

На правах рукописи



Скапцов Михаил Викторович

**СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *RUMEX ACETOSA* L.
И *INULA BRITANNICA* L. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

03.02.07 – Генетика

**Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Санкт-Петербург – 2019

Работа выполнена в Южно-Сибирском ботаническом саду и ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», г. Барнаул

Научный руководитель Шмаков Александр Иванович
доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», профессор

Официальные оппоненты Шнеер Виктория Семёновна
доктор биологических наук, ФГБУН «Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН», ведущий научный сотрудник

Галкина Светлана Анатольевна
кандидат биологических наук, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»
доцент кафедры генетики и биотехнологии

Ведущая организация ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН»

Защита состоится «3» апреля 2019 года в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 006.041.02. при Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова по адресу: 190121, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова и на сайте института: <http://www.vir.nw.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Елена Вячеславовна Рогозина

Актуальность темы. Культивирование клеток и тканей растений *in vitro* является перспективным методом сохранения генотипов растений с ценными признаками и биоразнообразия в целом. Криосохранение растительных меристем, поддержание в культуре органов и тканей или клональное размножение все чаще используются в мире для создания банков гермоплазмы, получения отдаленных гибридов и растений, модифицированных методами геной инженерии, а также для сохранения генетических ресурсов культурных растений и их диких родичей в связи с ростом генетической эрозии и исчезновением сортов, видов и родов сельскохозяйственных растений. Создание новых высокоурожайных сортов, адаптированных и устойчивых к болезням, вредителям и неблагоприятным факторам среды, связано с возможностями выбора необходимого материала из природной флоры, наиболее важным компонентом которой для этих целей являются дикие родичи культурных растений (Смекалова, Чухина, 2011). Зачастую, чем выше генетическое разнообразие используемых видов диких растений, тем выше потенциал генетических ресурсов в последующих селекционных работах.

Культивирование *in vitro* позволяет избегать таких явлений в открытых коллекциях, как спонтанная гибридизация между видами, которые в природе зачастую не встречаются в природе (географически, репродуктивно изолированы друг от друга), но потенциально могут образовывать гибриды *ex situ* (Smirnov et al., 2017). Казалось бы, эту проблему можно обойти, используя микроклонирование и клонирование клеточных культур *in vitro*. Целый ряд разработанных методик позволяет сохранять генетический материал в криохранилищах, клонально размножать или поддерживать длительное культивирование отдельных клеток (Дунаева и др., 2012). Однако при культивировании *in vitro* идут процессы дедифференцировки и пролиферации каллуса, наблюдаются множественные эпигенетические изменения и целый комплекс явлений, называемых соматклональной изменчивостью. Тем самым задача сохранения генотипа и, тем более, эпигенотипа объекта генетической коллекции как материала для последующих селекционных манипуляций оказывается нерешенной (Larkin, Scowcroft, 1981). Соматклональная изменчивость генотипа и эпигенотипа приводит или может приводить к изменениям в анатомо-морфологическом, физиологическом, биохимическом уровнях устройства растительного организма. Увеличивается скорость накопления мутаций, перестраиваются молекулярно-генетические механизмы растительной клетки, что может приводить к появлению растений с новыми фенотипами, которые в

природе не возникают или нивелируются за счет полового процесса и отбора. Возникающие неконтролируемые мутации являются нежелательными, если цель, которую ставил перед собой организатор банка гермоплазмы, состояла в сохранении исходных генотипов или сохранении результатов генетической инженерии (Ahuja, 1997). С другой стороны, проявляющаяся *in vitro* изменчивость значительно повышает генетическое разнообразие исходного материала, представляя большой интерес в выделении клонов с улучшенными характеристиками (Ahuja, 1993).

Поддержание стабильности тех или иных хозяйственно ценных признаков, которыми обладают объекты банков гермоплазмы вследствие многолетней селекции или в результате генно-инженерных манипуляций, является важной задачей при создании банков гермоплазмы. Зачастую для оценки степени изменчивости генетических конструкций и стабильности экспрессии используют маркерные гены, такие как *hptIII*, *gusA* или *gfp* (Wei et al., 2016). Актуальной задачей становится анализ характера мутаций в этих генах, возникающих при поддержании их в культурах *in vitro*. Изучение возможных эпигенетических их изменений, их экспрессии, в зависимости от метода трансформации, техник культивирования и регенерации позволяет накапливать данные и рекомендации по каждому конкретному виду растений, чтобы избежать или нивелировать нежелательные последствия влияния культивирования клеток *in vitro* на объекты, поддерживаемые в генбанках. С общебиологической точки зрения представляет интерес рассмотреть, как связаны и связаны ли явления, наблюдаемые при соматоклональной изменчивости, с путями и механизмами изменений генома в ходе эволюции цветковых растений (Wang Q., Wang L., 2012).

Rumex acetosa L. и *Inula britannica* L. послужили ценными модельными видами, сочетая в себе высокий генетический полиморфизм, способность к длительному культивированию *in vitro*, подверженность к генетической трансформации; кроме того являются возможными носителями генетической информации для последующих селекционных работ, связанных с их пищевым и лекарственным потенциалом (Растительные ресурсы..., 2008; Растительные ресурсы..., 2013). Разнополость и легко образующиеся естественные и искусственные гибриды *Rumex acetosa* L. представляют большой интерес в изучении механизма формирования пола и поведения генома растений с нерекombинируемыми хромосомами в процессах полиплоидии и гибридизации (Гиренко и др., 1988).

Исследование молекулярно-генетических процессов в культуре *in vitro* на примере видов полиморфных по своей природе, со сложной генетической организацией, позволяет накапливать новые фундаментальные и прикладные данные. Характер изменчивости зачастую видоспецифичен и проявляется на различных уровнях организации растительного организма. Выбор типа культивирования, типа экспланта, изучение путей морфогенеза и разработка эффективных подходов детекции изменчивости на разных уровнях устройства генома, ранних и поздних стадиях культивирования становятся необходимыми для успешного сохранения генотипов и оценки возможных последствий при мероприятиях по созданию сохраняемых коллекций растений.

Цель и задачи исследований. Цель работы – сравнительное изучение соматональной изменчивости в культуре *in vitro* на различных стадиях культивирования каллусов и регенерантов *Rumex acetosa* L. и *Inula britannica* L., для определения влияния длительной пролиферации клеток на скорость и характер цитогенетического, молекулярно-генетического и эпигенетического полиморфизма. В частности, цель нашей работы состояла в изучении влияния длительного культивирования *in vitro* на геном и транскриптом данных видов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- оценить генетический полиморфизм *R. acetosa* и *I. britannica*;
- разработать протоколы введения в культуру *in vitro*, длительного культивирования каллусов *R. acetosa* и *I. britannica* и их регенерации;
- изучить полиморфизм кариотипов, цитотипов и генотипов на различных стадиях культивирования *R. acetosa* и *I. britannica*;
- изучить изменчивость экспрессии β-глюкуронидазы на различных стадиях культивирования *R. acetosa* и *I. britannica in vitro*;
- выявить полиморфизмы в последовательностях ДНК и изменчивость метилирования, а также провести анализ экспрессии основных групп функциональных генов (транскриптома) *R. acetosa*;

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Введение растений в культуру *in vitro* методом длительного культивирования каллуса вызывает значительные изменения генома *R. acetosa* и *I. britannica* и не позволяет сохранять первоначальное исходное состояние их генотипов и кариотипов.

2. Сравнительное исследование длительно культивируемых линий *R. acetosa* и *I. britannica in vitro* выявило общие закономерности поведения геномов, а именно увеличение генетического полиморфизма на ранних стадиях пролиферации каллусов и снижение его на стадии

регенерации, который обеспечивается накоплением и элиминацией точковых мутаций, изменением паттерна метилирования ретротранспозонов и генома в целом.

3. В культуре *R. acetosa in vitro* наблюдается тенденция к полиплоидизации генома, которая сопровождается потерей ДНК – размеры моноплоидного генома уменьшались.

Научная новизна работы. Впервые проведена оценка соматоклональной изменчивости при длительном культивировании важных и интересных ресурсных видов *R. acetosa* и *I. britannica in vitro*. Выявлена как видоспецифичность в процессах изменения кариотипов, геномов и транскриптомов изучаемых видов, так и определенные общие закономерности генетической изменчивости в культуре *in vitro*. Впервые проведены исследования соматоклональной изменчивости в культуре *in vitro* для вида с нерекombинируемыми половыми хромосомами. Выявлена изменчивость метилирования ДНК и пула транскрибируемых генов *R. acetosa*. Показано постепенное элиминирование рекомбинантного репортерного гена *gusA*. Разработаны олигонуклеотиды для амплификации гена *gusA* и проведения метил чувствительного AFLP-анализа. В результате отбора в культуре *in vitro* впервые получены полиплоидные растения *R. acetosa* с нерекombинируемыми половыми хромосомами, ранее не известные в природе и культуре.

Практическая значимость. Разработаны протоколы размножения и поддержания в культуре *in vitro* *R. acetosa* и *I. britannica*. Разработаны рекомендации, протоколы и буферы для оценки степени соматоклональной изменчивости методами ПЦР анализа и проточной цитометрии. Разработаны протоколы генетической трансформации *R. acetosa* и *I. britannica*.

Апробация работы. Основные результаты были представлены на I и II Международных научно-практических конференциях «Биотехнология и общество в XXI веке» (Барнаул, 2015, 2018); XII Международной конференции студентов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2015); XIII, XIV, XV, XVI, XVII Международных научно-практических конференциях «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии» (Барнаул, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018); результаты работы защищены тремя патентами (патент на изобретение RUS 2513232, 16.11.2012, «Композиция на основе 24-эпибрассинолида для регуляции развития и защиты растений», патент на изобретение RUS 2555542, 04.02.2014, «Набор синтетических олигонуклеотидов для детектирования количества копий гена бета-

глюкуронидазы в трансгенных растениях», патент на изобретение RU2662664C1, 31.07.2017 «Набор синтетических олигонуклеотидов для проведения метилчувствительной амплификации ДНК».

Публикации. По материалам диссертации опубликована 21 работа, в том числе 12 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК включая Web of Science/Scopus и 3 патента на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, семи глав, заключения, выводов, списка литературы. Библиографический список включает 327 источников, из них – 296 на иностранном языке. Работа изложена на 149 страницах, содержит 11 таблиц и 29 рисунков.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю профессору, д.б.н. Александру Ивановичу Шмакову за руководство, ценные наставления и помощь в выполнении диссертации. Автор признателен лаборатории Фармакогеномики ИХБФМ СО РАН и ее руководителю, к.б.н. М. Л. Филипенко за оказанные консультации, и к.б.н. Е. А. Храпову за практические наставления в молекулярном клонировании, к.б.н., доценту кафедры физико-химической биологии и биотехнологии Алтайского государственного университета С. В. Смирнову, а также доктору Н. В. Фризену, заместителю директора по научной работе Оснабрюкского ботанического сада (Германия), помогавшим мне освоить методы кариотипирования и цитометрии растений; за помощь в работе и неизменный интерес к проводимым мной исследованиям; доктору Х. Шинояма заведующей группой генной инженерии растений Аграрной опытной станции Фукуи (Япония), за помощь в освоении методов генетической трансформации растений, передачу штаммов и векторов; М. Г. Куцеву к.б.н., заведующему лабораторией биоинженерии Алтайского государственного университета, за развитие теоретико-прикладного интереса и советы в области экспериментальной ботаники.

Глава 1. Обзор литературы

Ресурсные виды растений можно сохранять *in situ*, в генетических коллекциях вегетативно размножаемых растений *ex situ*, в виде криозаконсервированных коллекций образцов, в виде микрокультивируемых образцов, и, наконец, в виде коллекций культур клеток *in vitro* (Benson, 2014; Dolman et al., 2015).

Коллекции *in vitro* обычно создаются, как правило, или как материал для генноинженерных манипуляций, или как часть генетических коллекций *in situ* и *ex situ*. В последнем случае, состав и размер *in vitro* коллекций определяется структурой core–collections генофонда каждой

культуры, требованиями международного обмена, необходимостью оздоровления, размножения и дублирования наиболее ценных экземпляров полевой коллекции (Дунаева, Гавриленко, 2007). Считается, что коллекции *in vitro*, помимо сохранения относительно экономного способа сохранения генетического разнообразия могут быть использованы и для оздоровления объектов в генетической коллекции от патогенов (Дунаева, Гавриленко, 2007).

R. acetosa достаточно полиморфный вид, в мире насчитывается девять подвидов, используется как лекарственное, пищевое, техническое, кормовое растение. Внимание цитогенетиков и систематиков привлекает как высокий полиморфизм, разнополость, так и легко образующиеся естественные и искусственные гибриды не только внутри вида, но и между разными видами. Также большой интерес проявляется генетиками к механизму формирования пола, в связи с тем, что женские и мужские растения определяются по соотношению факторов в аутосомах и половых хромосомах, могут образовываться интерсексы (Гиренко и др., 1988). *I. britannica* также высоко полиморфное растение, в мире приводится два подвида, 10 разновидностей и форм. Используется как лекарственное растение. Основываясь на довольно высоком разнообразии, может использоваться в работах по гибридизации с таким ресурсным видом, как *Inula helenium* L. (род *Inula*).

В обзоре литературы обсуждается использование культуры *in vitro* с целью сохранения биоразнообразия, основы генетической инженерии, а также влияние соматональной изменчивости на анатомо-морфологические, биохимические, цитогенетические, молекулярно-генетические характеристики растений и на изменчивость экспрессии генетических конструкций, а также более подробная характеристика объектов исследования

Глава 2. Материалы и методы исследований

Объектами исследования являлись *Rumex acetosa* L. – Щавель обыкновенный и *Inula britannica* L. – Девясил британский, собранные на территории Алтайской горной страны и интродуцированные на территории Южно-Сибирского Ботанического Сада. На основе данных о достаточно высоком уровне полиморфизма, а также возможности длительного культивирования каллуса и генетической трансформации представители родов *Inula* (*I. britannica*) и *Rumex* (*R. acetosa*) были отобраны в качестве объектов для анализа изменчивости генетического полиморфизма в коллекции *in vitro* (Скапцов и др., 2015).

Культивирование *in vitro* изолированных тканей и органов растений осуществляли согласно общепринятым рекомендациям с вариациями (Бутенко, 1999; Сохранение вегетативно..., 2011). Для введения в культуру *in vitro* использовали экспланты с не менее чем пяти растений *R. acetosa* и пяти растений *I. britannica* по сто эксплантов для каждой линии. Одновременно в культуре поддерживали 4 типа образцов: трансформированная линия *R. acetosa*; нетрансформированная линия *R. acetosa*; трансформированная линия *I. britannica*; нетрансформированная линия *I. britannica*. В качестве меры изменчивости в фенотипе каллусных линий и регенерантов использовали экспрессию репортерного гена *gusA*. Образцы для RAF-анализа, цитометрии, анализа хромосом и NGS-секвенирования отбирали из нетрансформированных линий для исключения влияния последствий трансгенеза. ДНК экстрагировали с использованием коммерческих наборов DiamondDNA (АБТ, Россия).

Генетическую трансформацию проводили методом агробактериальной сокультивации с использованием штамма *Agrobacterium tumefaciens* ЕНА105 и векторной конструкции pВІК102iGs, pВІК201iGs (Shinoyama et al., 2003). Для оценки экспрессии *gusA* каждые 3 месяца проводили отбор проб каллусов и регенерантов для гистохимического анализа. Гистохимический скрининг активности экспрессии гена β-глюкуронидазы (*gusA*) трансформированных растений проводили методом Джефферсона (Jefferson, 1987). Наличие трансгена исследовали с помощью классической ПЦР с разработанными нами олигонуклеотидами. Количество копий целевого гена исследовали с помощью ПЦР в реальном времени.

Для оценки полиморфизмов в культуре *R. acetosa* L. и *I. britannica* L. использовали RAF-анализ с олигонуклеотидами k02a и k02b, определенными как оптимальные в результате скрининговых исследований и процесса оптимизации ПЦР (Waldron et al., 2002). Микрофлюидный электрофорез проводили с использованием электрофорезной станции Experion (Bio-Rad, США).

Относительное содержание ДНК определяли при помощи метода проточной цитометрии с пропидий иодидом и ДАПИ (Sigma-Aldrich, Германия), с использованием протоколов, разработанных ранее (Skaptsov et al., 2017; Smirnov et al., 2017). В качестве стандарта для определения относительного содержания ДНК использовали изолированные ядра *Pisum sativum* L. ‘Глоризола’ (род *Pisum*) с известным содержанием ДНК 2С = 9,38 пг (Скапцов и др., 2014). Для анализа использовали не менее 30 образцов с каждой стадии культивирования. Для подтверждения данных цитометрии использовали метод давленных препаратов из кончиков

корней регенерантов и растений-доноров эксплантов с окрашиванием ацетоорсеином (Барыкина, 2004). Анализировали не менее 20 регенерантов с исследованием не менее, чем 20 метафазных пластинок.

NGS-секвенирование транскриптома, продуктов RAF-, MAFLP-анализа осуществляли с использованием секвенатора по технологии 454 GSJunior (Roche, Швейцария). Данные обрабатывали с использованием стандартного ПО производителя. *De novo* сборку, нормализацию, поиск ошибок и дублированных последовательностей осуществляли с использованием программного обеспечения Geneious, Biomatters Limited с покрытием не менее 40. Поиск гомологичных последовательностей по алгоритмам BLAST и GO (gene ontology) анализ для функциональной аннотации осуществляли с использованием программного обеспечения Blast2GO со значением e-value не менее 1×10^{-3} .

Статистическая обработка данных произведена с помощью программного обеспечения: Statistica 6.0, Structure 2.3.3, GeneALEX 6.5, Flowing software 2.5.1., XLStat 18.07, Geneious, Blast2GO.

Глава 3. Введение в культуру *in vitro*

Для *R. acetosa* отбирали мужские экземпляры с характерным относительным содержанием ДНК $\approx 7,5$ пг. Как показали результаты наших исследований темпы роста каллуса *R. acetosa* и *I. britannica* максимальны при концентрациях 1 мг/л БА и 2 мг/л НУК на питательной среде МС. Для продления срока культивации нами были предварительно проведены скрининговые исследования по внесению в среды для культивации ПВП в концентрациях 2, 5, 7 и 10 г/л и натрий тиосульфата в концентрациях 100, 150, 200, 250 и 300 мг/л. Нами установлено, что оптимальной концентрацией ПВП в среде является 10 г/л, а натрий тиосульфата 250 мг/л. Более 100 эксплантов *R. acetosa* и *I. britannica* культивировали на питательной среде для пролиферации каллуса, по прописи МС, дополнительно содержащей 3 % сахарозы, 0,3 % фитагеля, 2 мг/л НУК и 1 мг/л БА, 10 г/л ПВП и 250 мг/л натрий тиосульфата до формирования каллуса. Культивирование проводили при 25 °С с 16-часовым фотопериодом.

Для индукции геммагенеза отдельные каллусы переносили на питательную среду МС без регуляторов роста и культивировали до образования побегов. Побеги (0,5–1 см) срезали и переносили на среду для мультипликации (МС, 1 мг/л БА, 0,25 мг/л НУК). Каждые 14 дней часть побегов пассировали на среду для индукции ризогенеза ($\frac{1}{2}$ МС, 0,2 мг/л НУК и 0,005 мг/л 24-эпибрассинолида), часть повторно

культивировали на среде для мультипликации побегов. Побег
культивировали до образования корней.

Листовые экспланты, каллусы (3, 6 и 12 месяцев культивирования) и
регенеранты (полученные из каллусов 3, 12 месяцев культивирования)
были использованы для дальнейших исследований.

Глава 4. Экспрессия β -глюкуронидазы в культуре *in vitro*

На основе оценки уровня экспрессии гена *gusA* в результате
скрининговых гистохимических исследований было показано, что в
случае с *R. acetosa* и *I. britannica* наблюдается более высокий уровень
продукции β -глюкуронидазы в случае использования вектора
pBIK102iGs. Для *R. acetosa* эффективность трансформации составила 9
%, для *I. britannica* – 14 %. Для *I. britannica* среднее значение составляло
4–5 копий на геном, как на стадии культивирования каллуса, так и на
стадии регенерации. Обратная ситуация наблюдалась для *R. acetosa*, где
на стадии пролиферации каллуса копийность экспрессионной кассеты
составляла в среднем 2 копии на геном, а на стадии регенерации не
обнаруживалась, или только в редких случаях показатель копийности
составлял 0,8 копий на геном. Через 12 месяцев культивирования
каллусов и регенерировавших растений экспрессия *gusA* и вставка
селективного маркера отсутствовали. Обратная ситуация отмечена для *I.*
britannica. Экспрессия *gusA* отмечена на всех стадиях культивирования
in vitro и в регенерантах (рис. 1).

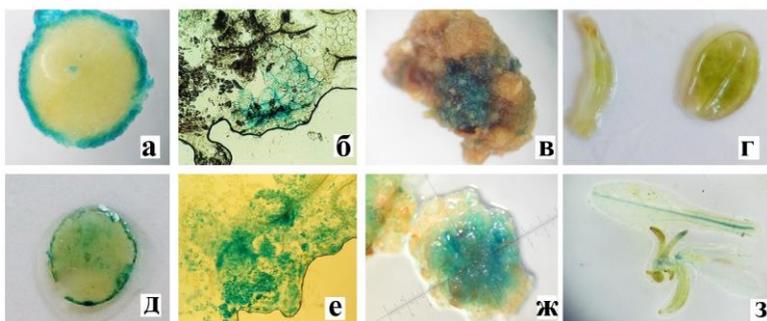


Рис. 1 – Гистохимическое исследование *Rumex acetosa*: а – эксплант; б –
дедифференцировка клеток экспланта; в – каллус 3 месяца; г – регенерант. *Inula*
britannica: д – эксплант; е – дедифференцировка клеток экспланта; ж – каллус 3
месяца; з – регенерант.

ПЦР-анализ показал наличие вставки репортерного гена у
большинства проанализированных образцов. Выборочный ПЦР-анализ
образцов после шести месяцев культивирования *I. britannica* и *R. acetosa*

с олигонуклеотидами Gus4-f, Gus1-r, Gus2-r, Gus4-r демонстрировал амплификацию ПЦР-продукта с ожидаемыми длинами для всех проанализированных образцов *I. britannica*, тогда как для *R. acetosa* – только с парой олигонуклеотидов Gus-f – Gus-r (212 п.н.), что может свидетельствовать о наличии мутаций во встроенной области Т-ДНК.

Глава 5. Цитогенетическая изменчивость в культуре *in vitro*

Данные проточной цитометрии позволили определить относительное содержание ДНК у *R. acetosa* в контроле (7,50 пг), который использовался в дальнейшем в качестве внутреннего стандарта для исследования линий *in vitro*. Количество хромосом *R. acetosa* в контрольных образцах составило $2n = 15$. В некоторых случаях присутствовали особи с некрратным увеличением количества хромосом. Относительное содержание ДНК в каллусных линиях в большинстве случаев варьировало от 4,77 пг до 25,99 пг. Относительное содержание ДНК у регенерантов варьировало от 6,73 пг до 14,92 пг. Средние значения размера генома ДНК для диплоидных и тетраплоидных линий регенерантов приведены в таблице 1.

Таблица 1. Анализ данных пloidности, количества хромосом и относительного содержания ДНК регенерантов *R. acetosa in vitro*.

Тип образца	Кол-во образцов	Пloidность	2n	2С, пг	1С, Мбп ¹	RDC	1Сx ± S, пг
Ex	15	2	15	7,50 ± 0,22	3667,50 ± 107	0,5	3,75 ± 0,11
Reg	62	2	15	7,25 ± 0,41	3545,25 ± 200	0,48	3,74 ± 0,05
	2	-	24	10,67 ± 0,33	5217,63 ± 161	0,44	-
	3	-	28	12,72 ± 0,16	6181,92 ± 78	0,45	-
	33	4	30	13,60 ± 0,4	66650,40 ± 195	0,46	3,40 ± 0,10

Примечание: ¹ – 1 пг ДНК = 978 М.п.н. (Doležel et al., 2003); RDC – среднее содержание ДНК на 1 хромосому; S – стандартное отклонение; Ex – экспланты; Reg – регенеранты.

Кроме того, отмечено снижение такого показателя, как размер моноплоидного генома (1Сx), что говорит о потере ДНК несмотря на кратное удвоение количества хромосом. Так размер моноплоидного генома эксплантов равен 3,75 пг, а среднее содержание ДНК на одну хромосому находится на уровне 0,5 пг. Тогда как для тетраплоидных регенерантов показатель 1Сx снижался до 3,52 пг при среднем содержании ДНК на одну хромосому 0,46 пг. Отдельно стоит уделить внимание явлению эндополиплоидии. В норме показатель эндополиплоидизации имел в среднем значение 0,07. Максимальным данное значение мы фиксировали для каллусных культур после трех месяцев пролиферации (1,50). Кроме того, на данном этапе

культивирования мы наблюдали появление гаплоидных ядер с содержанием ДНК 1С, что может свидетельствовать о процессе гаплоидизации и последующей дигаплоидизации как ответа клеток на стресс и перестройки генетического аппарата с целью приспособления к факторам среды (рис. 2 а).

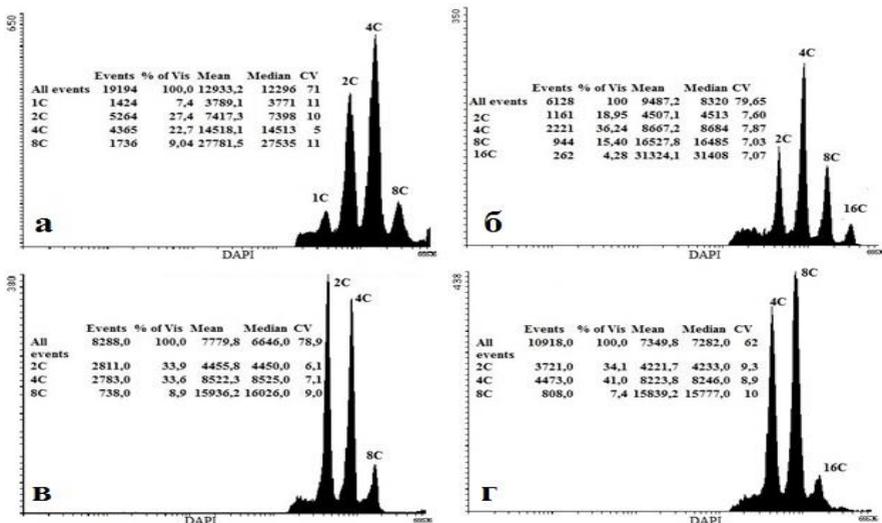


Рис. 2. Типичные гистограммы *Rumex acetosa* L., демонстрирующие различные варианты эндополиплоидии: а – каллус, 3 месяца пролиферации; б – регенеранты, полученные из каллусов трех месяцев культивирования; в – регенеранты на стадии мультиплицирования; г – каллус, 12 месяцев пролиферации.

Явление гаплоидизации встречается достаточно редко, но в ранних работах данное явление отмечали как в культурах *in vivo*, так и *in vitro*. Формирование двух отдельных веретен деления в клетке является важным процессом сокращения числа хромосом и гаплоидизации *in vivo*, что впервые было продемонстрировано на видах рода *Trillium* L. и названо соматической гаплоидизацией (Wilson, Cheng, 1949; D'Amato, 1990). Похожее явление было выявлено в культуре *in vitro*, в каллусных тканях, полученных из суспензии *Phaseolus coccineus* L. (род *Phaseolus*) (Bennici et al., 1976) и каллусах из почек *Allium sativum* L. (род *Allium*) (Novak, 1974). Позднее подобное явление было зафиксировано для культуры клеток моркови, которая часто проявляла «мейотический» фенотип с образованием хиазм, сравнимых с мейозом при микроспорогенезе моркови; данное явление было названо соматическим мейозом. Авторы предположили, что подобное

сокращение хромосом является важным моментом соматической изменчивости, влияет на появление рецессивных мутаций и отражается на эмбриогенезе культуры моркови *in vitro* (Ronchi et al., 1992).

Каллусная культура старше 12 месяцев культивирования отличалась преобладанием тетраплоидных ядер (рис. 2 г), с показателем эндополиплоидизации генома 0,77. Гистограмма регенерантов, полученных после трех месяцев культивирования каллуса, демонстрирует ядра с содержанием ДНК 2С, 4С и 8С, а показатель эндополиплоидизации равен 1,05 (рис. 2 б).

Показатель эндополиплоидизации снижался на стадии мультпликации до значения 0,77. Самое низкое значение эндополиплоидизации наблюдали для регенерантов, полученных после 12 месяцев культивирования каллуса (0,55). Так же, как и для каллусов с данным сроком культивирования, на гистограмме присутствовали пики, соответствующие ядрам с содержанием ДНК 4С и 8С.

В результате цитологического исследования установлено, что количество хромосом *I. britannica* в норме равно $2n = 16$. В результате исследования методом проточной цитометрии относительное содержание ДНК *I. britannica* в норме составило $2C = 2,6$ пг. Размер изменений относительного содержания ДНК каллусов после 3 и 6 месяцев культивирования являлся незначительным. В редких случаях наблюдалось значительное уменьшение относительного содержания ДНК в I4 (регенеранты после 12 месяцев культивирования) до 1,95 пг. Исследование хромосом регенерантов после 12 месяцев культивирования выявило отклонение от стандартного $2n = 16$ на 2 хромосомы. Показатель полиплоидизации не превышал значений 0,08, что свидетельствует об отсутствии эндополиплоидии.

Несмотря на тот факт, что полученные регенеранты не отличались фенотипически, изменчивость относительного содержания ДНК и уровня плоидности находилась на разном уровне между регенерантами *R. acetosa* и *I. britannica*. Отличительной особенностью регенерантов *R. acetosa* являлась полиплоидия и значительные изменения в относительном содержании ДНК, тогда как для регенерантов *I. britannica* была отмечена утрата хромосом и соответствующее снижение относительного содержания ДНК. Как таковых фенотипических изменений на стадии регенерации для *R. acetosa* и *I. britannica* отмечено не было, хотя возможные последствия при развитии, в том числе при формировании цветков и генеративных органов, вполне возможны.

Глава 6. Генетическая изменчивость в культуре *in vitro* на основе RAF-маркеров

Полиморфизм растений-доноров эксплантов *R. acetosa* составил 75,7 %. Полиморфизм в каллусной линии трех месяцев пролиферации увеличился до 89,72 %. В отсутствии регуляторов роста, при индукции геммогенеза, наблюдалось снижение полиморфизма каллусных линий (%P, P4 = 70,9 ± 3,28). Тогда как после регенерации, наблюдалось восстановление полиморфизма (%P, P5 = 78,5 ± 3,28). Индекс Шеннона, используемый в качестве меры разнообразия внутри исследуемых групп, подтверждал данные полиморфизма (рис. 3). Так же, как и в случае с уровнем полиморфизма, индекс Шеннона имел максимальное значение для линии каллусов трех месяцев культивирования (P2; 0,398). Минимальное значение индекса Шеннона фиксировали для каллусов на среде для стимулирования геммогенеза P4 (0,303). Генетические дистанции Нея между линиями возрастали пропорционально длительности культивирования и достигали максимального значения между контрольными линиями (P1) и линиями регенерантов (P5).

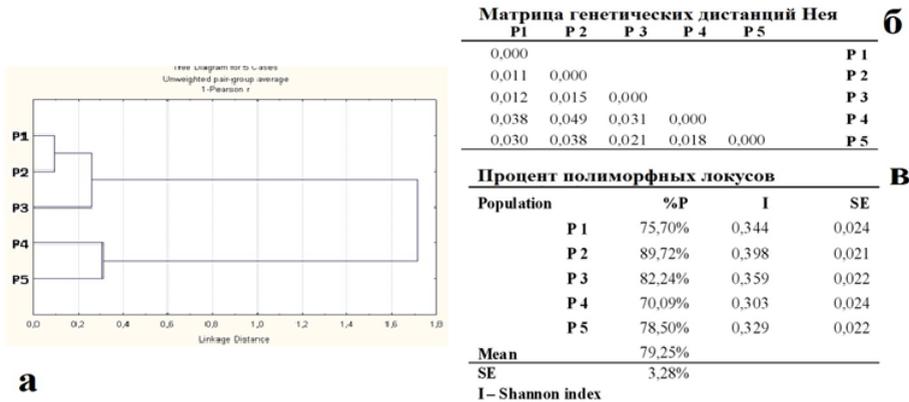


Рис. 3. Анализ генетического разнообразия *Rumex acetosa* L. с использованием генетических дистанций Нея (а, б); полиморфизма с индексом Шеннона (в). %P – процент полиморфных локусов; I – индекс Шеннона; SE – стандартная ошибка среднего.

AMOVA-анализ пяти линий показал, что 93 % вариаций возникли внутри линий, а 7 % – между линиями ($P < 0,001$). Среднее попарное значение PhiPT (аналог Fst), установленное между линиями, характеризует широкий уровень генетической дифференциации, от низкого между линиями каллусов 12-ти месяцев (P4) и шести месяцев пролиферации (P3) (0,010) до очень высокого (0,122) между каллусной

линией 3-х месяцев пролиферации и линией регенерантов, а также между линиями P1 и P5 (0,106).

Анализ методом Байеса в программе Structure и расчет относительного значения апостериодной вероятности (K 1–10) методом Evanno в программе Structure Harvester v0.6.94 (Evanno et al.,2005; Earl, vonHoldt, 2012), с периодом burn-in 10000 и MCMC 100000 для каждой из 20 повторностей показали, что максимальное значение логарифма апостериодной вероятности было получено для числа групп K = 5 (рис. 4). Анализ выборки методом генетических дистанций Нея и расчета полиморфизма линий (с помощью индекса Шеннона) по всем 64 генетическим признакам для *I. britannica* показал, что длительное культивирование клеток на питательных средах в присутствии ауксинов и цитокининов вызывает увеличение полиморфизма соматклонов.

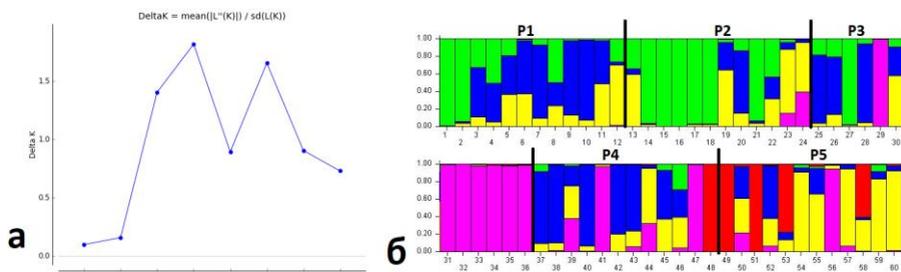


Рис. 4. Выходные данные кластерного анализа в программе Structure для *Rumex acetosa* L. а – данные расчета DeltaK; б – кластеризация при K = 5.

Удаление регуляторов роста из состава питательной среды вызывает снижение полиморфизма. При этом после регенерации растения и переноса его на питательные среды без гормонов также наблюдается снижение полиморфизма линий.

Другая ситуация наблюдается с генетическими дистанциями между данными группами. Генетические дистанции Нея увеличиваются пропорционально длительности культивирования и максимальны между контрольными линиями (I1) и линиями регенерантов (I4), что наглядно демонстрирует UPGMA-анализ матрицы генетических дистанций Нея.

Эти данные свидетельствуют о возникновении генетической неоднородности между растением-донором, каллусами и регенерантами. Индекс Шеннона косвенно подтверждает эти данные и достигает максимальных значений у представителей I2. AMOVA-анализ для четырех линий показал, что 85 % вариаций были внутри линий, когда 15 % были связаны с вариациями между линиями ($P < 0,001$). Среднее попарное значение PhiPT составило 0,148, что указывает на высокий

уровень генетической дифференциации. Максимальное значение PhiPT наблюдалось между контрольной линией и линией регенерантов (0,236), минимальное – между контрольной линией и каллусной линией (0,075).

Глава 7. Генетическая изменчивость *R. acetosa* на основе данных NGS-секвенирования

Показанный ранее высокий полиморфизм RAF-маркеров для *R. acetosa* как внутри каллусных линий, так и между ними свидетельствует о высоком уровне полиморфизма нуклеотидов (SNP). Для исследования нуклеотидных последовательностей и выявления SNP был использован метод NGS-секвенирования (Roche 454). Для анализа мутаций была проведена амплификация с показавшими полиморфизм RAF-маркерами K02b и K02a. В результате кластеризации последовательностей с RAF маркерами было получено 42 кластера с высоким уровнем гомологии последовательностей. Среди них три были аннотированы как участки функциональных генов, мутации в которых обнаружены только у одного. Для оставшихся последовательностей гомологий обнаружено не было, или же они были аннотированы как геномная ДНК.

Среди последовательностей без аннотации с высоким уровнем полиморфизма нуклеотидов особенно можно выделить один кластер. В данном случае для контрольной линии (P1) выявлено 48 случайных замен в 12 вариантах ДНК последовательностей, среди которых девять охарактеризованы как однонуклеотидные полиморфизмы (SNP). У каллусной линии трех месяцев культивирования (P2) обнаружено 46 случайных мутаций и 12 SNP. На каллусной линии 12-ти месяцев культивирования (P4) выявлено 30 случайных мутаций и 13 SNP, а у линии регенерантов (P5) – 13 случайных мутаций и 20 SNP. Полученные данные коррелируют с данными фрагментного анализа и подтверждают выводы о зависимости молекулярных вариаций на ранних стадиях пролиферации каллуса и случайных замен нуклеотидов. Данный вывод позволяет утверждать и о частичном сохранении данных мутаций у растений-регенерантов, так как генетические дистанции, рассчитанные на основе фрагментного анализа, максимальны между растениями-донорами эксплантов и регенерантами.

Для построения кладограммы на основе данных NGS-секвенирования фрагментов RAF-анализа использовали программное обеспечение для полногеномного выравнивания и построения синтетных блоков Mauve (Darling et al., 2004). Для каждого из образцов были получены объединенные последовательности длиной от 59696 п.о., для контрольных образцов (P1) и до 131655 п.о. для регенерантов (P5).

Полученные полно геномные выравнивания исследовали отдельно с использованием утилиты MrBayes в программе Geneious для построения кладограмм на основе байесовских вероятностей, с периодом burn-in 100000 и количеством цепей MCMC 1000000 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001) (рис. 5). Установлено, что с высокой долей вероятности (0,9–1,0) обнаруживается различие между стадиями культивирования P2-P3 и P4-P5 относительно контрольных образцов эксплантов стадии P1, что отчасти подтверждает данные UPGMA анализа генетических дистанций Нея на основе фрагментного RAF-анализа.

Данные выводы позволяют использовать RAF-маркеры для экспресс-диагностики генетических полиморфизмов в культуре *in vitro* и оценки влияния соматональной изменчивости на генотипы исследуемых видов растений.

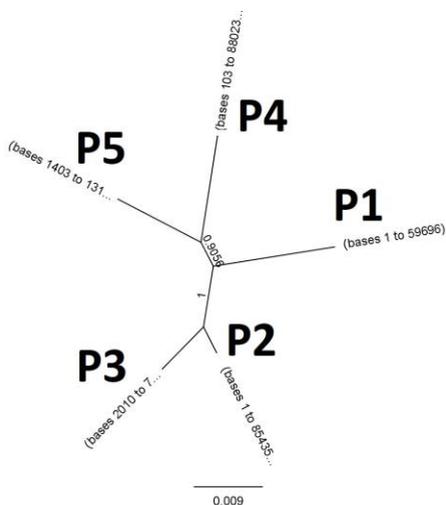


Рис. 5. Участок полиморфной последовательности ДНК *Rumex acetosa* L., полученной с использованием NGS-секвенирования.

Для секвенирования метилированных последовательностей ДНК *R. acetosa* использовали модифицированный нами метод метилчувствительного полиморфизма длин амплифицированных фрагментов – MAFLP (Marconi et al., 2013). После сборки, удаления повторов и нормализации было получено 448 последовательностей ДНК для MAFLP-маркеров. Для анализа метилированных участков ДНК отбирали нуклеотидные последовательности с преобладанием CpG участков с использованием утилиты Geneious CpG Island. В результате

после отбора было аннотировано 333 ДНК последовательности. Выявлено, что значительная часть последовательностей гомологична сателлитной ДНК и ДНК ретротранспозонов различного класса, депонированных в базах данных NCBI. Закономерности в функциональных генах представлены не так значительно и в большинстве случаев слабо коррелируют между стадиями культивирования. Результаты BLAST показывают наличие гомологичных фрагментов вовлеченных во множество процессов, таких, как дифференциация, фотосинтез, процессы клеточного дыхания, транспорт, генов F- и U- боксов, генов, вовлеченных в реакцию растений на стресс, таких как аквапорины и олигопептидазы. Однако присутствие дифференциального метилирования внутри или вокруг гена не является достаточным доказательством того, что экспрессия гена действительно регулируется метилированием. Тем не менее, метилирование может иметь опосредованную роль в других процессах регулирования или быть одним из этапов. Например, полученные в нашей работе последовательности ДНК, гомологичные BAG, F- и U-семействам, могут свидетельствовать о многоэтапном регулировании данных систем генов, так как известно, что экспрессия данных генов регулируется с помощью систем микроРНК и зачастую тканеспецифична. Среди последовательностей ДНК значительное количество гомологичны мобильным генетическим элементам, а именно ретротранспозонам из различных семейств. Интересным является тот факт, что уровень метилирования изменяется при длительном культивировании каллусов. Так, у контрольной линии *R. acetosa* нами отмечено метилирование ретротранспозонов семейства *Gypsy* (*Tat/Ogre*, *Bingo*) и *Copia* (*Maximus/Sire*). Несмотря на ожидания метилирование наблюдалось и на стадии пролиферации каллуса P2. На стадии длительного культивирования каллуса P4 наблюдаемые ранее метилированные ретроэлементы не обнаружены. На стадии регенерации (P5) отмечено метилирование ретротранспозона *Tat/Ogre* семейства *Gypsy* и транспозона семейства *Mutator*. Таким образом, культуры тканей могут активировать некоторые мобильные генетические элементы, тогда как другие остаются неповрежденными или их уровень активности изменяется.

В большинстве консервативных групп генов выявлены только различия в метилировании, тогда как в последовательностях нуклеотидов изменений обнаружено не было, что также косвенно подтверждает обеспечение изменчивости вариациями в мобильных генетических элементах и случайными мутациями в некодирующей

ДНК. Для построения кладограммы на основе данных NGS-секвенирования фрагментов метилчувствительного AFLP-анализа использовали программное обеспечение для полногеномного выравнивания и построения синтетных блоков Mauve с прогрессивным алгоритмом Mauve (Darling et al., 2004). Для каждого из образцов были получены объединенные последовательности длиной от 87646 п.о., для каллусов со сроком культивирования 12 месяцев (P4) до 139987 п.о. для контрольных образцов (P1). Полученные полно геномные выравнивания исследовали отдельно с использованием утилиты MrBayes в программе Geneious, с периодом burn-in 100000 и количеством цепей MCMC 1000000 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). Анализируя полученную кладограмму и интерпретируя данные именно с точки зрения общего метилирования, обнаруживается различие между стадиями культивирования P1-P2 и P3-P5, что говорит о значительных изменениях в метилировании, именно после 6 месяцев культивирования каллуса, тогда как на ранних этапах характер метилирования остается схожим с контрольными образцами эксплантов (рис. 6).

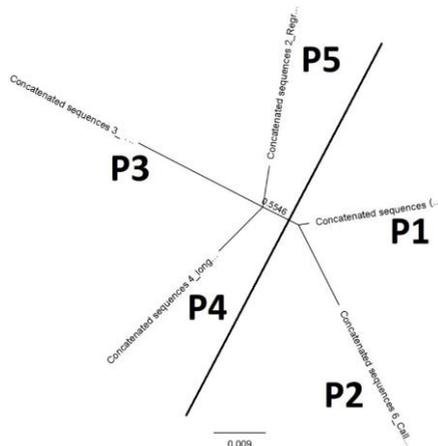


Рис. 6. Кладограмма на основе полно геномного выравнивания данных NGS-секвенирования фрагментов метилчувствительного AFLP-анализа образцов *Rumex acetosa* L. со стадий трех месяцев культивирования каллуса (P2), шести месяцев (P3), 12 месяцев (P4) и регенерантов полученных после 12 месяцев культивирования каллуса (P5) относительно первоначальных эксплантов (P1).

У всех исследованных образцов на различных стадиях культивирования *in vitro* отмечена высокая представленность последовательностей сателлитов как аутосом, например, *RAE180*, так и половых хромосом, например, *RAYSI*. Наши результаты подтверждают

некоторые выводы и предположения исследователей о метилировании конститутивного гетерохроматина аутосом.

В результате работы была подготовлена библиотека кДНК каллуса *R. acetosa* 12-ти месяцев культивирования, полученной после обогащения мРНК с олиго-dT олигонуклеотидом в результате обратной транскрипции тотальной РНК *R. acetosa*. GO аннотация – международная система классификации для стандартизации функций генов, которая включает три GO категории: биологические процессы, молекулярные функции и клеточный компонент. Результаты анализа являются еще одним доказательством изменчивости, выявленной нами в результате анализа транскриптома и GO аннотации. Пул мРНК менее разнообразен в каллусных линиях, что, видимо, связано со снижением специализации и дедифференцировкой клеток.

Анализ цитогенетической и молекулярно-генетической изменчивости показал видоспецифичность ответа культур клеток и тканей растений *in vitro*. Если для *I. britannica* методы анализа полиморфизмов ДНК выявили незначительную разнородность в линиях, то для *R. acetosa* наблюдались достаточно серьезные вариации, как в генотипе, так и в кариотипе. Такие изменения, как случайные мутации, изменение активности мобильных генетических элементов и вариации на уровне эпигенетических механизмов регуляции лежат в основе полиморфизмов, выявленных с использованием фрагментного анализа. Подобная масштабная изменчивость в геноме отражается на сохранности и экспрессии трансгенных конструкций при создании растений с заданными признаками, а также и на генетическом потенциале как основе генетического разнообразия и материала для эволюции сохраняемого вида.

Заключение

В результате сравнительного исследования двух модельных объектов *R. acetosa* L. и *I. britannica* L. был показан различный уровень соматональной изменчивости и генетического разнообразия каллусных линий и микроклонов. Проведена оценка соматональной изменчивости в зависимости от видовой принадлежности и длительности культивирования *in vitro* с точки зрения сохранения исходного генетического материала, а также устойчивости искусственно присвоенных признаков на примере трансгенных конструкций с маркерным геном *gusA*. В ходе работы были выявлены различия в ответе *R. acetosa* и *I. britannica* на одинаковые условия культуры *in vitro*. Более масштабные перестройки, включая пloidии, утраты хромосом, большую

генетическую изменчивость и снижение копийности трансгенных конструкций в трансформированных линиях, характерны для *R. acetosa*. Установлено, что характер соматической изменчивости является схожим у исследованных объектов. На начальных стадиях пролиферации мы наблюдали увеличение генетического полиморфизма, который снижался через несколько месяцев после культивирования и на стадии регенерации. Тем не менее для *I. britannica* не характерно изменение количества хромосом, тогда как у *R. acetosa* наблюдалась полиплоидия уже на ранних стадиях пролиферации каллуса, а также появление гаплоидных клеток. При последующем культивировании клеток каллуса культура состояла исключительно из полиплоидов. Увеличение генетических полиморфизмов происходит на фоне накопления случайных мутаций и деметилирования ретроэлементов. В процессе длительного поддержания пролиферации клеток каллуса происходит отбор по уровню устойчивости к условиям культуры *in vitro*, что приводит к изменению исходного генотипа, сформированного в процессе естественной эволюции вида. На примере *R. acetosa* нами была показана такая природная закономерность в видообразовании, как «даунсайзинг» генома – уменьшение размера моноплоидного генома в полиплоидных рядах и видах полиплоидного происхождения.

Таким образом, в результате проведенной работы с использованием техники длительного поддержания пролиферации каллусных клеток получены важные данные о влиянии соматической изменчивости на сохранение генотипов растений в культуре *in vitro*. Полученные данные и разработанные методы исследования соматической изменчивости могут быть использованы в коллекциях гермоплазмы, селекционных работах, а также в изучении механизмов соматической изменчивости.

Выводы

1. Выявлена специфичность уровня соматической изменчивости в культуре клеток *Rumex acetosa* L. и *Inula britannica* L. *in vitro*, связанная как с явлениями полиплоидизации и эндополиплоидизации клеток, гаплоидизацией, утратами хромосом, случайными мутациями, так и с изменениями на эпигенетическом уровне, связанными с метилированием и деметилированием генов и ретротранспозонов.

2. Полиплоидизация генома клеток при культивировании каллусных культур *Rumex acetosa* сопровождается потерей части ДНК – величина моноплоидного генома 1Сх в тетраплоидных клетках уменьшается.

3. В изменчивости генетического полиморфизма играют роль случайные мутации, количество которых сокращается на стадии регенерации и длительного культивирования.

4. Характер изменчивости генетического полиморфизма являлся схожим у исследованных линий *R. acetosa* и *I. britannica*, генетический полиморфизм которых увеличивался на ранних стадиях пролиферации клеток каллуса и восстанавливался через несколько месяцев после культивирования и на стадии регенерации.

5. Выявлено деметилирование ретротранспозонов *Tat/Ogre*, *Bingo*, семейства *Gypsy* и *Maximus/Sire*, семейства *Copia* на стадии пролиферации каллуса и метилирование некоторой их части на стадии регенерации.

6. Различия в экспрессии β -глюкуронидазы трансформированных линий *R. acetosa* обусловлены элиминацией гена *gusA* в процессе длительного культивирования. Для *I. britannica* с низким уровнем соматональной изменчивости различий в экспрессии и изменений в копийности *gusA* не наблюдалось.

Перечень работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах из списка ВАК, Web of Science и Scopus

1. **Скапцов, М.В.** Секвенирование и GO аннотация транскриптома культуры клеток и тканей *Rumex acetosa in vitro* / М.В. Скапцов, М.Г. Куцев, М.А. Краснобородкина, С.В. Смирнов, О.В. Уварова, Т. А. Сеницына, А. А. Кечайкин, А. И. Шмаков // *Turczaninowia*. – 2017. – Т. 20. – Вып. 4. – С. 119–124.

2. Skaptsov, M. Spontaneous hybridization among *Allium tulipifolium* and *A. robustum* (*Allium* subg. *Melanocrommyum*, Amaryllidaceae) under cultivation / S. Smirnov, **M. Skaptsov**, A. Shmakov, R. Fritsch, N. Friesen // *Phytotaxa*. – 2017. – Vol. 303. – P. 155–164.

3. **Skaptsov, M.** The phenomenon of endopolyploidy in some species of the *Chenopodioideae* (*Amaranthaceae*) / M.V. Skaptsov, M.N. Lomonosova, M.G. Kutsev, S.V. Smirnov, A.I. Shmakov // *Botany letters*. – 2017. – Vol. 64. – p. 47–53.

4. **Skaptsov, M.** Effect of modified heptamethyltrisiloxane on the efficiency of agrobacterium-mediated transformation and expression of recombinant structure in plant cell and tissue culture / M. Skaptsov, M. Kutsev, M. Filipenko, E. Khrapov, H. Shinoyama // *Key engineering materials*. – 2016. – Vol. 63. – P. 503–510.

5. **Skaptsov, M.V.** Possibilities of *de novo* transcriptome sequencing in phylogenetic research on an example of *Taraxacum officinale* (*Asteraceae*) /

M.G. Kutsev, M.V. Skaptsov, S.V. Smirnov, T.A. Sinitsyna, A.A. Kechaykin, M.S. Ivanova, A.I. Shmakov // Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University. – 2016. – Vol. 6. – P. 319–323.

6. **Скапцов, М.В.** Проблемы стандартизации в проточной цитометрии растений / М.В. Скапцов, С.В. Смирнов, М.Г. Куцев, А.И. Шмаков // Turczaninowia. – 2016. – Т. 19. – Вып. 3. – С. 120–122.

7. **Скапцов, М.В.** Уровни ploидности и относительного содержания ДНК в культуре клеток и тканей растений *in vitro* / М.В. Скапцов, М.А. Краснобородкина, М.Г. Куцев, С.В., Смирнов, А.И. Шмаков, А.В. Мацюра // Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University. – 2016. – Vol. 6. – P. 33–38.

8. **Скапцов, М.В.** Сомаклональная изменчивость девясила британского – *Inula britannica* L. в культуре *in vitro* / М. В. Скапцов, Д. Л. Белкин, С. В. Смирнов, М. Г. Куцев // Turczaninowia. – 2015. – Т. 18. – Вып. 4. – С. 41–48.

9. **Скапцов, М.В.** Содержание ядерной ДНК в некоторых сортах растений, используемых в качестве внешних стандартов в проточной цитометрии / М.В. Скапцов, С.В. Смирнов, М.Г. Куцев // Turczaninowia. – 2014. – Т. 17. – Вып. 3. – С. 72–78.

10. **Скапцов, М.В.** Оптимизация сред для культивирования растений *in vitro* на примере щавеля водного (*Rumex aquaticus* L.) / М. В. Скапцов, Д.В. Балабова, М. Г. Куцев // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – Т. 1. – С. 31–35.

11. **Скапцов, М.В.** Влияние 24-эпибрассинолида на продолжительность культивирования щавеля (*Rumex acetosa* L.) *in vitro* / М.В. Скапцов, М.Г. Куцев // Вестник ТГУ. Биология. – 2013. – Т. 22. – №2. – С. 52–56.

12. **Скапцов, М.В.** Изменения кариотипа *Rumex acetosa* L. в культуре *in vitro* на фоне явления соматклональной изменчивости / М.В. Скапцов, М.Г. Куцев // Известия алтайского государственного университета. – 2012. – Т. 3-2. – С. 57–59.

Публикации в других изданиях

13. **Скапцов, М.В.** Изменчивость метилирования сателлитной ДНК и мобильных генетических элементов *Rumex acetosa* в культуре *in vitro* / М.В. Скапцов, М.Г. Куцев, М.А. Краснобородкина, А.А. Тросничков, И.В. Кайгалов, А.И. Шмаков // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: сборник научных статей по материалам конференции. Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2017. – С. 264–267.

14. **Скапцов, М.В.** Полиморфизм горных и горно-равнинных популяций некоторых представителей флоры АГС и перспективы их

сохранения в культуре *in vitro* / М.В. Скапцов, Д.Л. Белкин, А.А. Кечайкин, М.Г. Куцев, А.И. Шмаков // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: сборник научных статей по материалам конференции. Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2015. – С. 375–379.

15. **Скапцов, М.В.** Влияние 1,1,1,3,5,5,5-гептаметилтрисилоксана на эффективность агробактериальной трансформации и экспрессии рекомбинантных конструкций в культуре клеток и тканей растений *in vitro* / М.В. Скапцов, М.Г. Куцев // Перспективы развития фундаментальных наук: материалы 12 Международной конференции студентов и молодых ученых (Томск, 21– 24 Апреля 2015 г.). – Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 2015. – С. 874–876.

16. **Скапцов, М.В.** Влияние поли-п-виниламидов на рост и развитие культур клеток и тканей растений *in vitro* / М.В.Скапцов, М.Г. Куцев // Биотехнология и общество в XXI веке: сборник научных статей по материалам конференции. Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2015. – С. 398–400.

17. **Скапцов, М.В.** Генетическая трансформация сосудистых растений с помощью *Agrobacterium tumefaciens* / М.В. Скапцов // Труды молодых ученых Алтайского государственного университета: сборник научных статей по материалам конференции. Барнаул: Изд-во АлтГУ. – 2010. – С. 172–173.

18. **Скапцов, М.В.** Возможности проточной цитометрии в современной науке о растениях / М.В. Скапцов // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: сборник научных статей по материалам конференции. Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2014. – С. 204–207.

19. **Скапцов, М.В.** Композиция на основе 24 – эпибрассинолида для регуляции развития и защиты растений / М.В. Скапцов, С.В. Смирнов, М.Г. Куцев // патент на изобретение № 2513232. – 2014.

20. **Скапцов, М.В.** Набор синтетических олигонуклеотидов для детектирования количества копий гена бета-глюкуронидазы в трансгенных растениях / М.В. Скапцов, О.В. Уварова, М.Г. Куцев // патент на изобретение № 2555542. – 2015.

21. **Скапцов, М.В.** Набор синтетических олигонуклеотидов для проведения метилчувствительной амплификации ДНК / патент на изобретение № 2662664. – 2017.