

Обзорная статья

УДК 634.8:581.1

DOI: 10.30901/2658-6266-2022-4-01



Регенерация винограда в культуре *in vitro*

Т. В. Коваленко¹, Н. Г. Тихонова^{1,2}, Е. К. Хлесткина^{1,2}, Ю. В. Ухатова^{1,2}¹Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия²Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия**Автор, ответственный за переписку:** Коваленко Татьяна Владимировна kovalenko.tv@talantiuspeh.ru

Учитывая мировой и российский опыт сохранения образцов винограда, одним из наиболее надежных способов является создание дублетной *in vitro* коллекции. Однако, в связи с созданием дублетных коллекций винограда и развитием методик геномного редактирования, существует необходимость подбора оптимального состава среды, позволяющего получать при введении растений винограда в культуру *in vitro* максимальный коэффициент каллусообразования и регенерации. Это позволит получить необходимое количество материала для дальнейшего редактирования и последующей регенерации растений с нокаутом целевых генов с целью улучшения хозяйственно ценных признаков. Для винограда это прежде всего повышение устойчивости к возбудителю мучнистой росы *Uncinula necator* Burill. Изучено влияние на морфогенез многих сельскохозяйственных культур активных веществ биологического и синтетического происхождения, в том числе и для растений-регенерантов рода *Vitis* L. Однако, род *Vitis* очень разнообразен и неоднороден по своей генетической и физиолого-морфологической структуре, вследствие чего рекомендуемые среды и компоненты для выращивания в условиях *in vitro* могут подходить не каждому сорту. Местные российские сорта винограда лучше подходят к локальным условиям выращивания, поэтому следует сосредоточить усилия на отработке методик, связанных с сохранением местных сортов в условиях коллекций *in vitro*. Знание природы генов, контролирующих определенные признаки, как и наличие образцов винограда, геном которых секвенирован, способствуют успешному проведению *in silico* анализа для создания редактирующих конструкций.

Ключевые слова: регенерация, *in vitro*, ампелографическая коллекция, *Vitis* L.

Для цитирования: Коваленко Т.В., Тихонова Н.Г., Хлесткина Е.К., Ухатова Ю.В. Регенерация винограда в культуре *in vitro*. Биотехнология и селекция растений. 2022;5(4):39-54. DOI: 10.30901/2658-6266-2022-4-01

Прозрачность финансовой деятельности. Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы.

© Коваленко Т.В., Тихонова Н.Г., Хлесткина Е.К., Ухатова Ю.В., 2022

Review article

DOI: 10.30901/2658-6266-2022-4-01

In vitro regeneration of grape

Tatiana V. Kovalenko¹, Nadezhda G. Tikhonova^{1,2}, Elena K. Khlestkina^{1,2}, Yulia V. Ukhatova^{1,2}¹Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia²N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia**Corresponding author:** Kovalenko Tatiana Vladimirovna: kovalenko.tv@talantiuspeh.ru

Considering the global and Russian experience in grape accessions preservation, one of the most reliable ways is the creation of a duplicate *in vitro* collection. However, in connection with the creation of duplicate grape collections and development of genome editing techniques, there is a need for selecting the most optimal medium composition that will ensure the maximum rate of callus formation and regeneration during the introduction of grape plants into *in vitro* culture. This will make it possible to obtain the necessary amount of material for further editing and subsequent regeneration of plants with knockout of target genes to improve economically valuable traits. For grapes, this is primarily an increase in resistance to powdery mildew caused by *Uncinula necator* Burill. The effect of active substances of biological and synthetic origin on the morphogenesis has been studied for many crops, including regenerant plants of the genus *Vitis* L. However, the genus *Vitis* is very diverse and heterogeneous in its genetic, physiological and morphological structure, as a result of which the recommended media and components for cultivation under *in vitro* conditions may not suit every cultivar. Local Russian grape cultivars are better suited to local growing conditions, so efforts should be focused on the development of techniques related to the preservation of local varieties in collections *in vitro*. Knowledge of genes controlling certain traits, as well as the availability of grape accessions whose genome has been sequenced, contribute to successful *in silico* analysis for creating editing constructs.

Key words: regeneration, *in vitro*, ampelographic collection, *Vitis* L.

For citation: Kovalenko T.V., Tikhonova N.G., Khlestkina E.K., Ukhatova Yu.V. *In vitro* regeneration of grape. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2022;5(4):39-54. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2022-4-01

Financial transparency. The authors have no financial interest in the presented materials or methods. The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employers.

© Kovalenko T.V., Tikhonova N.G., Khlestkina E.K., Ukhatova Yu.V., 2022

Введение

В современном мире генная инженерия винограда является мощной альтернативой традиционной селекции растений. Благодаря ей появилась возможность внедрения полезных агрономических признаков в сорта без изменения ключевых характеристик. Длительное время селекция винограда двигалась в направлении интрогрессии в геном восприимчивых к неблагоприятным условиям образцов генов устойчивости к биотическому стрессу от родителей-доноров (Saporta et al., 2016). Однако, длительные ювенильный период и репродуктивный цикл, высокие уровни гетерозиготности и интрогрессии нежелательных генов в период проведения скрещивания затрудняли применение традиционных методов селекции винограда (Rai, Shekhawat, 2014).

Генетическая трансформация может помочь преодолеть эти недостатки. Предпосылкой успешной генетической трансформации любого вида растений является наличие эффективного и воспроизводимого генотип-специфичного протокола для регенерации *in vitro*. Регенерация растений винограда в культуре *in vitro* ранее достигалась путем индукции регенерации придаточных побегов посредством соматического эмбриогенеза из разных эксплантов, таких как тычиночные нити (Saporta et al., 2016). Однако использование таких побегов в качестве исходного материала для индукции соматических эмбриогенных каллусов было сопряжено с рядом недостатков: во-первых, необходимость в специалистах высокой квалификации для выбора правильной стадии цветения; во-вторых, трудоемкость и трудозатратность поддержания эмбриогенных культур. Кроме того, этот метод оказался неприменим к некоторым генотипам винограда (Iocco et al., 2001).

Были разработаны протоколы для регенерации винограда *in vitro* путем прямого или непрямого органогенеза из листьев и черешков (Stamp, 1990), апикальных фрагментов побегов (Barlass, Skene, 1980; Dodueva et al., 2016) и междоузлий (Rajasekaran, Mullins, 1981).

Высокая эффективность регенерации была достигнута путем органогенеза меристематической ткани, полученной с помощью культивирования верхушек побегов на средах, содержащих повышенные концентрации цитокининов (Mezzetti et al., 2002). При этом происходит формирование большого количества побегов, что делает этот метод пригодным для экспериментов по геномному редактированию растений винограда. Однако, высокие концентрации цитокининов и, в частности 6-БАП, могут приводить к мутагенезу (Marchenko, 2008), что необходимо учитывать в работе.

В связи с созданием дублетных коллекций винограда и развитием методик геномного редактирования, существует необходимость в подборе оптимального состава среды, позволяющего добиться, при введении растений винограда в культуру *in vitro*, максимального коэффициента каллусообразования и регенерации. Это позволит

получить необходимое количество материала для дальнейшего редактирования, нокаута целевых генов и последующей регенерации таких растений, направленной на улучшение хозяйственно ценных признаков. Знание природы генов, контролирующих определенные признаки, как и наличие образцов винограда, геном которых секвенирован, способствует успешному проведению *in silico* анализа для создания редактирующих конструкций.

Цель настоящего обзора – систематизировать существующие данные литературы об известных коллекциях винограда, в том числе дублетных, поддерживаемых в условиях культуры *in vitro*, а также о достигнутых успехах в изучении генов винограда, влияющих на регенерационные процессы.

Существующие коллекции винограда в России

Ампелографическая коллекция – воспроизведение культурных форм, диких видов винограда, предназначенных для изучения и выделения наиболее ценных из них. Ампелографическая коллекция решает задачи сохранения генофонда растений, селекции новых сортов, способных пополнить сортимент промышленного виноградарства за счёт форм с повышенной адаптацией к природным и почвенно-климатическим условиям участков возделывания.

В настоящее время российский генофонд винограда, суммарно насчитывающий свыше 10000 образцов (Agakhanov, 2022), сосредоточен в разных регионах Российской Федерации:

- Образцы, сохраняемые в коллекции ВИР: филиалы ВИР расположены в г. Крымске (Крымская опытно-селекционная станция – филиал ВИР), г. Владивостоке (Дальневосточная опытная станция – филиал ВИР), г. Дербент (Дагестанская опытная станция (ОС) – филиал ВИР);
- Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарах» Российской академии наук расположен в с. Вилино, Республика Крым;
- Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия имени Я.И. Потапенко – филиал ФГБНУ «Федеральный Ростовский аграрный научный центр» (ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко) расположен в г. Новочеркасске.
- Анапская зональная опытная станция виноградарства и виноделия – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия» (ФГБНУ СКФНЦСВВ), расположен в г. Анапа.
- «Дагестанская селекционная опытная станция виноградарства и овощеводства» – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия» (ДСОСВИО – филиал ФГБНУ СКФНЦСВВ), расположен в г. Дербент.

Состав ампелографических коллекций опытных станций ВИР. На территории Крымской опытно-селекционной станции сохранялось порядка 688 образцов, входящих в разные эколого-географические группы (Negrul et al., 1946). Среди них для селекционных работ наибольший интерес представляли образцы, обладающие генами устойчивости к разным типам мучнистой росы, милдью или ложной (возбудитель – *Plasmopara viticola* de Bary), и оидиум или истинной (возбудитель – *Uncinula necator* Burill., синонимичное название *Erysiphe necator* Schweinitz, в конидиальной стадии – *Oidium tuckeri* Berk.). Источником данных генов устойчивости является вид *Vitis rotundifolia* Michx. (Agakhanov, 2022). Состав коллекции в настоящее время представлен в основном сортами европейско-азиатского происхождения, относящимися к виду *V. vinifera* L. Сорта и гибриды других видов рода *Vitis* L. составляют менее 2%, из которых большинство приходится на американский вид *V. labrusca* L. (Agakhanov, 2022).

Ампелографическая коллекция Дагестанской ОС является одной из самых крупных в системе ВИР. В настоящее время на территории опытной станции поддерживают и изучают 345 образцов винограда, при этом 320 являются сортами, 82 из которых – автохтонные, а 25 образцов – дикорастущие. Важной особенностью ампелографической коллекции Дагестанской ОС является поддержание образцов винограда в корнесобственной культуре, для оценки их устойчивости к филлоксеру (Agakhanov, 2022). Дальневосточная ОС – филиал ВИР – на сегодняшний день включает 214 образцов винограда, среди которых наибольший интерес представляют образцы *V. amurensis* Rupr. Данный вид неприхотлив и имеет хорошие показатели адаптации к различным климатическим условиям, однако не отличается зимостойкостью в условиях юга России, так как распускающиеся рано почки часто попадают под возвратные заморозки и погибают (Agakhanov, 2022).

Биоразнообразие ампелографической коллекции «Магарач». Всего ампелографическая коллекция «Магарач» содержит 4120 образцов: 3357 образцов – базовая коллекция винограда и 763 образца – специальная селекционная коллекция (которая включает сорта и формы селекции института «Магарач»). Семейство Vitaceae Lindley в ампелографической коллекции «Магарач» представлены тремя видами рода *Ampelopsis* Michaux; двумя видами рода *Parthenocissus* Planch. и 22 видами рода *Vitis* L. Род *Vitis* в коллекции представлен видами трех групп: американской, восточно-азиатской и европейско-азиатской. В ампелографической коллекции также есть местные сорта трёх эколого-географических групп вида *V. vinifera* – бассейна Черного моря (249), восточной эколого-географической группы (407) и западной эколого-географической группы (101) (URL: [\[institut.ru/ampelograficheskaja-kollekcija-magarach\]\(http://institut.ru/ampelograficheskaja-kollekcija-magarach\) \[дата обращения: 30.11.2022\]; Negrul et al., 1946\).](http://magarach-</p></div><div data-bbox=)

Биоразнообразие ампелографической коллекции ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко. Коллекция представлена сортами и формами более чем из 40 стран мира. Наибольшее количество образцов сортов из России (338), Молдавии (61), Узбекистана (43), Франции (40), Грузии (39), Украины (35), Венгрии (34), США (32), Армении (31), Болгарии (18).

В коллекции представлены высококачественные аборигенные образцы, из которых выделяют преимущественно донские сорта винограда – ‘Сибирьковский’, ‘Кумшацкий белый’, ‘Варюшкин’, ‘Пухляковский’, ‘Шампанчик Цимлянский’, ‘Цимлянский черный’ и другие. Эти сорта используются в промышленном виноградарстве. Вина и другая продукция на основе перечисленных сортов поставляются на отечественный и зарубежный рынки (URL: <https://rusvine.ru/брк> [дата обращения: 30.11.2022]).

Биоразнообразие ампелографической коллекции Анапской станции филиала ФГБНУ СКФНЦСВВ.

На сегодняшний день в ампелографической коллекции Анапской зональной ОС виноградарства и виноделия – филиала ФГБНУ СКФНЦСВВ, сохраняемый генофонд винограда насчитывает 4941 образец, в том числе: столового направления – 3162 генотипа, технического направления – 1726, сорта-подвои – 53. Три четверти генофонда Анапской станции филиала ФГБНУ СКФНЦСВВ до 2009 года занимали сорта *V. vinifera* европейско-азиатского происхождения. Эти сорта являлись доминирующими в коллекции (Egorov et al., 2009).

В настоящее время ампелографическая коллекция винограда включает 17 сортов, которые являются источниками селекционно-ценных признаков (URL: http://azosviv.info/vzglyad_v_istoriyu.html [дата обращения: 30.11.2022]). Эта коллекция, одна из самых крупных в России, была создана по инициативе ВИР в 1995 году и находится в Анапе. В ее состав входят сорта, интродуцированные из коллекций Туркменской и Дальневосточной ОС ВИР, которые собирали и сохраняли сотрудники института (Nosulchak et al., 2007).

Биоразнообразие ампелографической коллекции Дагестанской селекционной опытной станции виноградарства и овощеводства филиала ФГБНУ СКФНЦСВВ.

Дагестанская селекционная ОС виноградарства и овощеводства является филиалом ФГБНУ СКФНЦСВВ с 7 февраля 2017 года. В настоящее время коллекция насчитывает 535 сортов и гибридных форм винограда, которые служат основой для проведения селекционных, агротехнических и физиологических исследований. Из них более 70 являются автохтонными. В коллекции в основном представлены технические сорта, более 60%, однако есть столовые и столово-винные сорта, которые вместе занимают третью часть. Особую ценность коллек-

ции представляют бессемянные сорта, которые пользуются повышенным интересом: 'Кишмиш розовый', 'Кишмиш черный', 'Кишмиш белый', 'Кишмиш лучистый', 'Кишмиш дербентский' и другие (URL: <https://dagsosvio.ru> [дата обращения: 22.02.2023]).

Необходимость создания дублетных коллекций *in vitro* для надежного сохранения образцов винограда: мировой и российский опыт

Генетические ресурсы растений служат стратегической базой эффективного стабильного развития не только сельского хозяйства, но и всех отраслей экономики и социальной сферы Российской Федерации и мира в целом. Многие успешные программы по селекции растений через 50-70 лет будут переживать период упадка, если не предпринять усилий, направленных на надежное сохранение агробиоразнообразия и привлечение генов из других источников. В системе адаптивной селекции, как отмечал А.А. Жученко (Zhuchenko, 1988), особое внимание должно быть уделено поиску, сохранению, идентификации и использованию соответствующих геноисточников.

В 1999 году на XVI Международном ботаническом конгрессе отмечалось, что необходимо принять решительные меры по сохранению видового разнообразия растений. Если этого не сделать, то к середине XXI века могут быть утрачены до 2/3 из 300 тысяч видов растений, произрастающих в настоящее время на Земле (Revin et al., 2000).

Проблемы, связанные с разрушением природных местообитаний, попытками сокращения размеров существующих заповедных территорий, с организацией создания новых и управления ими, с необходимостью восстановления численности видов, по-прежнему актуальны, однако решать их необходимо с учетом важности и срочности принимаемых мер, с расстановкой приоритетов и поиском новых подходов и инструментов для сохранения биоразнообразия (Heywood, Iriondo, 2003). Одним из таких новых подходов является использование биотехнологий. В настоящее время развивается биотехнология сохранения растений, основной задачей которой является дополнение существующих традиционных методов сохранения биоразнообразия *ex situ* и *in situ* современными биотехнологическими инструментами, обеспечивающими возможность устойчивого управления генетическими ресурсами (Benson et al., 2000). Технологии *in vitro* в системе *ex situ* коллекций играют важную роль как неотъемлемая часть стратегии сохранения генофонда растений.

В мире существуют разнообразные коллекции генофонда растений. Они варьируют от относительно небольших рабочих коллекций, используемых селекционерами для их непосредственных нужд и не всегда предназначенных для длительного хранения, до широкомасштабных законсервированных коллекций, содер-

жащих целый спектр генотипов. В последнем случае, насущной необходимостью является обеспечение коллекций материалом, находящимся под угрозой исчезновения с тем, чтобы он был легкодоступен для удовлетворения более специфических потребностей рабочих коллекций. Поэтому коллекция генофонда растений должна обладать динамикой. Весьма желателен постоянный международный обмен материалом.

Длительное хранение живой ткани в виде семян в настоящее время технически разрешимо для большинства видов сельскохозяйственных культур. Несмотря на большие преимущества банков семян по сравнению с другими методами сохранения *ex situ*, следует отметить, что их содержание затратно из-за высоких расходов на электроэнергию и техническое обслуживание холодильных установок, на квалифицированное обслуживание самой коллекции, требующей регулярное тестирование на всхожесть, проведение регенерации семян и прочих процедур, на другие нужды. К тому же существует риск полной или частичной потери коллекций при воздействии экстремальных факторов среды. В качестве примера можно привести гибель почти половины банка семян в Японии из-за перебоев в электроснабжении, вызванных катастрофическим цунами, обрушившимся на побережье Японии весной 2011 года (Kershengolts et al., 2011).

Длительное хранение вегетативного материала требует большего постоянного внимания, чем хранение семян при низкой температуре. Исследования F.D. Amato с соавторами (Amato et al., 1975), R. Galzy с соавторами (Galzy et al., 1985), показали, что очень нестабильными при хранении могут быть искусственно культивируемые слабоорганизованные ткани и клетки. Генетическая нестабильность их может быть результатом трех факторов: генетической изменчивости клеток экспланта, мутагенного действия условий культивирования *in vitro* и влияния отбора *in vitro*. Организованные культуры, в которых размножение основано на образовании пазушных стеблевых меристем, в целом более пригодны для длительного сохранения генофонда растений.

Примеры из библиографии, приведенные в статье R. Galzy с соавторами (Galzy et al., 1985), свидетельствуют о том, что для сохранения клонов растительный материал должен быть получен из меристем, взятых от целого растения, а выращиваемая культура, насколько возможно, ограждена от действия фитогормонов. Исключительно из экономических соображений желательно, чтобы культуры во время хранения требовали бы минимального ухода. Хранение культуры в нерастущем состоянии – «приостановленной жизни» – обладает значительными преимуществами как в отношении стоимости процедуры, так и снижения частоты мутаций. Криосохранение в жидком азоте позволяет достичь такого состояния, однако в настоящее время методы ещё недостаточно разработаны для универсального применения, в частности, при работе с организованными культурами (Ukhatova, Gavrilenko, 2018).

В настоящее время сохраняемые в генетических бан-

ках коллекции генетических ресурсов растений принято подразделять на три типа: базовые, активные и дублетные. Базовые коллекции сохраняют в условиях, обеспечивающих их длительное хранение (long-term conservation), доступ к ним предельно ограничен. Активные коллекции служат для восстановления, размножения, рассылки и изучения образцов; они сохраняются в условиях, обеспечивающих среднесрочное хранение (medium-term conservation). Дублетные коллекции хранят отдельно от базовой коллекции с целью увеличения надежности хранения (FAO, 2014).

Применительно к коллекциям вегетативно размножаемых культурных растений, в базовые коллекции включают все образцы, сохраняемые в полевых условиях (Plekhanova, 2002), и образцы, заложенные на хранение при температуре -196°C (при развитии методов надежно-го криосохранения).

Коллекции *in vitro* создают как часть активной и дублетной коллекций. Состав и размер *in vitro* коллекций определяется структурой стержневой коллекции генофонда каждой культуры, требованиями международного обмена, необходимостью оздоровления, размножения и дублирования наиболее ценных экземпляров полевой коллекции. Коллекции *in vitro* обеспечивают сохранение оздоровленных от патогенов образцов вегетативно размножаемых растений в контролируемых условиях среды. В крупных мировых генбанках присутствуют все три системы хранения генетического материала культурных растений, размножаемых вегетативно (полевые, *in vitro* и криоколлекции), поскольку каждая из перечисленных выше систем хранения имеет свои преимущества и недостатки (Gavrilenko et al., 2007).

Генофонд плодовых и ягодных культур умеренного климата представлен преимущественно полевыми коллекциями и сосредоточен в генбанках и научно-исследовательских институтах. Наиболее трудоемкие и дорогие криоколлекции и коллекции *in vitro*, как правило, немногочисленны по сравнению с полевыми коллекциями и поддерживаются не во всех подразделениях, сохраняющих генофонд ягодных и плодовых культур.

Международным институтом генетических ресурсов растений (IPGRI)¹, издано специальное пособие для внедрения программы сохранения генетического разнообразия в условиях хозяйства (on farm) с целью вовлечения фермеров в национальные программы по сохранению биоразнообразия и селекции (Jarvis et al., 2000).

Возможность создания банка культур *in vitro* для длительного хранения генофонда растений является важнейшим достижением биотехнологии (Gavrilenko et al., 2007).

В качестве объектов используются: редкие или исчезающие виды растений; виды с рекальцитрантными семе-

нами; виды, имеющие проблемы с семенным или вегетативным размножением; элитные генотипы растений или растения, полученные с помощью генетической инженерии (Kashin et al., 2001). Если цикл «введение в культуру *in vitro* – микроразмножение» не включал каллусной стадии и был основан на развитии микрорастений из меристем (организованных тканей), то полученные микроклоны, как правило, сохраняют все генотипические характеристики исходного образца (Vysotsky, Vysotskaya, 2002). Поэтому этот способ охраны генотипов в условиях *in vitro* является общепринятым (Reed, Chang, 1997).

Исследователи Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина (ГБС РАН), Волгоградского регионального ботанического сада, Центра сохранения генетических ресурсов растений (Vetchinkina et al., 2008) отмечают, что хранение ценных форм растений *in vitro* является высокоэффективным и полезным способом для содержания коллекций растений и сохранения биологического разнообразия. Е.М. Ветчинкина и О.И. Молканова (Vetchinkina, Molkanova, 2008) доказали преимущество и рекомендуют использование эмбриокультуры в условиях *in vitro* для сохранения биоразнообразия представителей семейств Iridaceae Juss., Paeoniaceae L., Litaceae Juss. Генетический банк растений *in vitro* в ГБС РАН формировался с 1996 года и по настоящее время является уникальным и наиболее представительным в России. Он содержит 153 вида, 1157 сортов и отборных форм, относящихся к 183 родам и 61 семейству. Около 70% коллекции *in vitro* относится к фиторесурсным видам. Наиболее полно представлены семейства: Actinidiaceae, Asteraceae, Caprifoliaceae, Ericaceae, Hydrangeaceae, Liliaceae, Oleaceae, Rosaceae (Molkanova et al., 2019).

Н.А. Вечёрко с соавторами (Vechyorko et al., 2008) усовершенствовали метод микроклонального размножения, который позволил оздоравливать, размножать перспективные сорта и формы, сохранять биоразнообразие яблони в Казахстане. Исследование эффективности клонального микроразмножения для сохранения редких, эндемичных и находящихся под угрозой исчезновения видов Прибайкалья осуществляется в Сибирском институте физиологии биохимии растений (Gamburg et al., 2008).

Методы биотехнологии используются для сохранения и воспроизводства ценного генофонда видов берез, трудно размножаемых быстрорастущих триплоидных форм тополя, продуктивных гибридов осины (Mashkina et al., 2016). Технологии *in vitro* позволяют одновременно достичь высокого уровня мультипликации растительного материала и освобождения от вирусных, бактериальных и грибных заболеваний (Butenko et al., 1999). Миниатюризация эксплантов значительно экономит рабочее пространство, затраты на труд для поддержания коллек-

¹ От редактора: IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) с 2006 года, называется Bioversity International. Информацию можно получить на сайте IFPRI (International Food Policy Research Institute)/ Editor's note: IPGRI since 2006 is named Bioversity International. For information visit IFPRI at URL: <https://www.ifpri.org/publisher-source/international-plant-genetic-resources-institute-ipgri> [дата обращения 2022]

ций. Протоколы микроразмножения, разработанные для нескольких тысяч растений, включая редкие и исчезающие формы, служат основой для успешного введения в культуру, размножения и сохранения в банке культур *in vitro* новых образцов (George et al., 2008).

Так, в коллекции Королевского ботанического сада (Кью, Великобритания) в банке *in vitro* поддерживается свыше трех тысяч таксонов, большинство из которых – редкие и исчезающие виды (Chen et al., 1994).

Количество исследований по винограду в этом направлении не столь значительно. Это исследования зарубежных авторов (Barlass, Skene, 1979; Galzy et al., 1985; Blaich et al., 1985; Alleweldt, Harst-Langenbucher, 1987), а также отечественных ученых, внесших вклад в разработку методик клонального микроразмножения образцов (Golodriga et al., 1986; Marchenko et al., 1987; Marchenko, 2008; Medvedeva et al., 2008). В настоящее время коллекции винограда *in vitro* создаются во Всероссийском национальном научно-исследовательском институте виноградарства и виноделия «Магарах» РАН из сортов, гибридных форм селекции института, сортов-подвоев, а также клонов технических сортов.

Разрабатываются способы увеличения сроков хранения медленно растущей коллекции ценных сортов и клонов винограда в культуре *in vitro*. В Национальном научном центре «Институт виноградарства и виноделия имени В.Е. Таирова Национальной академии аграрных наук Украины» изучают методы хранения коллекционного материала винограда в культуре *in vitro*. Опубликованы результаты исследований хранения ценных генотипов винограда, показавшие, что большая их часть, из числа изученных, способна к эффективному размножению в стерильных условиях (Pavlova, Klimenko, 2009). Разрабатываются методы создания и сохранения коллекции генофонда винограда *in vitro* в лаборатории биотехнологии ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко с использованием апикальных меристем, как исходных эксплантов для размножения и сохранения ценных образцов (Zelenyanskaya et al., 2016). Работы по созданию *in vitro* коллекций винограда инициированы при оптимизации протоколов введения в асептические условия 10 автохтонных сортов винограда в ВИР (Agakhanov, 2022).

Исследования G. Alleweldt, M. Harst-Langenbucher (Alleweldt, Harst-Langenbucher, 1987) направлены на изучение влияния ингибиторов роста на жизнеспособность эксплантов с целью оптимизации продолжительности хранения. В качестве ингибиторов применяли хлорхлинхлорид и алар. Изучены различные концентрации ингибиторов и температуры хранения. Получены положительные результаты: применение хлорхлинхлорида в концентрации 0,5–1,0 г/л повышало срок беспересадочного хранения жизнеспособных микрорастений винограда. Вопросам среднесрочного хранения образцов винограда в культуре *in vitro* посвящена работа французских ученых (Iacob et al., 1989), которые исследовали хранение образцов в темноте при 8°C в течение различных проме-

жутков времени (1-8 месяцев) и последующий характер роста растений винограда. M. Harst-Langenbucher (Harst-Langenbucher, 1982) исследовал долгосрочное хранение 35 сортов винограда и установил оптимальные условия предварительного поддержания образцов в культуре и их хранения без пересадок в течение 12 месяцев.

В статье «Генетические ресурсы мира» D. Jane Bower (Bower, 1989) отмечает необходимость координации усилий по созданию соответствующих баз данных, включающих характеристики образцов растений, сведения об условиях роста, хранения и другую информацию, а также улучшение доступа к ним через автоматизированные информационные сети. P.L. Forsline (Forsline, 1988) сообщает, что национальное хранилище генофонда (National Center for Genome Resources, NCGR) в штате Нью-Йорк начало работы по сохранению коллекций генофонда яблони и винограда, полученных клоновым путем из национальных и межнациональных источников, и поддержанию этого генофонда на плантациях, в оранжереях и теплицах, а также оценке этого генофонда с точки зрения его чистоты, сохранности вида и характеристик. Сообщено о сохранении 800 сортов винограда. Г.В. Ерёмин с соавторами (Yeremin et al., 1991), описывая сохранение генофонда и улучшение сортимента плодовых и ягодных культур в США, обращают внимание на то, что проблема хранения генофонда решена в 1986 году в национальном масштабе. Генофонд сельскохозяйственных культур создан при помощи национальной системы генофонда, состоящей из восьми хранилищ, четырех региональных станций и других лабораторий. Чтобы достигнуть большего эффекта и снизить затраты при длительном хранении генофонда, необходимо освободить растительный материал от вирусов и быстро размножить его. При этом обязательными считаются методы культуры тканей, криоконсервация, информационный банк данных.

Условия роста исходного материала, включая питательную среду и свет, могут оказывать значительное влияние на регенерационную способность микропобегов и протопластов (Reed, Bargmann, 2021). Когда речь идет о регенерации растений из каллуса, полученного из протопластов, будь то эмбриогенный или соматический каллус, состав среды может определять эффективность регенерации. В большинстве методов используются твердые среды на основе минеральных компонентов, предложенных Т. Murashige и F. Skoog (Murashige, Skoog, 1962), дополненные ауксином и цитокинином.

Некоторые методы включают добавление других компонентов в среду для регенерации, которые будут способствовать росту и дифференцировке каллуса. Активированный уголь является распространенной добавкой, обладающей способностью предотвращать потемнение каллуса путем адсорбции ингибиторов роста (Prange et al., 2010; Masani et al., 2013). М.У.А. Masani с соавторами (Masani et al., 2013) оптимизировали протокол регенерации жизнеспособных растений масличной пальмы из протопластов, полученных из суспензионных куль-

тур клеток. Регенерацию проростков из микрокаллусов осуществляли путем соматического эмбриогенеза после последовательных стадий субкультивирования на среде с ограниченным содержанием регуляторов роста и с добавлением 200 мг/л аскорбиновой кислоты. Исследователи обнаружили, что аскорбиновая кислота увеличивает количество эмбрионных каллусов, что впоследствии повышает эффективность регенерации растений из протопластов, полученных из суспензии эмбрионных клеток.

Изучено влияние активных веществ биологического и синтетического происхождения на морфогенез многих культур, в том числе и для растений-регенерантов рода *Vitis*. Однако, представители рода *Vitis* характеризуются значительной изменчивостью и разнообразием физиологических и морфологических признаков, вследствие чего рекомендуемые среды и компоненты для выращивания в условиях *in vitro* могут подходить не каждому сорту.

Чаще всего для *in vitro* регенерации винограда применяют цитокинины (БАП, кинетин, ТДЗ), ауксины (ИМК, ИУК, НУК) и гиббереллины (ГК)².

Ювенильное состояние микрорастений в коллекциях *in vitro* не позволяет идентифицировать сорта по морфологическим признакам пробирочных растений. Использование белковых (изоферментных) (Vysotskaya et al, 1994) и ДНК-маркеров (Butenko et al., 1999; Craig et al, 2005; Pnitskaya, Makarkina, 2016) является эффективным широко используемым подходом для идентификации и регистрации образцов в коллекциях *in vitro*. Молекулярные маркеры используют также и для контроля генетической стабильности *in vitro* образцов, длительно сохраняемых в контролируемых условиях среды. Результаты немногочисленных работ по оценке генетической стабильности образцов после хранения в культуре *in vitro* (микро-растения) или после криохранения (меристемы, пыльца) не выявили генетических изменений по сравнению с контрольными растениями, представленными полевыми аналогами данных образцов (Orlikowska et al., 1991).

Соматическая изменчивость – потенциальное явление при регенерации микрорастений и протопластов, которое может проявляться в изменениях морфологических признаков или вариации уровня пloidности (Prange et al., 2010; Tomiczak et al., 2015; Barceló et al., 2019; Sheng et al., 2021). Полиплоидизация во время образования каллуса, является результатом эндоредупликации (амплификации ДНК без митоза) в клетках каллуса, что было показано ранее у гороха (*Pisum sativum* L.) (Ochatt et al., 2000) и люцерны (*Medicago truncatula* Gaertn.) (Ochatt et al., 2000; Elmaghrabi et al., 2022). Было показано, что регуляторы роста растений, обычно добавляемые в питательные среды для культивирования протопластов, оказывают влияние на частоту эндоредупликации

у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) (Lukaszewska et al., 2012). Дупликация генома во время культивирования протопластов связана с более быстрым делением тетраплоидных протопластов по сравнению с диплоидными, что было показано у табака (*Nicotiana plumbaginifolia* Viv.) (Sala et al., 1982) и рапса (*Brassica napus* L.) (Magnien et al., 1982; Chen et al., 2016).

Время в культуре ткани увеличивает шансы самоклональной изменчивости. Поэтому выделение протопластов из ткани растения предпочтительней их выделения из ткани каллуса, поскольку отсутствие дополнительной стадии *in vitro*, которая требуется для получения каллуса, позволило бы избежать самоклональной вариации. Хотя такая изменчивость нежелательна в коммерческом растениеводстве, ее преимущество в эксперименте заключается в создании фенотипической изменчивости с большим количеством регенерантов, которые могут быть получены из протопластов. Самоклональная изменчивость дает потенциал для идентификации мутаций, которые могут быть полезны для различных целей, таких как биотическая, абиотическая устойчивость (Kielkowska, Adamus, 2019) или создание желаемого декоративного свойства.

С появлением CRISPR/Cas9 и связанной с ним технологии редактирования генов появилась возможность прямой модификации геномов сельскохозяйственных культур, что открыло новую эру в селекции и сельском хозяйстве (Zhang et al., 2019). Эти передовые технологии селекции растений создали основу для фундаментальных и трансляционных исследований, которые ранее были недоступны. В отличие от трансгенных подходов, генетическое редактирование позволяет ускорить вывод новых линий сельскохозяйственных культур на рынок (Lassoued et al., 2021).

Использование регенерации протопластов в селекции имеет многообещающее будущее. Этот метод использовался во многих приложениях редактирования генов для улучшения характеристик сельскохозяйственных культур; например, для нокаута гена *BIN2*, кодирующего один из стероидных гормонов у салата (*Lactuca sativa* L.) (Woo et al., 2016), гена крахмалсинтазы (GBSS) в картофеле (Andersson et al., 2018), а также олиго-направленного мутагенеза гена 5-енолпирувилкишкват-3-фосфатсинтазы (EPSPS) у льна (*Linum usitatissimum* L.) (Sauer et al., 2016). Последнее с высокой частотой делало растения-регенеранты устойчивыми к гербициду глифосату.

Тем не менее, существуют препятствия, которые необходимо устранить, чтобы преодолеть некоторые проблемы, связанные с регенерацией растений из протопластов. В целом, эти методы, применительно к отдельным генотипам, очень специфичны и их необходимо сделать более универсальными для повышения применимости и эффективности. Эктопическая экспрессия эмбрионных или

² От авторов: БАП - 6-бензиламинопурин; ТДЗ – тидиазурон; ИМК - индолил-3-масляная кислота; ИУК - β-индолилуксусная кислота; НУК - нафталинуксусная кислота; ГК - гиббереллиновая кислота. Authors' notes: BAP -6-benzylaminopurine; TDZ – Thidiazuron; IBA - indolyl-3-butyric acid; IAA - β-indoleacetic acid; NAA - naphthaleneacetic acid; GA - gibberellic acid.

морфогенных факторов потенциально может сделать технологию регенерации растений из протопластов универсальной. В связи с этим важное значение приобретает работа по идентификации факторов, переключающих рост каллуса с вегетативного на эмбриогенный. Теоретически, если достаточное количество протопластов может непосредственно развиться в эмбрионы, частота регенерации увеличится, что приведет к большому количеству ростков-регенерантов. Прямое превращение протопластов в эмбрионы также может сократить время культивирования тканей, уменьшая потенциал соматической изменчивости (Boutillier et al., 2002).

Знание природы генов, контролирующих определенные хозяйственно-ценные признаки, как и наличие образцов винограда, геном которых секвенирован, способствует в дальнейшем успешному проведению *in silico* анализа для создания редактирующих конструкций. В рамках настоящего обзора рассмотрим известные генетические механизмы контроля регенерации растений применительно к винограду.

Известные гены и генетические механизмы контроля регенерации растений

Способность тканей растений к регенерации *in vitro* существенно различается между видами и внутри видов и зависит от применяемых условий культивирования. Понимание генетических факторов, лежащих в основе этой изменчивости, может помочь улучшить многочисленные биотехнологические приложения, использующие регенерацию *in vitro*. Различают два типа факторов, которые способствуют естественной регенеративной изменчивости: основные регуляторы, которые сохраняются во всех экспериментальных системах (например, гомеобоксные гены, родственные *WUSCHEL*) и условные регуляторы, относительная роль которых зависит от экспланта и условий инкубации (Lardon, Geelen, 2020).

Клональное размножение и генная инженерия растений требуют регенерации, но она затруднена для некоторых видов, и существует большая вариабельность реакций эксплантов. Потенциально новыми генами, ответственными за регенерационную способность являются *AT3G09925*, *SUP*, *EDA40* и *DOF4.4*.

Нарушение *AT3G09925*, *QKY*, *RLP9* или *WAVH2* вызывает значительные изменения в формировании побегов *de novo*, но ни одна из линий полностью не утратила свою регенерационную способность, возможно, из-за избыточности генов или неполной потери функции. Визуальный осмотр эксплантов позволил предположить, что, в то время как *QKY* влияет только на рост каллуса, *AT3G09925* и *RLP9* активны на стадии формирования зародыша, а *WAVH2* определяет как инициацию, так и развитие побегов. Эти результаты показали, что многие детерминанты регенерации сильно зависят от генотипа. Поэтому было сделано предположение, что только

небольшой набор основных регуляторов, таких как *WUS*, имеет решающее значение для проявления регенерационной способности определенного мутанта, равно как растений дикого типа, в различных условиях (Lardon et al., 2020).

Понимание физиологических, клеточных и молекулярных механизмов регенерации растений важно для решения оставшихся без ответа фундаментальных вопросов клеточной биологии и биологии развития. В дополнение к гормонально-опосредованной индукции соматического эмбриогенеза, рост соматических эмбрионов также может ускоряться за счет сверхэкспрессии генов специфических факторов транскрипции (англ. TF), таких как гомеодомен-содержащие *WUSCHEL* (*WUS*), AP2 TFs *PLETHORA 4/ BABY BOOM* (*PLT4/ BBM*), *PLT5/ EMBRYO MAKER* (*PLT5/ EMK*), *MADS box TF AGAMOUS-LIKE 15* (*AGL15*), регуляторов эмбриогенеза *LEC1*, *LEC2* и гена *SERK1*, кодирующего рецептор-подобную киназу 1 соматического эмбриогенеза (Lotan et al., 1998; Hecht et al., 2001; Stone et al., 2001; Boutillier et al., 2002; Harding et al., 2003; Thakare et al., 2008; Tsuwamoto et al., 2010; Shan et al., 2013).

Было показано (Mozgova et al., 2017), что активность репрессивного белкового комплекса PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2), известного как эпигенетический процессор фазовых переходов развития у растений (Xiao, Wagner, 2015), создает препятствие для опосредованного гормонами транскрипционного перепрограммирования эмбриогенеза в вегетативной ткани *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Обнаружение молекулярных механизмов контроля процесса соматического эмбриогенеза станет одним из наиболее важных подходов к выявлению факторов, контролирующих эмбриогенез *in vitro*. Результаты анализа генов, отвечающих за передачу сигналов от места повреждения, показали, что ранение значительно влияет на регенерацию растений (Iwase et al., 2011). Однако информации о том, как сигналы, исходящие от места повреждения, влияют на регенерацию растений *in vitro*, все еще недостаточно (Xu, Huang, 2014; Lup et al., 2016).

М. Ikeuchi с соавторами (Ikeuchi et al., 2017), используя анализ транскриптома и количественный анализ спектра гормонов, показали, что образование каллуса, вызванное повреждением ткани у арабидопсиса, является результатом изменения экспрессии генов, участвующих в биосинтезе гормонов. Это, в свою очередь, приводит к усиленному накоплению цитокинина, исключительно важного для образования каллуса, вызванного раной. L. Xu и H. Huang (Xu, Huang, 2014) сообщили об осуществлении краткосрочной и долгосрочной передачи сигналов от раны в процессе регенерации растений. Кратковременная передача сигналов от раны состоит из трех этапов. Стадия 1 длится несколько часов, и сигнал от раны быстро распространяется от места раны к клеткам мезофилла и активирует там экспрессию генов *YUCCA1* (*YUC1*) и *YUC4*. На стадии 2 экспрессия генов, кодиру-

ющих факторы транскрипции YUCs вызывает выработку ауксина в течение 4 часов, а затем направленную его передачу к регенерирующим клеткам вокруг места раны приблизительно в течение 12 часов после ранения. На стадии 3, когда ауксин достигает регенерирующих клеток, экспрессия родственных *WUSCHEL* гомеобокс-содержащих генов *WOX11* и *WOX12*, вызывает изменение специализации клеток примерно через 1-2 дня после ранения (Liu et al., 2014). Во время долговременной передачи сигналов от раны активируется экспрессия гена *YUC4*, а также группы генов транскрипционных факторов NAC (NAM, ATAF1, ATAF2 и CUC2), включая NAC1, которые присутствуют в клетках вблизи места раны. Задачей NAC1 является контроль процесса пролиферации посредством метаболизма клеточной стенки (Xu, Huang, 2014). Экспрессия генов факторов транскрипции *YUC4* приводит к высокому накоплению ауксина в регенерирующих клетках (Chen et al., 2016). Корреляция между активацией NAC1 и *YUC4* для производства ауксина остается загадкой, которую необходимо прояснить в будущем (Xu,

Huang, 2014). Недавно В. Rymen с соавторами (Rymen et al., 2019) выявили у растений эпигенетический механизм индуцированного повреждением клеточного перепрограммирования. Они подтвердили экспрессию некоторых индуцированных раной генов транскрипционных факторов, таких как WIND1, H3K9/14ac и H3K27ac, сразу после ранения эксплантата. Тем не менее, ранение оказывает сложное биологическое воздействие и выполняет множество задач в регенерации растений, но то, как рана повторно активирует клеточную пролиферацию и ускоряет клеточное перепрограммирование, пока не очень ясно. Необходимы детальные исследования для того, чтобы прояснить все аспекты этого процесса (Ikeuchi et al., 2017; Bidabadi, Jain, 2020).

Как видно из таблицы, к настоящему времени известно много генов, ответственных за регенерацию у винограда. Для поиска новых генов, кодирующих процессы регенерации, важно проанализировать действие таких генов у других видов растений (см. таблица).

Таблица. Гены, участвующие в контроле регенерации у винограда

Table. Genes controlling regeneration in grapes

Гены, семейства генов/ Genes, gene families	Функция/ Function
Системы <i>WOX-CLAVATA</i>	- консервативные для разных меристем регуляторные гены, которые обеспечивают размер и постоянство состава меристемы, а также баланс пролиферации и дифференцировки стволовых клеток; - поддержание меристем и их взаимодействие с другими меристемными регуляторами (Dodueva et al., 2016)
<i>WUS</i> <i>WOX5</i>	- кодируют гомеодомен-содержащие транскрипционные факторы (ТФ, англ. TF), действие которых приурочено к апикальной меристеме побега (ПАМ ТФ WUS) и апикальной меристеме корня (КАМ ТФ WOX5) - возникновение <i>de novo</i> организующего центра апикальной меристемы из потомков дифференцированных клеток связано с возобновлением экспрессии генов <i>WUS</i> и <i>WOX5</i> (Dodueva et al., 2016)
<i>WOX4</i>	- регулирует развитие латеральных меристем (ЛМ) – прокамбия и камбия (Dodueva et al., 2016)
<i>WOX8</i> и <i>WOX9</i>	- являются регуляторами первичной разметки зародыша (Dodueva et al., 2016)
<i>WOX</i> и <i>PIN</i>	- показано их участие в процессах соматического эмбриогенеза у <i>Medicago truncatula</i> (Tvorogova et al., 2016)
<i>IDA</i> и <i>CEP</i>	- вовлечены в процессы развития меристем растений (Gancheva et al., 2019)
<i>PIP</i>	- ортологи генов <i>PIP</i> выявлены у винограда - участвуют исключительно в ответе на широкий круг патогенов - экспрессия гена <i>PIP1</i> наблюдается в проводящих тканях, что позволяет предположить, что PIP1 является мобильным сигналом, вовлеченным в системный иммунный ответ (Gancheva et al., 2019)
<i>VvP5CS</i> <i>VvOAT</i> <i>VvP5CDH</i>	- способствуют накоплению пролина (Pro). Накопление Pro защищает растительную клетку при абиотическом стрессе. Эти результаты подтвердили, что проростки-регенеранты из мутантных каллусов, имевших повышенное содержание Pro в клетках, приобрели также и солеустойчивость (Wang et al., 2018)

Гены, семейства генов/ Genes, gene families	Функция/ Function
<i>VvZIP36</i>	- действует как отрицательный регулятор биосинтеза антоцианов - нокаут одного аллеля <i>VvZIP36</i> в виноградной лозе с использованием технологии CRISPR/Cas9 способствовал накоплению антоцианов (Tu et al., 2022)
<i>VvCCD8</i>	- играет ключевую роль в контроле ветвления побегов виноградной лозы (Ren et al., 2020)
<i>VvLBD</i> (<i>LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN</i>)	- кодируют факторы транскрипции, играющие ключевую роль в регуляции развития органов растений, развития пыльцы, регенерации растений, метаболизма антоцианов и азота, ответной реакции на патоген, (Grimplet et al., 2017)
<i>VvTCP</i>	- могут играть важную роль в росте и развитии растений (Leng et al., 2019)
<i>VvAP2/ERF</i>	- кодируют факторы транскрипции, которые играют решающую роль в росте и развитии растений и в ответ на биотические и абиотические стрессовые условия у растений, связанны с созреванием ягод (Licausi et al., 2010)
<i>VvERF-VIIs</i>	- продукты генов служат переключателями и движущей силой для активации ингибированной меристемы во время раскрытия почек (Shi et al., 2020)

Информация о генах, участвующих в контроле процессов регенерации растений – важная составляющая, которая позволит более эффективно редактировать различные сорта и может способствовать в перспективе выходу виноградарства на новый уровень.

Виноград был использован для полногеномного поиска ассоциаций признаков с молекулярными генетическими маркерами, такими как однонуклеотидные полиморфизмы (Single Nucleotide Polymorphisms или SNPs). Была исследована связь таких изменений нормального развития растений, как хлороз листьев и задержка роста, вызванных дефицитом или накоплением макро- и микроэлементов, с последовательностями ДНК отдельных хромосом. Аномалии роста, обусловленные недостатком или избытком натрия и магния, оказались ассоциированными со всеми хромосомами, кроме 5, 7 и 17, с учетом 40% изменчивости, которая зависела от генотипа изученных образцов. Симптомы дефицита (или избытка) только натрия были связаны с SNP-маркерами хромосомы 3, а таковые магния – с SNP-маркерами хромосом 11 и 18 (Naegele et al., 2021). Аналогичный геномный поиск необходим и для признаков регенерационной способности.

В части изучения винограда необходимо выявление гомологов генов, известных для других видов растений, с целью их изучения и редактирования, направленного на повышение эффективности регенерации у винограда.

Заключение

Анализируя данные вышеперечисленных исследований, можно сделать вывод, что процессом регенерации растений в общем и винограда, в частности, можно управлять, манипулируя сигнальными путями, связанными с взаимодействием фитогормонов, повреждением эксплантов и запрограммированной гибелью клеток. Хотя ключевые регуляторы путей передачи сигналов гормонов были обнаружены ранее, требуется дополнительная работа,

чтобы понять, как они восстанавливают способность клеток к пролиферации.

Несмотря на огромный прорыв, ученым только предстоит узнать ответы на следующие вопросы: как экспланты понимают и передают эндогенные и экзогенные сигналы, и как они индуцируют или поддерживают дифференцировку клеток. Более того, полезно изучить различные механизмы как на молекулярном, так и на физиологическом уровнях, с помощью которых экспланты регулируют регенерацию *in vitro*. Перспективы редактирования генов в дифференцировке винограда следующие: преодоление генетической зависимости от регенерации растений *in vitro* посредством органогенеза, соматического эмбриогенеза, андрогенеза и регенерации протопластов. Отдельного внимания заслуживает вопрос подбора оптимальной питательной среды для каждого конкретного сорта. В то же время, наблюдается определенный прогресс в понимании процессов регенерации растений винограда в культуре *in vitro*, о чем свидетельствуют новые научные публикации.

References/Литература

- Agakhanov M.M. Genetic diversity and breeding value of accessions from the VIR ampelography collection [dissertation]. St. Petersburg: VIR; 2022. [in Russian] (Агаханов М.М. Генетическое разнообразие и селекционная ценность образцов ампелографической коллекции ВИР): дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург: ВИР; 2022).
- Allewelt G., Harst-Langenbuecher M. Der einfluss von *in vitro* wachstumsinhibitoren auf die zangzeit-lagerung von *in vitro* kulturen der rebe. *Vitis*. 1987;26(2):57-64. [In German]. DOI: 10.5073/vitis.1987.26.57-64
- Amato F.D. The problem of genetic stability in plant tissue and cell cultures. In: O.N. Franfel, I.G. Hawkes (eds.). Crop genetic resources for today and tomorrow. Cambridge University Press; 1975.
- Andersson M., Turesson H., Olsson N., Fält A.-S., Ohlsson P., Gonzalez M.N., Samuelsson M., Hofvander P. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiologia Plantarum*. 2018;164(4):378-384. DOI: 10.1111/ppl.12731

- Barceló M., Wallin A., Medina J.J., Gil-Ariza D.J., López-Casado G., Juárez J., Sánchez-Sevilla J.F., López-Encina C., López-Aranda J.M., Mercado J.A., Pliego-Alfaro F. Isolation and Culture of Strawberry Protoplasts and Field Evaluation of Regenerated Plants. *Scientia Horticulturae*. 2019;256:108-552. DOI: 10.1016/j.scienta.2019.108552
- Barlass M., Skene K.G.M. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine: I. The regenerative capacity of leaf primordial fragments *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*. 1980;31:483-488. DOI: 10.1093/jxb/31.2.483
- Barlass K.G.V., Skene K.G.M. Clonal propagation through tissue culture. *Australian Grape Grower and Winemaker*. 1979;16:12-13.
- Benson E.E., Danaher J.E., Pimbley I.M., Anderson C.T., Wake J.E., Daley S., Adams L.K. *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant. *Biodiversity and Conservation*. 2000;9:711-726. DOI: 10.1023/A:1008941726419
- Bidabadi S.S., Jain S.M. Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration. *Plants*. 2020;9(6):702. DOI: 10.3390/plants9060702
- Blaich R. Recherches sur les cultures de meristemes et d'organes de vigne *in vitro* en vue de la selection et de la conservation de genotypes. *Bulletin de l'O.I.V.* 1985;58(650/651):391-395. [In French]
- Boutillier K., Offringa R., Sharma V.K., Kieft H., Ouellet T., Zhang L., Hattori J., Liu C.M., van Lammeren A.A.M., Miki B.L.A., Custers J.B.M., van Lookeren Campagne M.M. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell*. 2002;14:1737-1749. DOI: 10.1105/tpc.001941
- Bower D.J. Genetic resources worldwide. *Trends in Biotechnology*. 1989;7(5):111-116. DOI: 10.1016/0167-7799(89)90084-X
- Butenko R.G. Biology of cells of higher plants *in vitro* and biotechnology on their basis. Moscow; 1999. [in Russian] (Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. Москва; 1999).
- Chen Z., Hsiao K.-C., Bormann C.H. Ploidy and division efficiency of petiolar protoplasts of *Brassica napus*. *Hereditas*. 1994;120:41-46. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1994.00041.x
- Chen L., Tong J., Xiao L., Ruan Y., Liu J., Zeng M., Huang H., Wang J.W., Xu L. YUCCA-mediated auxin biogenesis is required for cell fate transition occurring during *de novo* root organogenesis in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*. 2016;67:4273-4284. DOI: 10.1093/jxb/erw213
- Craig W., Gargano D., Scotti N., Nguyen T.T., Lao N.T., Kavanagh T.A., Dix T.A., Cardí T. Direct gene transfer in potato: a comparison of particle bombardment of leaf explants and PEG-mediated transformation of protoplasts. *Plant Cell Reports*. 2005;24:603-611. DOI: 10.1007/s00299-005-0018-0
- Dodueva I.E., Tvorogova V.E., Azarakhsh M., Lebedeva M.A., Lutova L.A. Plant stem cells: unity and diversity. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(4):441-458. [in Russian] (Додуева И.Е., Творогова В.Е., Азарахш М., Лебедева М.А., Лутова Л.А. Стволовые клетки растений: единство и многообразие. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(4):441-458). DOI: 10.18699/VJ16.172
- Egorov E.A., Ilyashenko O.M., Kovalenko A.G., Nosulchak V.A., Nud'ga T.A., Pankin M.I., Petrov V.S., Serpukhovitina K.A., Sundyreva M.A., Talash A.I., Troshin L.P. Anapa Ampelographic collection (Anapskaya Ampelograficheskaya kolleksiya). Krasnodar: NCRRIN & V Rosselkhozacademii; 2009. [In Russian] (Егоров Е.А., Ильяшенко О.М., Коваленко А.Г., Носулчак В.А., Нудьга Т.А., Панкин М.И., Петров В.С., Серпуховитина К.А., Сундырева М.А., Талаш А.И., Трошин Л.П. Анапская Ампелогографическая коллекция. Краснодар: СКЗНИИСиВ Россельхозакадемии; 2009).
- Elmaghrabi A., Ochatt S. Isoenzymes and flow cytometry for the assessment of true-to-typeness of calluses and cell suspensions of barrel medic prior to regeneration. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*. 2022;85:31-43. DOI: 10.1007/s11240-005-9046-2
- Forsline P.L. Progress in developing a national program for *Malus* and *Vitis* germplasm maintenance and evaluation in the USA. *Acta Horticulturae*. 1988;224:33-38. DOI: 10.17660/ActaHortic.1988.224.2
- Galzy R. Les possibilités de conservation *in vitro* d'une collection de clones de vignes. *Bulletin de l'O.I.V.* 1985;650-651:377-390. [In French]
- Gancheva M.S., Malovichko Y.V., Polushkevich L.O., Dodueva I.E., Lutova L.A., Plant peptide hormones. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2019;66(2):171-189. DOI: 10.1134/S1021443719010072
- Gavrilenko T.A., Dunaeva S.E., Truskinov E.V., Antonova O.Y., Pendinen G.I., Lupysheva J.V., Rogovaya V.V., Shvachko N.A. Strategy for long-term conservation of the gene pool of vegetatively propagated agricultural plants under controlled environmental conditions. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2007;164:273-285. [in Russian] (Гавриленко Т.А., Дунаева С.Е., Трускинов Э.В., Антонова О.Ю., Пендинен Г.И., Лупышева Ю.В., Роговая В.В., Швачко Н.А. Стратегия долгосрочного сохранения генофонда вегетативно размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2007;164:273-285).
- FAO, 2014. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rev. ed. Rome: FAO; 2014.
- Gamburg K.Z., Yurieva O.V., Kazanovsky S.G. The application of clonal micropropagation for conservation of rare, endemic and endangered plant species. In: *The IX International Conference «The Biology of plant cells in vitro and biotechnology»: Abstract; 2008 September 8-12; Zvenigorod, Russia*. Moscow; 2008. p.87. [in Russian] (Гамбург К.З., Юрьева О.В., Казановский С.Г. Использование клонального микроразмножения для сохранения редких и эндемичных видов, находящихся под угрозой исчезновения. В кн.: IX Международная конференция «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология»: тезисы; 8-12 сентября 2008 г.; Звенигород, Россия. Москва; 2008. С.86). URL: <https://ippras.ru/upload/files/Abstracts.pdf> [дата обращения: 27.11.2022].
- George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J. (eds). Plant propagation by tissue culture. Vol. 1. The Background. Springer Dordrecht; 2008. 502 p. DOI: 10.1007/978-1-4020-5005-3
- Golodriga P.Ya., Zlenko V.A., Chekmarev L.A., Butenko R.G., Levenko B.A., Peelin N.M. Guidelines for clonal micropropagation of grapes (Metodicheskiye rekomendatsii po klonalnomu mikrorazmnozheniyu vinograda). Yalta: Magarach; 1986. 56 p. [in Russian] (Голодрига П.Я., Зленко В.А., Чекмарев Л.А., Бутенко Р.Г., Левенко Б.А., Пилин Н.М. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда. Ялта: Магарах; 1986. 56 с.).
- Grimplet J., Pimentel D., Agudelo-Romero P., Martinez-Zapater J.M., Fortes A.M. The LATERAL ORGAN BOUNDARIES Domain gene family in grapevine: genome-wide characterization and expression analyses during developmental processes and stress responses. *Scientific Reports*. 2017;7(1):15968. DOI: 10.1038/s41598-017-16240-5
- Harding E.W., Tang W., Nichols K.W., Fernandez D.E., Perry S.E. Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of *AGAMOUS-Like 15*. *Plant Physiology*. 2003;133:653-663. DOI: 10.1104/pp.103.023499
- Harst-Langenbucher M. Long term storage of *in vitro* cultures of grapevines. Die Langzeit-lagerung von *in vitro* Kulturen der Rebe [dissertation]. 1982.
- Hecht V., Vielle-Calzada J.P., Hartog M.V., Schmidt E.D., Boutillier K., Grossniklaus U., de Vries S.C. The Arabidopsis *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology*. 2001;127:803-816. DOI: 10.1104/pp.010324
- Heywood V.H., Iriondo J.M. Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation*. 2003;113:321-335. DOI: 10.1016/S0006-3207(03)00121-6
- Iacob M., Deloire A., Caspar Th. Conservation au froid de la vigne en culture *in vitro*. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent*. 1989;54(2A):455-468. [In French]
- Ikeuchi M., Iwase A., Rymen B., Lambomez A., Kojima M.,

- Takebayashi Y., Heyman J., Watanabe S., Seo M., De Veylder L., Sakakibara H., Sugimoto K. Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes. *Plant Physiology*. 2017;175:1158-1174. DOI: 10.1104/pp.17.01035
- Initskay E.T., Makarkina M.V. Application of DNA-markers in molecular breeding and genetic studies of grapevine. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(4):528-536. [in Russian] (Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В. Применение ДНК-маркеров в современных селекционно-генетических исследованиях винограда. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(4):528-536). DOI: 10.18699/VJ16.163
- Iocco P., Franks T., Thomas M.R. Genetic transformation of major wine grape cultivars of *Vitis vinifera* L. *Transgenic Research*. 2001;10:105-112. DOI: 10.1023/A:1008989610340
- Iwase A., Mitsuda N., Koyama T., Hiratsu K., Kojima M., Arai T., Inoue Y., Seki M., Sakakibara H., Sugimoto K., Ohme-Takagi M. The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Current Biology*. 2011;21(6):508-514. DOI: 10.1016/j.cub.2011.02.020
- Jarvis D.I., Mayer L.Y., Klemik H., Guarino L., Smale M., Brown A.H.D., Sadiki M., Sthapit B., Hodgkin T. A training guide for *in situ* conservation on farm. Version 1. Rome: IPGRI; 2000.
- Kashin V.I., Borisova A.A., Prihodko YU.N., Surkova O.YU., Upadyshev M.T., Metlickaya K.V., Lapinskaya M.P., Tsubera L.V., Litvinenko I.S., Veretennikova N.P. Technological process of obtaining virus-free planting material of fruit and berry crops: Methodological guide (Tekhnologicheskiiy process polucheniya bezvirusnogo posadochnogo materiala plodovyykh i yagodynykh kultur: Metodicheskie ukazaniya). Moscow; 2001. [in Russian] (Кашин В.И., Борисова А.А., Приходько Ю.Н., Суркова О.Ю., Упадышев М.Т., Метлицкая К.В., Лапинская М.П., Цубера Л.В., Литвиненко И.С., Веретенникова Н.П. Технологический процесс получения безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур: методические указания. Москва; 2001).
- Kershengol'ts B.M., Remigailo P.A., Khlebniy E.S. A Seedbank in the Permafrost. *SCIENCE First Hand*. 2012;33(3). Available from: <https://scfh.ru/en/papers/a-seedbank-in-the-permafrost/> [accessed Nov. 15, 2022]. [in Russian] (Кершенгольц Б.М., Ремигайло П.А., Хлебный Е.С. Банк семян в вечной мерзлоте. *НАУКА из первых рук*. 2011;42(6):6-9). URL: <https://scfh.ru/papers/bank-semyan-v-vechnoy-merzlote> [дата обращения: 15.11.2022].
- Kielkowska A., Adamus A. Peptide growth factor phytosulfokine- α stimulates cell divisions and enhances regeneration from *B. oleracea* var. *capitata* L. protoplast culture. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2019;38:931-944. DOI: 10.1007/s00344-018-9903-y
- Lardon R., Geelen D. Natural variation in plant pluripotency and regeneration. *Plants*. 2020;24(10):1261. DOI: 10.3390/plants9101261
- Lardon R., Wijnker E., Keurentjes J., Geelen D. The genetic framework of shoot regeneration in *Arabidopsis* comprises master regulators and conditional fine-tuning factors. *Communications Biology*. 2020;3(1):549. DOI: 10.1038/s42003-020-01274-9
- Lassoued R., Phillips P.W.B., Macall D.M., Hessel H., Smyth S.J. Expert opinions on the regulation of plant genome editing. *Plant Biotechnology Journal*. 2021;19(6):1104-1109. DOI: 10.1111/pbi.13597
- Leng X., Wei H., Xu X., Ghuge S.A., Jia D., Liu G., Wang Y., Yuan Y. Genome-wide identification and transcript analysis of TCP transcription factors in grapevine. *BMC Genomics*. 2019;20(1):786. DOI: 10.1186/s12864-019-6159-2
- Licausi F., Giorgi F.M., Zenoni S., Osti F., Pezzotti M., Perata P. Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in *Vitis vinifera*. *BMC Genomics*. 2010;11:719. DOI: 10.1186/1471-2164-11-719
- Liu J., Sheng L., Xu Y., Li J., Yang Z., Huang H., Xu L. *WOX11* and *12* are involved in the first-step cell fate transition during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2014;26:1081-1093. DOI: 10.1105/tpc.114.122887
- Lotan T., Ohto M., Yee K.M., West M.A., Lo R., Kwong R.W., Yamagishi K., Fischer R.L., Goldberg R.B., Harada J.J. *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*. 1998;93:1195-1205. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81463-4
- Lukaszewska E., Virden R., Sliwinski E. Hormonal control of endoreduplication in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) seedlings growing *in vitro*. *Plant Biology*. 2012;14:216-222. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2011.00477.x
- Lup S.D., Tian X., Xu J., Perez-Perez J.M. Wound signaling of regenerative cell reprogramming. *Plant Science*. 2016;250:178-187. DOI: 10.1016/j.plantsci.2016.06.012.
- Magnien E., Dalschaert X., Faraoni-Sciamanna P. Transmission of a cytological heterogeneity from the leaf to the protoplasts in culture. *Plant Science Letters*. 1982;25:291-303. DOI: 10.1016/0304-4211(82)90159-6
- Marchenko A.O. Model of processes of reproduction of plants. In: *The IX International Conference «The Biology of plant cells in vitro and biotechnology»: Abstract; 2008 September 8-12; Zvenigorod, Russia*. Moscow; 2008. p.243. [in Russian] (Марченко А.О. Модель процессов репродукции растений. В кн.: IX Международная конференция «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология»: тезисы; 8-12 сентября 2008 г.; Звенигород, Россия. Москва; 2008. С.242). URL: <https://ippras.ru/upload/files/Abstracts.pdf> [дата обращения: 27.11.2022].
- Marchenko A.O., Golodriga P.L., Klimenko Z.P., Piven K.M. Somatic embryoidogenesis in grape tissue culture. *Physiology and biochemistry of cultivated plants*. 1987;19(4):408-411. [in Russian] (Марченко А.О., Голодрига П.Л., Клименко З.П., Пивень К.М. Соматический эмбриоидогенез в культуре ткани винограда. *Физиология и биохимия культурных растений*. 1987;19(4):408-411).
- Masani M.Y.A., Noll G., Parveez G.K.A., Sambanthamurthi R., Prüfer D. Regeneration of viable oil palm plants from protoplasts by optimizing media components, growth regulators and cultivation procedures. *Plant Science*. 2013;210:118-127. DOI: 10.1016/j.plantsci.2013.05.021
- Mashkina O.S., Tabatskaya T.M., Morkovina S.S., Panyavina E.A. Growing seedlings white poplar (*Populus alba* L.) based on the collection *in vitro* and evaluation of its cost. *Forestry Magazine*. 2016;6(1):28-44. [in Russian] (Машкина О.С., Табачкая Т.М., Морковина С.С., Панявина Е.А. Выращивание посадочного материала тополя белого (*Populus alba* L.) на основе коллекции *in vitro* и оценка его себестоимости. *Лесотехнический журнал*. 2016;6(1):28-44). DOI: 10.12737/18725
- Medvedeva N.I., Polivara N.V., Troshin L.P. Peculiarities of microclonal propagation of introducers and grape clones. *Polythematic Online Scientific Journal of Kuban State Agrarian University*. 2008;(40):137-155. [in Russian] (Медведева Н.И., Поливарова Н.В., Трошин Л.П. Особенности микроклонального размножения интродуцентов и клонов винограда. *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета*. 2008;(40):137-155).
- Mezzetti B., Pandolfini T., Navacchi O., Landi L. Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis. *BMC Biotechnology*. 2002;2:18. DOI: 10.1186/1472-6750-2-18
- Molkanova O.I., Konovalova T.Y., Meleschuk E.V., Orlova N.D., Koroleva O.V., Akmetova L.R., Shirnina I.V. Creation of *in vitro* gene bank of rare and valuable species and cultivars of MBG RAS. In: *Botanical gardens in the XXI century: biodiversity conservation, development strategy and innovative solutions: collection of scientific materials of the II All-Russian scientific and practical conference with international participation, dedicated to the 20th anniversary of the Botanical Garden «BelSU»*. Belgorod; 2019. p.178-181. [in Russian] (Молканова О.И., Коновалова Т.Ю., Мелешук Е.В., Орлова Н.Д., Королева О.В., Ахметова Л.Р., Ширнина И.В. Создание генетического банка *in vitro* редких и ценных видов и сортов ГБС РАН. В кн.: *Ботанические сады в XXI веке: сохранение биоразнообразия, стратегия развития и инновационные решения: сборник научных материалов II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 20-летию образования Ботанического сада НИУ «БелГУ»*. Белгород; 2019. С.178-181). URL: <https://botanicgarden.bsu.edu.ru/media/>

- uploads/2020/02/botanicheskie-sady_19.pdf [дата обращения: 27.11.2022].
- Mozgova I., Munoz-Viana R., Hennig L. PRC2 represses hormone-induced somatic embryogenesis in vegetative tissue of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*. 2017;13(1):e1006562. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006562
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 1962;15(3):473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Naegele RP, Londo JP, Zou C, Cousins P. Identification of SNPs associated with magnesium and sodium uptake and the effect of their accumulation on micro and macro nutrient levels in *Vitis vinifera*. *PeerJ*. 2021;9:e10773. DOI: 10.7717/peerj.10773
- Negrul A.M. Origin and classification of cultured grapevine. In: A.M. Frolov-Bagreyev (ed.) *The ampelography of the USSR. Vol. 1*. Moscow: Pischepromizdat; 1946. p.159-216. [in Russian] (Негрюль А.М. Происхождение культурного винограда и его классификация. В кн.: *Ампелография СССР* / под ред. А.М. Фролова-Багреева Москва: Пищепромиздат; 1946. Т. 1. С.159-216).
- Nosulchak V.A., Smurygin A.S., Troshin L.P. Collection, conservation and analysis of the gene pool of Russian grapes. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2007;161:20-29. [in Russian] (Носульчак В.А., Смурыгин А.С., Трошин Л.П. Сбор, сохранение и анализ генофонда винограда России. *Труды по прикладной ботанике и селекции*. 2007;161:20-29).
- Ochatt S.J., Mousset-Déclat C., Rancillac M. Fertile pea plants regenerate from protoplasts when calluses have not undergone endoreduplication. *Plant Science*. 2000;156(2):177-183. DOI: 10.1016/S0168-9452(00)00250-8
- Orlikowska T. Effect of *in vitro* storage at 4°C on survival and proliferation of apple rootstocks. *Acta Horticulturae*. 1991;289:251-254. DOI: 10.17660/ActaHortic.1991.289.66
- Klimenko V.P., Pavlova I.A. Collection of grapevine varieties, hybrids and clones under *in vitro* conditions. In: *Prospects for the Development of Viticulture and Winemaking in CIS Countries: Abstracts of reports and messages of the International scientific-practical conference dedicated to the 180th anniversary of the NIV&W "Magarach"; 2008 October 28-30; Yalta, Crimea; Yalta; 2008. Vol. 1. p.80-81. [in Russian] (Клименко В.П., Павлова И.А. Коллекция сортов, гибридов и клонов винограда в условиях *in vitro*. В кн.: *Перспективы развития виноградарства и виноделия в странах СНГ: Международная научно-практическая конференция, посвященная 180-летию Национального института винограда и вина «Магарах»: тезисы докладов и сообщений; 28-30 октября 2008 г.; Ялта, Крым. Ялта; 2008. Т. 1. С.80-81).**
- Pavlova I.A., Klimenko V.P. Creation and prospects of use of grape varieties and hybrids collection *in vitro*. In: *Actual problems of applied genetics, breeding and biotechnology of plants: Abstracts of the International Scientific Conference dedicated to the 200th anniversary of Charles Darwin and the 200th anniversary of the Nikitsky Botanical Garden; 2009 November 03-06; Yalta, Crimea. Yalta; 2009. p.149. [in Russian] (Павлова И.А., Клименко В.П. Создание и перспективы использования коллекции сортов и гибридов винограда *in vitro*. В кн.: *Актуальные проблемы прикладной генетики, селекции и биотехнологии растений: тезисы Международной научной конференции, посвященной 200-летию Ч. Дарвина и 200-летию Никитского ботанического сада; 03-06 ноября 2009 г.; Ялта, Крым. Ялта; 2009. С.149).**
- Plekhanova M.N. Collections of genetic resources of fruit and berry crops: structure and problems of conservation in living form. In: *Proceedings of the XXI Michurin readings; 2002 October 28-30; Michurinsk, Russia. Michurinsk; 2002. p.4. [in Russian] (Плеханова М.Н. Коллекция генетических ресурсов плодовых и ягодных культур: структура и проблемы сохранения в живом виде. В кн.: *Материалы XXI Мичуринских чтений; 28-30 октября 2002 г.; Мичуринск, Россия. Мичуринск; 2002. С.4).**
- Prange A.N.S., Bartsch M., Serek M., Winkelmann T. Regeneration of different *Cyclamen* species via somatic embryogenesis from callus, suspension cultures and protoplasts. *Scientia Horticulturae*. 2010;125(3):442-450. DOI: 10.1016/j.scienta.2010.04.018
- Rai M.K., Shekhawat N.S. Recent advances in genetic engineering for improvement of fruit crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2014;116:1-15. DOI: 10.1007/s11240-013-0389-9
- Rajasekaran K., Mullins M.G. Organogenesis in internode explants of grapevines. *Vitis*. 1981;20(3):218-227. DOI: 10.5073/vitis.1981.20.218-227
- Reed B.M., Chang Y. Medium- and long- term storage of *in vitro* cultures of temperate fruit and nut crops. In: M.K. Razdan, E.C. Cocking (eds). *Conservation of Plant Genetic Resources In Vitro. Vol. 1: General Aspects*. U.S.A.: Science Publishers, Inc.; 1997. p.67-105.
- Reed K.M., Bargmann B.O.R. Protoplast regeneration and its use in new plant breeding technologies. *Frontiers in Genome Editing*. 2021;3(3):734951. DOI: 10.3389/fgeed.2021.734951
- Ren C., Guo Y., Kong J., Lecourieux F., Dai Z., Li S., Liang Z. Knockout of *VvCCD8* gene in grapevine affects shoot branching. *BMC Plant Biology*. 2020;20(1):47. DOI: 10.1186/s12870-020-2263-3
- Revin P. Speech at XVI International Botanical Congress. *Information Bulletin. Council of Botanical Gardens of Russia and Branch of International Plant Protection Council*. 2000;11:38-47. [in Russian] (Ревин П. Речь на XVI Международном ботаническом конгрессе. *Информационный бюллетень Совета ботанических садов России и Отделения Международного совета по охране растений*. 2000;11:38-47).
- Rymen B., Kawamura A., Lambolez A., Inagaki S., Takebayashi A., Iwase A., Sakamoto Y., Sko K., Favero D.S., Ikeuchi M., Suzuki T., Seki M., Kakatani T., Roudier F., Sugimoto K. Histone acetylation orchestrates wound-induced transcriptional activation and cellular reprogramming in *Arabidopsis*. *Communications Biology*. 2019;2:404. DOI: 10.1038/s42003-019-0646-5
- Sala F., Magnien E., Galli M.G., Dalschaert X., Redrali-Noy G., Spadari S. DNA repair synthesis in plant protoplasts is aphidicolin-resistant. *FEBS Letters*. 1982;138(2):213-217. DOI: 10.1016/0014-5793(82)80444-4
- Saporta R., Pedro-Galan S., Domenech G., Carmen M. Attempts at grapevine (*Vitis vinifera* L.) breeding through genetic transformation: the main limiting factors. *Vitis*. 2016;55:173-186. DOI: 10.5073/vitis.2016.55.173-186
- Sauer N.J., Narváez-Vásquez J., Mozoruk J., Miller R.B., Warburg Z.J., Woodward M.J., Mihiret Y.A., Lincoln T.A., Segami R.E., Sanders S.L., Walker K.A., Beetham P.R., Schöpke C.R., Gocal G.F.W. Oligonucleotide-mediated genome editing provides precision and function to engineered nucleases and antibiotics in plants. *Plant Physiology*. 2016;170(4):1917-1928. DOI: 10.1104/pp.15.01696
- Shan Q., Wang Y., Li J., Zhang Y., Chen K., Liang Z., Zhang K., Liu J., Xi J.J., Qiu J.-L., Gao C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*. 2013;31:686-688. DOI: 10.1038/nbt.2650
- Sheng X., Zhao Z., Yu H., Wang J., Xiaohui Z., Gu H. Protoplast Isolation and plant regeneration of different doubled haploid lines of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2021;107:513-520. DOI: 10.1007/s11240-011-0002-z
- Shi Z., Halaly-Basha T, Zheng C, Sharabi-Schwager M, Wang C, Galbraith DW, Ophir R, Pang X, Or E. Identification of potential post-ethylene events in the signaling cascade induced by stimuli of bud dormancy release in grapevine. *Plant Journal*. 2020;104(5):1251-1268. DOI: 10.1111/tpj.14997
- Stamp J.A., Colby S.M., Meredith C.P. Direct shoot organogenesis and plant regeneration from leaves of grape (*Vitis* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1990;22:127-133. DOI: 10.1007/BF00043688
- Stone S.L., Kwong L.W., Yee K.M., Pelletier J., Lepiniec L., Fischer R.L., Goldberg R.B., Harada J.J. *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(20):11806-11811. DOI: 10.1073/pnas.201413498
- Thakare D., Tang W., Hill K., Perry S.E. The MADS-domain transcriptional regulator AGAMOUS-LIKE15 promotes somatic embryo development in *Arabidopsis* and soybean. *Plant*

- Physiology*. 2008;146:1663-1672. DOI: 10.1104/pp.108.115832
- Tomiczak K., Mikula A., Sliwinska E., Rybczyński J.J. Autotetraploid plant regeneration by indirect somatic embryogenesis from leaf mesophyll protoplasts of diploid *Gentiana Decumbens* L.f. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 2015;51:350-359. DOI: 10.1007/s11627-015-9674-0
- Tsuwamoto R., Yokoi S., Takahata Y. *Arabidopsis* EMBRYOMAKER encoding an AP2 domain transcription factor plays a key role in developmental change from vegetative to embryonic phase. *Plant Molecular Biology*. 2010;73:481-492. DOI: 10.1007/s11103-010-9634-3
- Tu M., Fang J., Zhao R., Liu X., Yin W., Wang Y., Wang X., Wang X., Fang Y. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of *VvZIP36* promotes anthocyanin accumulation in grapevine (*Vitis vinifera*). *Horticulture Research*. 2022;19:20-22. DOI: 10.1093/hr/uhac022
- Tvorogova V.E. *WOX* and *PIN* genes in the regulation of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* [dissertation]. St. Petersburg: VIR; 2016. [in Russian] (Творогова В.Е. Гены *WOX* и *PIN* в регуляции соматического эмбриогенеза у *Medicago truncatula*: дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург: ВИР; 2016).
- Ukhatova Y.V., Gavrilenko T.A. Cryoconservation methods for vegetatively propagated crops. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2018;1(1):52-63. [in Russian] (Ухатова Ю.В., Гавриленко Т.А. Методы криоконсервации вегетативно размножаемых культурных растений. *Биотехнология и селекция растений*. 2018;1(1):52-63). DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-52-63
- Vechyorco N.A., Romadanova N.V., Jumabekov E.V. Preservation of biodiversity of apple – tree through tissue culture. In: *The IX International Conference «The Biology of plant cells in vitro and biotechnology»*: Abstract; 2008 September 8-12; Zvenigorod, Russia. Moscow; 2008. p.71. [in Russian] (Вечёрко Н.А., Ромаданова Н.В., Жумабеков Е.В. Сохранение биоразнообразия яблони методом культуры тканей. В кн.: IX Международная конференция «Биология клеток растений in vitro и биотехнология»: тезисы; 8-12 сентября 2008 г.; Звенигород, Россия. Москва; 2008. С.70).
- Vetchinkina E.M., Malaeva E.V., Mamaeva N.A., Zinina J.M., Kononova L.N., Korotkov O.I., Molkanova O.I. Application of biotechnological methods for conservation of rare and valuable species plants. In: *The IX International Conference «The Biology of plant cells in vitro and biotechnology»*: Abstract; 2008 September 8-12; Zvenigorod, Russia. Moscow; 2008. p.67. [in Russian] (Ветчинкина Е.М., Малаева Е.В., Мамаева Н.А., Зинина Ю.М., Коновалова Л.Н., Коротков О.И., Молканова О.И. Использование биотехнологических методов для сохранения генофонда редких и ценных видов растений. В кн.: IX Международная конференция «Биология клеток растений in vitro и биотехнология»: тезисы; 8-12 сентября 2008 г.; Звенигород, Россия. Москва; 2008. С.66).
- Vetchinkina E.M., Molkanova O.I. Using of embryo culture for *in vitro* plant gene banks creation. In: *The IX International Conference «The Biology of plant cells in vitro and biotechnology»*: Abstract; 2008 September 8-12; Zvenigorod, Russia. Moscow; 2008. p.69. [in Russian] (Ветчинкина Е.М., Молканова О.И. Использование эмбриокультуры для создания генетических банков растений *in vitro*. В кн.: IX Международная конференция «Биология клеток растений in vitro и биотехнология»: тезисы; 8-12 сентября 2008 г.; Звенигород, Россия. Москва; 2008. С.68).
- Vysotskaya O.N. Long-term preservation *in vitro* collection of strawberry plants (Dlitelnoye sokhraneniye *in vitro* kolektsii rasteniy zemlyaniki). *Plant Physiology*. 1994;41(6):935-941. [in Russian] (Высоцкая О.Н. Длительное сохранение *in vitro* коллекции растений земляники. *Физиология растений*. 1994;41(6):935-941).
- Vysotsky V.A., Vysotskaya O.N. *In vitro* culture for long-term storage of valuable genotypes (Kultura *in vitro* dlya dlitelnogo khraneniya tsennykh genotipov). In: *Proceedings of the XXI Michurin readings; 2002 October 28-30; Michurinsk, Russia*. Michurinsk; 2002. p.12-13. [in Russian] (Высоцкий В.А., Высоцкая О.Н. Культура *in vitro* для длительного хранения ценных генотипов. В кн.: Материалы XXI Мичуринских чтений; 28–30 октября 2002 г.; Мичуринск, Россия. Мичуринск; 2002. С.12-13).
- Wang C., He R., Lu J., Zhang Y. Selection and regeneration of *Vitis vinifera* Chardonnay hydroxyproline-resistant calli. *Protoplasma*. 2018;255(5):1413-1422. DOI: 10.1007/s00709-018-1240-2
- Woo J.W., Kim J., Kwon S.I., Corvalán C., Cho S.W., Kim H., Kim S.-G., Kim S.-T., Choe S., Kim J.-S. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Natural Biotechnology*. 2016;33:1162-1164. DOI: 10.1038/nbt.3389
- Xiao J., Wagner D. Polycomb repression in the regulation of growth and development in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology*. 2015;23:15-24. DOI: 10.1016/j.cpb.2014.10.003
- Xu L., Huang H. Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. Chapter One. In: B. Galliot (ed.) *Current Topics in Developmental Biology. Vol. 108. Mechanisms of Regeneration*. Cambridge, Massachusetts: Academic Press; 2014. p.1-33. DOI: 10.1016/B978-0-12-391498-9.00009-7
- Yeremin G.V., Tsarenko V.P., Plekhanova M.N. In gardens and nurseries of USA. *Gardening and Viticulture*. 1991;1:42-44. [in Russian] (Ерёмин Г.В., Плеханова М.Н., Царенко В.П. В садах и питомниках США. *Садоводство и виноградарство*. 1991;1:42-44).
- Zelenyanskaya N.N., Jaburiya L.V., Tesliuk N.I., Podust N.V., Gogulinskaya E.I., Methods of grape collection material *in vitro* storage. Odesa: National Scientific Centre «V.E. Tairov Institute of Viticulture and Winemaking»; 2016. [in Ukrainian] (Зеленянская Н.Н., Джабурия Л.В., Теслюк Н.И., Подуст Н.В., Гогулинская Е.И. Методы хранения коллекционного материала винограда в культуре *in vitro*. Одесса: Национальный научный центр «Институт виноградарства и виноделия им. В.Е. Таирова»; 2016).
- Zhang Y., Malzahn A.A., Sretenovic S., Qi Y. The emerging and uncultivated potential of CRISPR technology in plant science. *Nature Plants*. 2019;5:778-794. DOI: 10.1038/s41477-019-0461-5
- Zhuchenko A.A. Adaptive potential of cultivated plants. Chisinau: ştiinţa; 1988: p.238-253. [in Russian] (Жученко А.А. Адаптивный потенциал культурных растений. Кишинев: Штиинца; 1988: С.238-253).

Информация об авторах

Татьяна Владимировна Коваленко, магистрант направления «Генетика и генетические технологии», Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», 354340 Россия, Краснодарский край, поселок городского типа Сириус, Олимпийский пр-т, 1., kovalenko.tv@talantiuspeh.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6915-8760>

Надежда Геннадьевна Тихонова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела генетических ресурсов плодовых и ягодных культур, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44; старший научный сотрудник направления «Биология и биотехнология растений», Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», 354340 Россия, Краснодарский край, поселок городского типа Сириус, Олимпийский пр-т, 1. n.g.tikhonova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7098-7662>

Елена Константиновна Хлесткина, доктор биологических наук, профессор РАН, директор, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44; руководитель направления «Биология и биотехнология растений», Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», 354340 Россия, Краснодарский край, поселок городского типа Сириус, Олимпийский пр-т., 1, director@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

Юлия Васильевна Ухатова, кандидат биологических наук, заместитель директора по научно-организационной работе, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44; старший научный сотрудник направления «Биология и биотехнология растений» Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», 354340 Россия, Краснодарский край, поселок городского типа Сириус, Олимпийский пр-т., 1, y.ukhatova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9366-0216>

Information about the authors

Tatiana V. Kovalenko, Master's student in "Genetics and Genetic Technologies", Sirius University of Science and Technology, 1, Olympiisky Avenue, Sirius Urban-Type Settlement, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, 354340, Russia. kovalenko.tv@talantiuspeh.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6915-8760>

Nadezhda G. Tikhonova, Cand.Sci. (Biology), Senior Researcher, Department of Genetic Resources of Fruit and Berry Crops, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia; Senior Researcher, Sirius University of Science and Technology, 1 Olympiisky Avenue, Sirius Urban-Type Settlement, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, 354340, Russia, n.g.tikhonova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7098-7662>

Elena K. Khlestkina, Dr. Sci. (Biology), Professor of the RAS, Director, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia; Head, Plant Biology and Biotechnology Department, Sirius University of Science and Technology, 1, Olympiisky Avenue, Sirius Urban-Type Settlement, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, 354340, Russia, director@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

Yulia V. Ukhatova, Cand. Sci. (Biology), Deputy Director for Scientific and Organizational Work, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia; Senior Researcher, Sirius University of Science and Technology, 1, Olympiisky Avenue, Sirius Urban-Type Settlement, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, 354340 Russia, y.ukhatova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9366-0216>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 23.11.2022; одобрена после рецензирования 12.12.2022; принята к публикации 25.12.2022.

The article was submitted on 23.11.2022; approved after reviewing on 12.12.2022; accepted for publication on 25.12.2022.