

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ВИНОГРАДА

© 2023 г. В. В. Лиховской¹, В. А. Зленко¹, Г. Ю. Спотарь¹, В. П. Клименко^{1,*}

¹Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия “Магарач” РАН, Ялта, Россия

*E-mail: vikklim@magarach-institut.ru

Поступила в редакцию 10.11.2022 г.

После доработки 10.02.2023 г.

Принята к публикации 10.02.2023 г.

В результате исследований с применением культур колхицинированных проэмбриогенных клеточных суспензий и соматических глобулярных эмбриоидов гибридной формы E-342 в вариантах жидких сред разработана универсальная методология развития глобулярных, сердцевидных и торпедовидных эмбриоидов у различных генотипов винограда. При помощи маркеров бессемянности MAS-селекции VMC7f2 и p3_VvAGL11 в популяции гибридных семян выявлены гибриды, имеющие аллели, сцепленные с признаком бессемянности.

DOI: 10.56304/S1992722323030068

ВВЕДЕНИЕ

Клеточные технологии, основанные на культивировании *in vitro* органов, тканей, клеток и изолированных протопластов высших растений, облегчают и ускоряют традиционный процесс создания новых сортов и видов, характеризуются высоким коэффициентом размножения и эффективно используются для сохранения генетических ресурсов растений [1]. Одним из актуальных направлений исследований является создание новых сортов винограда с высокими качественными показателями и устойчивостью к стресс-факторам среды для расширения сортамента и импортозамещения. Вследствие большой гетерогенности сортов винограда методики регенерации растений из проэмбриогенного каллуса путем соматического эмбриогенеза разработаны для незначительного количества генотипов и имеют специфичность в применении различных регуляторов роста [2, 3]. Получены результаты по созданию биотехнологическими методами крупноплодных бессемянных полиплоидных сортов винограда [4].

Обработка колхицином меристемных тканей апикальных и аксиллярных почек, а также соматических эмбриоидов в культуре *in vitro* приводит к развитию химерных по плоидности регенерантов у представителей различных видов и семейств растений, в том числе у винограда. Воздействие колхицина на проэмбриогенные клетки суспензионных культур приводит к регенерации истинных автополиплоидов. Для столовых сортов методики,

предполагающие получение суспензионной культуры проэмбриогенных клеток, обработку их колхицином и развитие из них соматических эмбриоидов в жидкой среде с последующей регенерацией полиплоидных растений, не разработаны. Разработка универсальной методологии индукции соматического эмбриогенеза у различных генотипов винограда позволит не только создать полиплоидные крупноплодные, бессемянные столовые сорта винограда, но и в будущем использовать в генной инженерии для получения качественно новых устойчивых к биотическим и абиотическим факторам внешней среды генотипов винограда [5].

Для снижения затрат и увеличения эффективности селекционных программ планируется внедрение в селекционный процесс молекулярно-генетических методов для отбора гибридных форм на ранних стадиях развития растения на основе маркеров MAS-селекции (Marker assisted selection). Благодаря последним научным достижениям были найдены маркеры MAS-селекции, сцепленные с локусами и генами, определяющими хозяйственно-ценные признаки винограда: бессемянность, вкус, пол, а также резистентность к грибным и бактериальным фитопатогенам [10–13].

Цель данного исследования – совершенствование технологий создания новых сортов винограда с использованием современных методов.

МЕТОДЫ

В работе исследовали сорта и гибриды винограда как внутривидовые (вид *Vitis vinifera* L.), так и сложного межвидового происхождения в пределах рода *Vitis* L., которые используются в селекционных программах для получения гибридных популяций и в биотехнологических экспериментах для создания новых форм, а также виноградные подвои.

Место проведения опытов: лаборатория генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда (институт “Магарач”) г. Ялта.

Обработку клеток суспензионных культур колхицином проводили на основании протокола для сорта винограда Mencía [3]. В связи с генотипической специфичностью различных сортов винограда на определенных этапах соматического эмбриогенеза и регенерации растений из клеток суспензионных культур, обработанных колхицином, использовали различные концентрации регуляторов роста и других биологически активных веществ.

Выделение ДНК из свежих листьев винограда осуществляли модифицированным СТАБ-методом (2%) [16]. Для генотипирования сортов использовали стандартный набор из девяти ядерных (nSSR) маркеров: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62 и VrZAG79 [17].

Мультиплексную ПЦР проводили на амплификаторе T100 (BIO-RAD, США) при следующих условиях: денатурация при 95°C – 5 мин; 35 циклов при 95°C – 30 с (денатурация), 58.5°C – 30 с (отжиг), 72°C – 45 с (элонгация); при 72°C – 15 мин (окончательная элонгация). Амплификация была проведена в общем реакционном объеме 15 мкл с использованием 2.5-кратной реакционной смеси (ООО “Синтол”), в реакцию брали 20 нг ДНК.

Разделение продуктов амплификации выполняли методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США) в полимере ПДМА-6 (ООО “Синтол”). Определение длин аллелей проводили в программном приложении GeneMapper (Version 4.0). Стандартизация размеров аллелей была выполнена с использованием распространенных референсных сортов согласно рекомендациям VIVC [18]. Для идентификации сорта полученный профиль формы сравнивали с данными из каталога VIVC и имеющимися результатами генотипирования сортов НИИ “Магарач”.

Для выявления однонуклеотидных полиморфизмов (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) SNP 3_5494608, SNP 7_13408919, SNP 7_4261424 использовали метод секвенирования по Сэнгеру с помощью специально разработанных пар праймеров, фланкирующих последовательности дли-

ной 433–475 пар нуклеотидов (п.н.). Постановку ПЦР проводили на амплификаторе T100 (BIO-RAD, США) в общем реакционном объеме 15 мкл при следующих условиях: 95°C – 5 мин; 36 циклов: 95°C – 30 с, 63–64°C – 30 с, 72°C – 35 с; 72°C – 15 мин.

Очистку продуктов амплификации проводили на колонках набора реагентов “ColGen” (ООО “Синтол”, Россия) согласно инструкции по применению.

Для постановки сиквенсовой (терминирующей) реакции использовали набор BrilliantDye V. 3.1 Cycle Sequencing Kit (NimaGen, Голландия) согласно протоколу производителя. Сиквенсовую реакцию осуществляли на амплификаторе T100 (BIO-RAD, США). Очистку продуктов сиквенсовой реакции проводили методом этанол/ацетат Na-преципитации согласно протоколу. После чего высушенную пробу растворяли в 10 мкл формамида и денатурировали 5 мин при 94°C. Секвенирование осуществляли на четырехкапиллярном генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США) в полимере ПДМА-6 (ООО “Синтол”, Россия).

Результаты секвенирования обрабатывали в программном приложении Sequencing Analysis Software V. 5.3.1. Выравнивание прочтений на референсный геном PN40024 12X (GCF_000003745.3) из базы данных NCBI и анализ SNP выполняли в программе Unipro UGENE V. 34.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 10 (“Statsoft”, Inc., США). Опыты проводили в трехкратной повторности. Достоверность разницы между вариантами оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия между вариантами считали статистически значимыми при уровне достоверности $p \leq 0.05$ [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эмбриогенез и полиплоидия винограда

С применением культур колхицинированных проэмбриогенных клеточных суспензий и соматических глобулярных эмбрионов гибридной формы E-342 в вариантах жидких сред разработали универсальную методологию развития глобулярных, сердцевидных и торпедовидных эмбрионов у различных генотипов винограда.

Варианты жидких сред с основами сред NN и PG различались содержанием минеральных веществ и витаминов (полная концентрация или 25% концентрации); наличием и концентрацией биологически активных веществ, в частности ВАР (0, 0.2, 0.5 мг/л), IAA (0, 0.1 мг/л), гумата натрия (0, 30 мг/л), FA (0, 5 мг/л), витаминов (наличие или отсутствие) и препарата Nutridrink (0, 0.2, 0.4, 1.0, 1.5 г/л).

Универсальность методологии индукции полиплоидии и соматического эмбриогенеза у различных генотипов винограда обеспечивается добавлением в среды органического азота и других биологических активных веществ из продукта для диетического питания Nutridrink в концентрации 0.4–1.5 г/л и FA в концентрации 5.0 мг/л на этапах развития проэмбриогенного каллуса из эксплантов (листьев, черешков листьев, междуузлий и т.д.), клеточных суспензий, колхицинирования и развития соматических эмбриоидов в жидких средах.

Для недопущения превращения проэмбриогенных колхицинированных клеток в паренхиматические и соматических эмбриоидов в каллус необходимым оказалось четырехкратное разбавление минеральных элементов и витаминов. Одним из определяющих факторов является снижение концентрации неорганического азота в среде.

Основа среды NN больше подходит для развития проэмбриогенных каллусов из эксплантов и колхицинирования суспензий клеток и растворов, а основа среды PG – для превращения зачаточных глобулярных эмбриоидов в сердцевидные и затем в торпедовидные.

После колхицинирования клеток в суспензиях или в случаях культивирования клеток в суспензиях с 2,4-Д для других целей необходимым является этап их субкультивирования в среду без регуляторов роста для развития из проэмбриогенных клеток зачаточных глобулярных эмбриоидов.

Для дальнейшего развития эмбриоидов подтверждена необходимость последовательной смены регуляторов роста в средах в процессе повторных субкультивирований:

- для развития глобулярных и сердцевидных эмбриоидов (0.5 мг/л BAP) (рис. 1);
- для развития торпедовидных эмбриоидов (0.1 мг/л IAA) (рис. 2);
- для выведения эмбриоидов из состояния покоя и развития проростков с зелеными гипокотильями и семядолями (0.2 мг/л BAP или 0.2 мг/л BAP и 0.2 мг/л GA);
- для развития побегов у проростков (0.5 мг/л BAP).

Геномная и маркер-ассоциированная селекция

Для снижения затрат и увеличения эффективности селекционных программ планируется внедрение в селекционный процесс молекулярно-генетических методов для отбора гибридных форм на ранних стадиях развития растения на основе маркеров MAS-селекции. В настоящее время имеются два наиболее эффективных маркера MAS-селекции по бессемянности: *r3_vVAGL11* и *VMC7F2*. В 2021 г. при их помощи были генотипированы гибридные сеянцы популяции Флора × Ru-



Рис. 1. Развитие глобулярных и сердцевидных эмбриоидов в жидкой среде NN, сорт винограда Мускат Крыма.

by seedless F₁ скрещивания типа “семенной × бессемянный”.

Из восьми гибридов популяции у четырех обнаружены аллели бессемянности по двум маркерам. Размер бессемянной аллели для этих маркеров составляет 198 п.н. Маркеры *r3_vVAGL11* и *VMC7F2* показали идентичный результат. Таким образом, 50% гибридов имеют аллели бессемянности: 34-11-7-33, 34-11-7-42, 34-11-7-52, 34-11-7-55. Использование маркеров MAS-селекции в данной селекционной программе позволило бы сократить площади посадки и трудо-, энергозатраты в 2 раза.

Исследовали возможность использования одонуклеотидных замен (SNP), ассоциированных с устойчивостью к виноградной филлоксере, для оценки родительских генотипов. Для выявления SNP применили метод секвенирования по Сэнгеру локусов на хромосомах LG7, LG3.

По результатам исследований SNP 7_13408919 не является информативным и во всех восьми сортах и формах различного происхождения гомозиготен (Т/Т). Наиболее контрастные сорта по происхождению Дикси (*M. rotundifolia*) и Нимранг (*V. vinifera*) различаются только по одному SNP 3_5494608 – С/С и С/Т соответственно. Из исследуемых сортов и форм интрогрессию от *M. rotundifolia* несут формы 2000-305-143, 2000-305-163 и сорт Дикси. Указанные формы и сорт Дикси расходятся по SNP 3_5494608, так как у этих форм – С/Т. Таких генотипов SNP[^], как у сорта Дикси, в исследуемых сортах больше не встречается: SNP 3_5494608 (С/С), SNP 7_13408919 (Т/Т), SNP 7_4261424 (С/С).

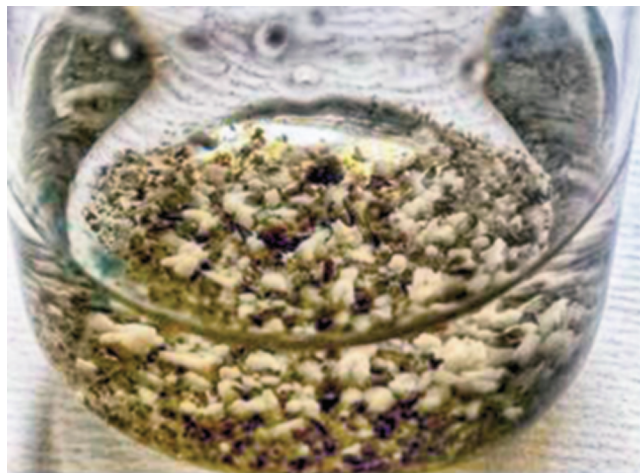


Рис. 2. Развитие торпедовидных эмбриоидов из сердцевидных после двух повторных субкультивирований в жидкую среду РG, гибридная форма винограда E-342.

По наследованию SNP в первой родительской линии сорт Магараж 31-77-10 унаследовал SNP от сорта Нимранг (*V. vinifera*), а не от межвидового гибрида Зейбель 13-666. Во второй родительской линии Регент унаследовал SNP от сорта Шамбургсен, однако потомкам – формам 2000-305-143, 2000-305-163 – генотип SNP 7_4261424 не передался: у сорта Регент – С/Т, у форм – С/С.

При прочтении последовательности у сорта Регент возле локализации SNP 7_13408919 выявлен характерный только для этого сорта SNP (Т/С), отстоящий на 17 п.н. У сорта Дикси по сравнению с другими изучаемыми сортами в исследованных локусах выявлено наибольшее число различий с референсным геномом PN40024, что вполне согласуется с различным генетическим расстоянием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В области совершенствования селекционного процесса особое внимание уделяется выявлению генетических закономерностей наследования ценных признаков винограда с использованием методов геномной и маркер-ассоциированной селекции, геномного редактирования, аутбридинга, индукции полиплоидии. В дальнейшей работе планируются тестирование локусов, ассоциированных с генами резистентности к фитопатогенам, и локусов, определяющих хозяйственно-ценные признаки; внедрение практики генотипирования исходных форм перед гибридизацией

для оценки чистосортности; исследования по созданию маркеров и обнаружению SNP, ассоциированных с ценными признаками, при отборе гибридов на ранних стадиях развития.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клименко В.П., Павлова И.А. // Магараж. Виноградарство и виноделие. 2015. № 3. С. 47.
2. Зленко В.А., Лиховской В.В., Вольнкин В.А. и др. // Биотехнология. 2017. № 5. С. 35. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2017-33-5-35-44>
3. Acanda Y., Martinez O., Ganzalez M.U. et al. // Plant Cell Tiss. Org. 2015. V. 123. P. 547. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0859-3>
4. Chen J., Tang X., Ma X. et al. // Prog. and Abst. 10th Int. Conf. on Grapevine Breeding and Genetics. New York, USA. 2010. P. 161.
5. Решетников В.Н., Спиридович Е.В., Носов А.М. // Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46. № 1. С. 3.
6. Скабкин М.А., Скабкина О.В., Овчинников Л.П. // Успехи биологической химии. 2004. Т. 44. С. 3.
7. Рыжова Н.Н., Филошин М.А., Артемьева А.М. и др. // Молекулярная биология. 2013. Т. 47. № 1. С. 107.
8. Castiglioni P., Warner D., Bensen R.J. et al. // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 446.
9. Kim M.H., Sasaki K., Imai R. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 23454.
10. Mejía N., Soto B., Guerrero M. et al. // BMC Plant Biology. 2011. V. 11. P. 57. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-57>
11. Rubio B., Lalanne-Tisné G., Voisin R. et al. // BMC Plant Biol. 2020. V. 20. P. 213.
12. Smith H.M., Clarke C.W., Smith B.P. et al. // BMC Plant Biol. 2018. V. 18. P. 360.
13. Vasylyk I., Gorislavets S., Matveikina E. et al. // Horticulturae. 2022. V. 8. № 16. P. 16. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8010016>
14. Клименко В.П., Луцай Е.А., Абдурашитова А.С. // Магараж. Виноградарство и виноделие. 2021. № 4. С. 322. <https://doi.org/10.35547/IM.2021.23.4.003>
15. Edwards K., Johnstone C., Thompson C. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 349.
16. Rogers S.O., Bendich A.J. // Plant Mol. Biol. 1985. V. 5. № 2. P. 69.
17. This P., Jung A., Voccacci P. et al. Theor. Appl. Genet. 2004. V. 109. № 7. P. 1448.
18. Vitis International Variety Catalogue VIVC. Julius Kuhn-Institute. <http://www.vivc.de/index.php>.
19. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.