развития из проэмбриогенных клеток суспензий глобулярных эмбрионидов наиболее действенными были ВАР (0,2-1,5 мг/л) и аденин (10-20 мг/л), их превращение в сердцевидные и торпедовидные эмбриониды происходило в безгормональной среде с добавкой D, L- фенилаланина (5 мг/л)

Исследование влияния на развитие сердцевидных и торпедовидных эмбрионов и их превращение в проростки регуляторов роста и биологически активных веществ, г. Ялта, 2023 г.



Для превращения торпедовидных эмбрионов в проростки и образования у них побегов оптимальной оказалась среда PG с добавкой 5 мг/л Са-пантотената, 5 мг/л никотиновой кислоты, 0,5 мг/л БАП и L-аргинина. Всего в исследованиях использовали 223 варианта питательных сред.



Создание форм винограда, обладающих толерантностью к холодовым стрессам, с помощью генетической трансформации

Полученные ранее шесть трансгенных линий сорта Подарок Магарача (содержащие в своем геноме последовательность гена *cspA*) и контрольные образцы (нетрансгенные растения сорта Подарок Магарача и растения сортов Гренаж белый и Бастардо) с целью оценки повышения их холодостойкости размножены до необходимого количества и адаптированы к условиям *in vivo*.



Оценка экспрессии целевого гена *cspA-plant* в трансгенных линиях сорта Подарок Магарача

Обработка РНК каждого образца ДНКазой, синтез кДНК с использованием Revert Aid Minus Reverse Transcriptase (Thermo) в соответствии с протоколом производителя с использованием праймеров oligo (dT) 18 и Random (dN) 10.

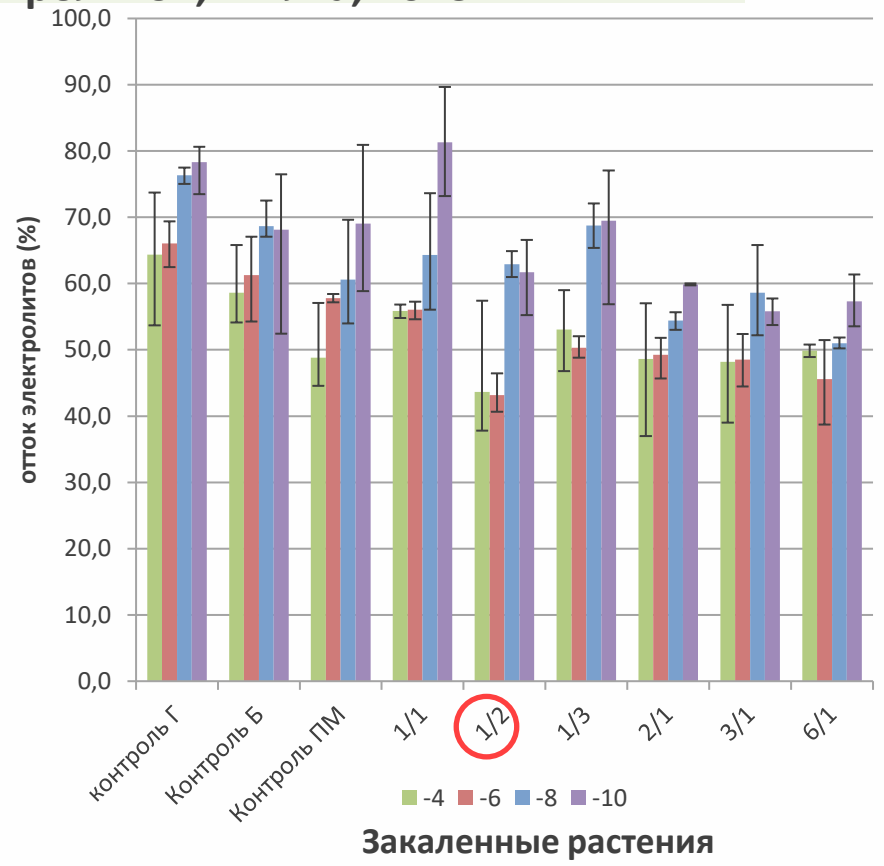
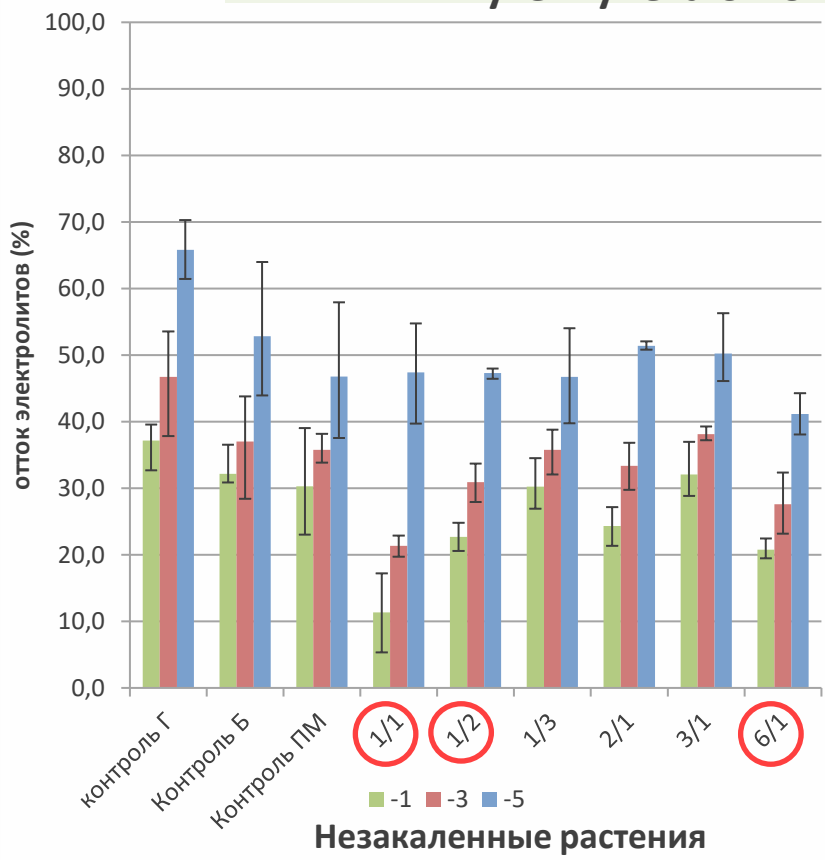
Гены конъюгирующего фермента убикитина, актина и белка семейства SAND выбраны в качестве внутреннего контроля как наиболее подходящие референсные гены для использования в листьях виноградной лозы независимо от стресса.

ОТ-ПЦР в реальном времени проводили с использованием наборов праймеров для гена *cspA-plant*. Циклы ПЦР подбирались таким образом, чтобы анализируемые образцы находились в экспоненциальной фазе амплификации.

Эксперименты проводили на приборе LightCycler 96 с использованием системы qPCRmix-HS SYBR, содержащей полимеразу HS Taq и интеркалирующий краситель SYBR Green I. Метод 2- $\Delta\Delta$ CT использовали для нормализации и калибровки значений гена *cspA-plant* относительно эндогенного контроля.

Экспрессия целевого гена установлена во всех трансгенных линиях сорта Подарок Магарача, как закаленных, так и не закаленных растений.

Оценка морозостойкости экспериментальных растений винограда путем учета оттока электролитов, г. Ялта, 2023 г.



После экспозиции при -3°C установлено, что трансгенные образцы линий 1/1, 1/2 и 6/1 сорта Подарок Магарача имели на 10-15% более низкий отток электролитов, чем нетрансгенные образцы.

Оценка морозостойкости экспериментальных растений винограда путем учета повреждения почек, г. Ялта, 2023 г.

Сорт, линия	Сохранность почек у растений после воздействия низкими температурами, %			
	-4°C	-6°C	-8°C	-10°C
Бастардо	100	0	0	0
Гренаш белый	100	20	0	0
Подарок Магарача	100	80	60	30
Трансгенная линия сорта Подарок Магарача 1/1	100	100	100	80
Трансгенная линия сорта Подарок Магарача 1/2	100	100	100	100
Трансгенная линия сорта Подарок Магарача 1/3	100	100	100	60
Трансгенная линия сорта Подарок Магарача 2/1	100	100	100	60
Трансгенная линия сорта Подарок Магарач 3/1	100	100	100	100
Трансгенная линия сорта Подарок Магарача 6/1	100	100	100	80
НСП ₀₅	0	17	31	24

Растения *in vitro* на средах с разной концентрацией сахарозы для длительного сохранения образцов, г. Ялта, 2023 г.



а б в
Антей
магарачский



а б в
Гранатовый
Магарача



а б в
Памяти
Голодриги

С целью замедления процессов морфогенеза заложили на трех сортах винограда эксперимент по оптимизации сред культивирования, используемых при разных режимах сохранения образцов коллекции: при низких температурах без освещения, на свету при пониженном освещении, 16-часовом фотопериоде и температуре 25-27°C.

а - без сахарозы;
б - с концентрацией сахарозы 10 г/л (контроль);
в - с концентрацией сахарозы 60 г/л.

Изучение влияния индолилмасляной кислоты на морфогенез растений *in vitro* подвоев, г. Ялта, 2023 г.

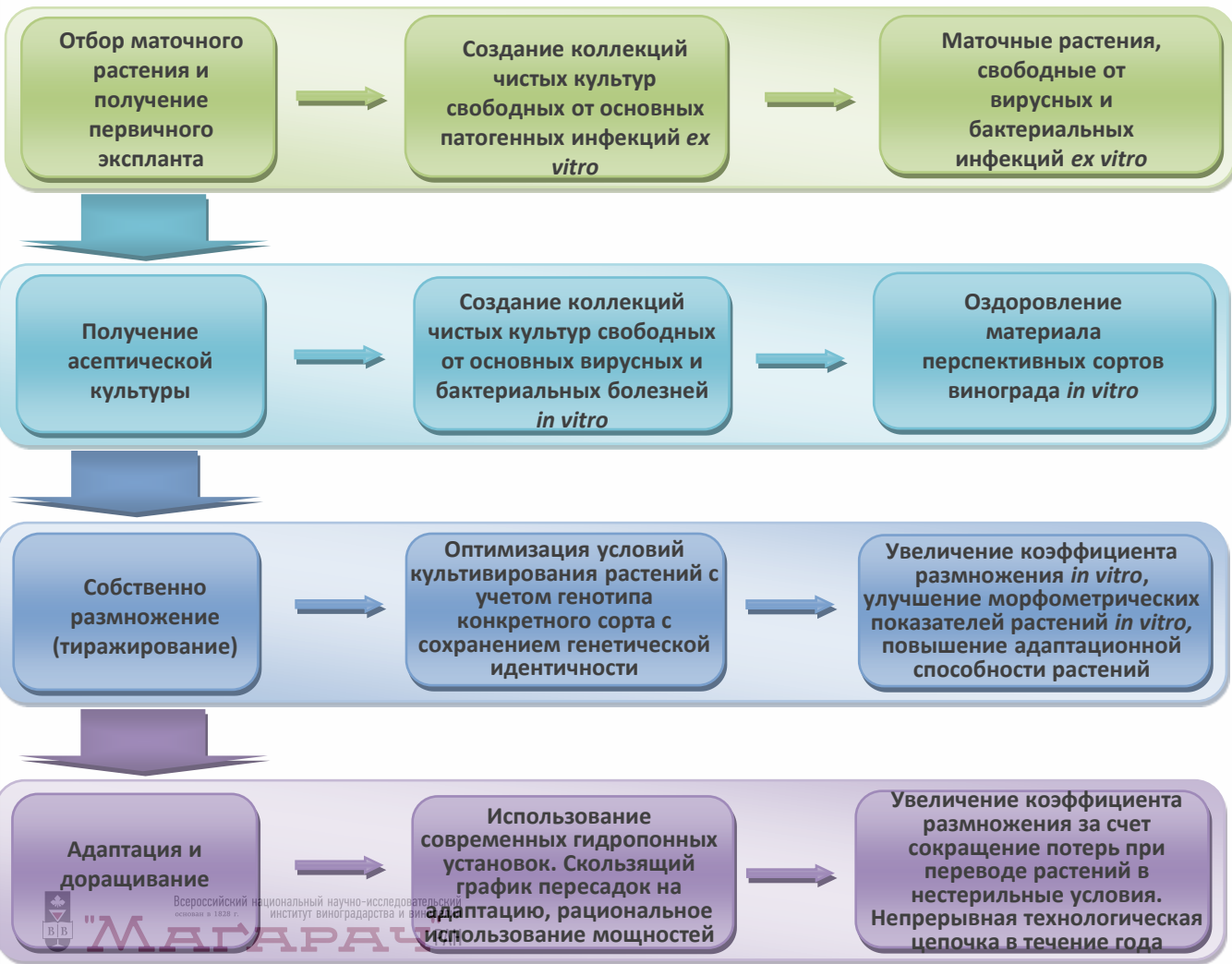
Подвой	Концентрация ИВА, мг/л	Длина побега, см	Количество узлов, шт.	Количество корней, шт.	Максимальная длина корня, см
Гравесак 11	1,00	2,85±2,47	3,05±1,36	3,24±4,73	2,19±2,06
	2,00	2,31±1,87	2,95±1,15	3,62±5,90	1,51±2,48
	3,00	2,93±2,07	3,38±1,14	3,95±5,26	2,25±1,97
	4,00	3,86±2,04	3,33±1,50	6,48±3,83	2,94±1,88
	контроль	3,83±2,93	4,67±1,55	3,24±1,58	3,04±1,64
Гравесак 12	1,00	3,50±1,97	3,81±1,36	4,24±3,33	2,98±1,61
	2,00	3,55±1,63	3,71±1,32	7,24±3,69	3,50±2,05
	3,00	3,80±2,27	3,90±1,36	7,24±3,57	2,17±1,89
	4,00	3,43±2,62	3,43±1,35	5,00±3,52	2,44±2,01
	контроль	4,60±1,73	3,76±1,39	3,24±2,00	3,62±1,95



Гравесак 11,
4,00 мг/л ИВА



Гравесак 11,
0,05 мг/л НАА
(контроль)



Стратегия повышения эффективности технологии клонального микроразмножения винограда, г. Ялта, 2023 г.

Экономическая эффективность производства посадочного материала винограда категории «Исходный» с использованием вегетирующей коллекции (в расчете на 1000 микроклонов), г. Ялта, 2023 г.

17

Показатели	Исходный посадочный материал из черенков однолетней лозы	Исходный посадочный материал с использованием вегетирующей коллекции
Выход саженцев, шт./1000 шт. растений <i>in vitro</i>	850,00	850,00
Реализационная цена саженцев, руб./шт.	450,00	450,00
Стоимость продукции с 1000 шт. растений <i>in vitro</i> , руб.	382500,00	382500,00
Производственные затраты на 1000 шт. растений, руб., в том числе:	262947,25	198897,51
введение в культуру <i>in vitro</i> , руб.:	1549,74	0
– проращивание черенков	4,84	0
– введение	868,98	0
– укоренение	675,92	0
заработная плата на 1000 шт. растений, руб.	237500,00	175000,00
питательная среда и реактивы на 1000 шт. растений, руб.	2678,25	2678,25
тара, фольга на 1000 шт. растений, руб.	3485,00	3485,00
электроэнергия на 1000 шт. растений, руб.	5304,62	5304,62
вода на 1000 шт. растений, руб.	1,61	1,61
преадаптация в климатической камере, руб.	1479,03	1479,03
адаптация к условиям <i>in vivo</i> , руб.:	10949,00	10949,00
– тара	3125,00	3125,00
– субстрат	3352,00	3352,00
– электроэнергия	4455,88	4455,88
– вода	16,12	16,12
Себестоимость 1 саженца, руб.	262,95	198,90
Прибыль с 1000 шт. растений, руб.	119552,75	183602,49
Уровень рентабельности, %	171,13	226,24

Выводы и рекомендации

1. Установлено, что для получения растений винограда из недоразвитых семян раннеспелых исходных форм необходимо пять субкультивирований на различные варианты сред.
2. Установлено положительное действие никотиновой кислоты, Са-пантотената, аденина, D, L-фенилаланина и L-аргинина на развитие проэмбриогенного каллуса, соматических эмбриоидов и их превращение в проростки.
3. Установлено, что все полученные трансгенные линии экспрессируют целевой ген, экспрессия гена *cspA-plant* способна существенно повысить морозоустойчивость винограда, наиболее значимым критерием оценки морозостойкости оказался показатель повреждения холодом почек молодых побегов трансгенных и контрольных растений.
4. Созданная ранее вегетирующая коллекция винограда *in vitro*, пополненная 14 новыми образцами и на данный момент представленная растительным материалом 144 сортов, гибридов и клонов, рекомендуется для сохранения уникального генофонда и его тиражирования.
5. Разработанная стратегия повышения эффективности клонального микроразмножения винограда направлена на увеличение коэффициента размножения *in vitro*, адаптационной способности растений к условиям *ex vitro*, что приведет к сокращению производственных затрат.
6. Разработаны обновленные методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда, предназначенные как для научных исследований, так и для производства.

Научные труды, конференции, гранты и сотрудничество

- Опубликовано 5 научных трудов.
- Сделано 4 доклада на международных научных конференциях.
- Два сотрудника повысили квалификацию по программе «Репродуктивная биология растений» в ФГБНУ ВНИИСБ.
- Совместно с другими лабораториями принимали участие в выполнении гранта в форме субсидии Минобрнауки РФ «Селекционно-семеноводческий центр в области виноградарства и питомниководства» (№ 09.ССЦ.21.0027), сумма гранта в 2023 году 29841 тыс. руб.; выращена 1 тыс. шт. растений *in vitro* виноградного подвоя Феркаль.
- В 2023 г. заложен растениями подвоя Кобер 5ББ, полученными в условиях *in vitro*, участок площадью 10,23 га категории «Оригинальный/Исходный».
- Заключен 1 хоздоговор на сумму 80 тыс. руб.
- Сотрудничество с Никитским ботаническим садом - ННЦ РАН (Договор о творческом сотрудничестве № 36-М/18 от 10.08.2019 г.), по которому осуществляется создание новых форм винограда.
- Сотрудничество с ООО «Биоагротех» (Договор о сотрудничестве №209/2022 от 12.10.2022г.), предметом которого является выращивание растений *in vitro* виноградного подвоя Феркаль в теплицах, принадлежащих ООО «Биоагротех».

