

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи



СКАПЦОВ Михаил Викторович

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

03.01.07 – Генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель –
доктор биологических наук,
профессор Шмаков А.И.

Барнаул – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Ресурсные виды <i>Rumex acetosa</i> L. и <i>Inula britannica</i> L.....	11
1.2. Культура <i>in vitro</i> для сохранения биоразнообразия и генофонда растений.....	16
1.3. Изменчивость растений в культуре <i>in vitro</i>	26
1.4. Генетическая трансформация и изменчивость трансгенных конструкций в культуре растений <i>in vitro</i>	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	45
2.1. Объекты и схема исследования.....	45
2.2. Методы исследования.....	47
2.2.1. Культивирование <i>in vitro</i>	49
2.2.2. Агробактериальная трансформация и анализ трансформированных линий.....	51
2.2.3. Цитогенетический анализ.....	57
2.2.4. Фрагментный анализ.....	59
2.2.5. NGS-секвенирование.....	60
ГЛАВА 3. ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO</i>	65
3.1. Введение в культуру <i>R. acetosa</i> и <i>I. britannica</i>	65
3.2. Культивирование <i>in vitro</i> <i>R. acetosa</i> и <i>I. britannica</i>	67
ГЛАВА 4. ЭКСПРЕССИЯ β -ГЛЮКУРОНИДАЗЫ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	70
ГЛАВА 5. ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	77
5.1. Цитогенетическая изменчивость <i>R. acetosa</i>	77
5.2. Цитогенетическая изменчивость <i>I. britannica</i>	84
ГЛАВА 6. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	86
6.1. Генетическая изменчивость <i>R. acetosa</i>	86
6.2. Генетическая изменчивость <i>I. britannica</i>	90
ГЛАВА 7. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ <i>R. ACETOSA</i> НА ОСНОВЕ ДАННЫХ NGS-СЕКВЕНИРОВАНИЯ.....	94

7.1. NGS-секвенирование случайных фрагментов ДНК.....	94
7.2. NGS-секвенирование фрагментов MAFLP-анализа.....	98
7.3. NGS-секвенирование транскриптома.....	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	112
ВЫВОДЫ.....	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	115

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТХП - 4-амино-3,5,6-трихлорпиколиновая кислота

БА – 6-бензиладенин

ДАПИ 4'-6-диамино-2-фенилиндола

МС – питательная среда Мурасиге и Скуга

НУК – α -нафтилуксусная кислота

ПВП – поливинлпирролидон

ПИ – иодид пропидия

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ – полиэтиленгликоль

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота

AFLP – полиморфизм длин амплифицированных фрагментов

AMOVA – Analysis of molecular variance (анализ молекулярных вариаций)

DAF – DNA amplification fingerprinting (анализ амплифицированных фрагментов ДНК)

dNTP – дезокситрифосфат

ISSR – inter-simple sequence repeat (межмикросателитные повторы)

MAFLP – Methylsensitive Amplified Fragment Length Polymorphism (метилчувствительный полиморфизм длин амплифицированных фрагментов)

MCMC - Markov Chain Monte Carlo (Монте-Карло с цепями Маркова)

RAF – randomly amplified DNA fingerprinting (анализ случайно амплифицированных фрагментов ДНК)

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA (случайно амплифицированный полиморфизм ДНК)

UPGMA – Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages (метод невзвешенных парных групп с арифметическим средним)

X-Gluc – 5-бромо-4-хлоро-3-индолил- β -D-глюкуронид

ВВЕДЕНИЕ

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 генной 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 соматической изменчивостью. Тем самым

задача сохранения генотипа и, тем более, эпигенотипа объекта генетической коллекции как материала для последующих селекционных манипуляций оказывается нерешенной (Larkin, Scowcroft, 1981). Соматональная 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 *hptII*, *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

соматональной 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 соматклональной 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 соматклональной 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 соматклональной 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 геномной 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

1.1. Ресурсные виды *Rumex acetosa* L. и *Inula britannica* L.

Rumex acetosa L. был описан К. Линнеем в 1753 году из Европы ("Habitat in Europae pascuis. in Alpihus.") и относится в настоящее время к семейству гречишные – Polygonaceae Juss. В роде *Rumex* вид относится к подроду *Acetosa* (Meisn.) Rech.f.), что подтверждается и молекулярно генетическими данными (Schuster et al., 2015). Вид достаточно полиморфен на протяжении всего ареала, охватывающего почти всю Евразию, Северную Африку (в северной части естественен, в других районах интродуцирован), Южную и Северную Америки (на данных континентах вид интродуцирован). Широкий ареал и высокий полиморфизм позволил в разное время выделить из него несколько подвидов и вариаций, ряд из которых признается большинством систематиков за самостоятельные виды (*Rumex acetosa* subsp. *alpestris* (Scop.) Á.Löve = *Rumex alpestris*, *R. acetosa* subsp. *lapponicus* Hiitonen = *Rumex lapponicus*), другие описанные таксоны являются синонимами *Rumex acetosa* (*Rumex acetosa* subsp. *amplexicaulis* (Lapeyr.) O.Bolòs & Vigo, subsp. *biformis* (Lange) Valdés Berm. & Castro, subsp. *planellae* (Pau & Merino) Muñoz Garm. & Pedrol, subsp. *fontanopaludosus* (Kalela) Hyl.), а некоторые признаются только в ранге подвидов (*Rumex acetosa* subsp. *hibernicus* (Rech.f.) Akeroyd, subsp. *islandicus* (Á.Löve & D.Löve) Ö.Nilsson, subsp. *vinealis* (Timb.-Lagr. & Jeanb.) O.Bolòs & Vigo, subsp. *papillaris* (Boiss. & Reut.) Franco).

Морфологическое описание *Rumex acetosa*, согласно «Флоре СССР» (1936), приводится далее. Многолетнее двудомное растение. Корень короткий, мочковатый, стебель прямой бороздчатый, до 1 м высотой, в соцветии с небольшими зубчатыми раструбами, ветвящийся; листья несколько мясистые, нижние и прикорневые длинно-черешковые, 2,5–13 см длиной, 1,5–5 см шириной, яйцевидно–продолговатые, коротко или тупо заостренные, при основании стреловидные, с вниз направленными треугольными, острыми лопастями, иногда

почти копьевидные; верхнестеблевые сидячие, более узкие, чем нижние. Соцветие – негустая, узкая метелка; цветки однополые, двудомные, розоватые, красные, желтоватые или смешанные, собранные в соцветия негустыми кистями, цветоножке сочленяющихся посередине; у пыльниковых цветков доли околоцветника продолговато–овальные, внутренние немного крупнее наружных, опадающие, все направлены кверху; у пестичных цветков наружные доли отогнуты вниз и прижаты к цветоножке, внутренние прямостоячие, при плодах разрастаются до 3,5–4 мм, почти округлые, цельнокрайние, с сердцевидным основанием, в выемке с мясистым, вниз обращенным придатком, расположенным в выемке; орешки трехгранные, темно-коричневые, блестящие, остроконечные, 1,5–2 мм длиной, менее 1 мм шириной (Лозина-Лозинская, 1936).

Встречается данный вид на лугах, в разреженных лесах, травянистым склонам, поднимаясь в горах до альпийского пояса.

Вид используется как лекарственное, пищевое, техническое, кормовое растение. Используются корневища, надземная часть, цветки. В растении содержатся фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды, производные нафталина, антрахиноны, органические кислоты, витамины С, РР, К, Е (Растительные ресурсы..., 2008). Сок из надземной части обладает желчегонными свойствами (Соколов, Замотаев, 1988), а водный экстракт гепатопротекторными (Okonkwo, Msothi, 1995). Хризофанол, фисцион и другие антрахиноны проявляют антимуутагенную и цитотоксическую активности (Растительные ресурсы..., 2008; Lee et al., 2005). Экстракт плодов щавеля обладает антимикробной и противогрибковой активностями (Wegiera et al., 2011).

Среди представителей рода *Rumex*, кроме *R. acetosa* культивируются еще четыре вида: *R. rugosus*, *R. thyrsiflorus*, *R. scutatus*, *R. alpestris*, с которыми возможно проведение гибридизаций в рамках селекционных работ. Культурные и дикие растения *R. acetosa* ценны для селекции в направлении увеличения содержания витаминов, зимостойкости, продуктивности, скорости отрастания после срезки.

Внимание цитогенетиков и систематиков привлекает как высокий полиморфизм *Rumex*, 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). Тем самым, *R. acetosa* может являться ценным модельным объектом в исследовании распределения и механизма формирования полов растений.

Inula britannica L. была описана К. Линнеем в 1753 году из Европы ("Habitat in Lufatia, Bavaria, Scania") и входит в состав семейства Asteraceae Bercht. et J. Presl. Вид относится к роду *Inula* L. в традиционном его понимании. Однако, в последнее время, основываясь на молекулярно генетических данных, большая часть видов рода *Inula* перенесена в род *Pentanema* Cass., включая и *Inula britannica* L. (Gutiérrez-Larruscain et al., 2018). Из широко известных видов в роде *Inula* осталась только *Inula helenium* L. Нами род *Inula*, исходя из традиционного подхода к систематике данного рода, понимается пока в широком смысле.

Широко полиморфный вид на протяжении всего ареала, охватывающего Европу, Азию (Россия, Кавказ, Средняя Азия, Монголия, Китай, Индия, Турция, Иран, Пакистан) и Северную Америки (заносное). Высокий полиморфизм, экологическая пластичность вида на всем широком ареале позволила описать множество внутривидовых таксонов. Ряд таких таксонов признается большинством систематиков за самостоятельные виды (subsp. *japonica* (Thunb.) Kitam. (var. *japonica* (Thunb.) Franch. & Sav. = *Inula japonica* Thunb.; subsp. *linariifolia* (Turcz.) Kitam. (var. *linariifolia* (Turcz.) Regel) и var. *maximoviczii* Regel = *Inula linariifolia* Turcz.), а некоторые признаются только в ранге подвидов или вариаций в рамках общего вида (*Inula britannica* subsp. *hispanica* (Pau) O.Bolòs & Vigo, subsp. *latifolia* U.P. Prato & R.M. Nabiev, var. *eglandulosa* R.M. Nabiev, var. *longilepis* R.M. Nabiev, var. *chinensis* (Rupr. ex Maxim.) Regel, var. *ramosissima* Ledeb., var. *tymiensis* Kudô, var. *sublanata* Kom. и др.).

Многие виды рода *Inula* представляют экономический интерес, как декоративные садовые растения, например, *I. britannica* L., *I. ensifolia* L., *I. helenium* L., *I. oculus-christi* L. и *I. orientalis* Lam. Род также хорошо известен благодаря наличию инулина, олигосахарид высокого терапевтического интереса. Это соединение можно найти почти во всех сложноцветных, и был назван в честь *Inula*, потому что он был впервые получен из корневища *I. royleana* DC. (Anderberg, 2009).

Морфологическое описание *Inula britannica*, согласно «Флоре СССР» (1959), приводится далее. Многолетнее растение 15–65 см высотой, прижато волосистое или мягкошерстисто опушенное, покрытое многоклеточными длинными белыми тонкими волосками, часто в основании расширенными; корневище цилиндрическое, 1–2 мм в диаметре, узловатое косое ползучее; стебель прямой продольно-ребристый восходящий, простой или в верхней части ветвящийся, в нижней иногда красноватый; нижние листья эллиптические или ланцетные, редко яйцевидные, 4–11 см длиной, 1–2,5 см шириной, суженные в основании в черешке 1–5 см длиной, средние и верхние продолговато-ланцетные, 2,5–9,0 см длиной, 0,6–2,2 мм шириной, сидячие, с сердцевидными стеблеобъемлющими основаниями, иногда и с ушками, все листья острые цельнокрайние или с мелкими редкими зубчиками и короткими шипиками по краям, с верхней стороны гладкие или с рассеянными волосками, с нижней – густо железисто-волосистые. Корзинки большей частью немногочисленные, 2–5 (редко 25), собранные в рыхлый щиток, иногда одиночные, 3–4,5 (5) см в диаметре, в основании с длинными ланцетными острыми листочками, 0,7–1,5(2,5) см шириной; цветоносы тонкие, 1–4,5 см длиной; обертки 1,3–2,0(2,2) см в диаметре, многолистные; листочки равные острые отогнутые, наружные – линейно-ланцетные, 8 мм длиной, 0,8 мм шириной, снаружи зеленые, прижато волосистые; средние – одинаковые по форме с наружными, 0,6 мм шириной, вверху зеленые гладкие, в нижней части опушенные, внутренние – желтовато-белые пленчатые линейные, 0,4 мм шириной, гладкие, длинно и рассеянно реснитчатые, все покрытые золотистыми железками; очень редко листочки

разрастаются и превышают язычковые цветки, последние 1,5–1,6 см длиной, в два раза длиннее листиков обертки, желтые, с трубочками, равными или немного короче хохолков, и линейными язычками, 1 см длиной, 0,7 мм шириной, с тремя жилками и тремя дельтовидными острыми зубцами, на верхней стороне рассеяно железистыми; трубчатые цветки желтые, большей частью равны хохолкам, пятизубчатые, зубчики равные, снаружи покрыты золотистыми железками; семянки линейно продолговатые, 1 мм длиной, 0,2 мм шириной, бурые, в основании немного суженные, продольно-ребристые с прямыми белыми, прижатыми вверх двуклеточными волосками, в верхней части иногда с маленькими железками; хохолки грязно-белые, 4–5 мм длиной с 15–17 щетинками, в основании равно и коротко сросшимися (Горшкова, 1959).

Вид встречается по берегам рек, на пойменных, заливных, влажных лесных и остепненных лугах, осоковых болотах, лесных опушках, обочинах дорог, в солонцеватых степях, березовых и смешанных лесах.

Вид используется как лекарственное растение. Используются корневища, надземная часть, цветки. В растении содержатся эфирное масло, сесквитерпеноиды, сапонины, алкалоиды, ароматические соединения, дубильные вещества, кумарины, флавоноиды (Растительные ресурсы..., 1993), ди- и тритерпеноиды, стероиды, фенилпропаноиды, фенолкарбоновые кислоты (Растительные ресурсы..., 2013). В народной медицине – как тонизирующее, общеукрепляющее, стимулирующее пищеварение и обмен веществ, антигельминтное, противокашлевое, ранозаживляющее, вяжущее, гемостатическое, детоксикационное, отхаркивающее, потогонное, диуретическое; при заболеваниях печени и желудка, злокачественных опухолях, ревматизме, радикулите, при кожных болезнях, перитоните, пневмонии, атеросклерозе, нефрите (Растительные ресурсы..., 1993). Проявляет антибактериальную, антифунгальную, антипротозойную, цитотоксическую активность (Растительные ресурсы..., 2013). Обладает антиоксидантными, иммуномодулирующими, гепатопротективными, противодиабетическими, противовоспалительными свойствами (Растительные ресурсы России, 2013). Основываясь на довольно

высоком разнообразии, может использоваться в работах по гибридизации с таким ресурсным видом, как *Inula helenium* L.

1.2. Культура *in vitro* для сохранения биоразнообразия и генофонда растений

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).

Основополагающие работы Ф. Уайта и Р. Готре по культивированию клеток и тканей растений показали, что изолированные органы и ткани растут неограниченно долго, если их периодически пассировать на свежие питательные среды (Уайт, 1949). В исследования Уайта и Готре были разработаны составы питательных сред для поддержания жизнеспособности тканей, определено влияние витаминов и регуляторов роста. Позже проводились работы по влиянию натуральных экстрактов на пролиферацию и органогенез в культурах клеток и тканей растений (Бутенко, 1987). Уже в этих работах было показано, что каллусная ткань является основным типом культивируемой растительной ткани, что она представляет собой один из типов клеточной дифференцировки,

присущей высшему растению. Для получения культивируемых каллусных клеток экспланты растений помещали на искусственную питательную среду. Этот этап требует исключительной степени стерильности для чего используют различные стерилизующие растворы, которые затем отмываются стерильной водой. Автоклавированием или фильтрованием стерилизуют и питательные среды. Успех роста культуры тканей зависит от состава среды, гормонов, условий культивирования, таких как температура, рН, свет и влажность (Stewart, 2008).

Существует множество прописей питательных сред, но самые распространенные – это питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга (MS) и питательная среда Гамборга (B5). Исключительное значение для дедифференцировки клеток имеет правильный подбор регуляторов роста. Среди множества существующих натуральных и синтетических регуляторов можно выделить α -нафтилуксусную кислоту (НУК), представляющую группу ауксинов и 6-бензиладенин (БА), представляющий цитокинины, как самые используемые в биотехнологии. Удачное соотношение цитокининов и ауксинов в питательной среде позволяет быстро вызвать каллусогенез или прямую регенерацию. Естественно, для каждого вида растений, а иногда даже сорта, требуется своя питательная среда и соотношение регуляторов роста. Выделяют 3 типа питательной среды с высоким, средним и низким содержанием солей и различным соотношением бензиладенин (БА) и нафтилуксусная кислота (НУК), например, 0; 0,5; 2,5; 5; 10 мкМ (Bhojwani, 1996).

Дифференцировка клеток в культуре *in vitro* происходит различными путями. Различают несколько основных типов дифференцировки – дифференцировка отдельных клеток, гистологическая дифференцировка, органогенез и соматический эмбриогенез (рисунок 1).

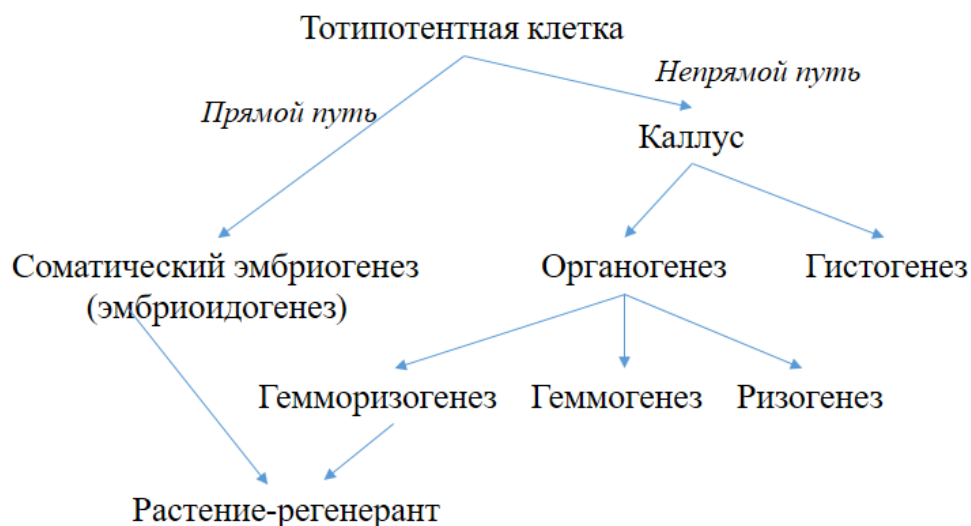


Рисунок 1 – Типы морфогенеза в культуре растений *in vitro* (Батыгина, 1999).

Дифференцировка клеток, как и дедифференцировка зависит, от множества факторов, ключевыми из которых являются вид и генотип растения, тип экспланта, гормональные факторы и стимуляторы, условия культивирования и физические факторы. Если при дифференцировке отдельных клеток в каллусной культуре появляются отдельные клетки, имеющие специфическое морфологическое строение и функции, то в случае с гистогенезом происходит образование волокон, трихом и элементов проводящей системы. В случае органогенеза формируются зачаточные структуры целых органов, в основном побегов и корней. В большинстве случаев данные процессы взаимосвязаны (Бутенко, 1999).

В зарубежной литературе несколько отличная классификация морфогенеза в культуре *in vitro*, где в качестве ключевых этапов выделяют прямой и непрямым органогенез, прямой и непрямым соматический эмбриогенез (рисунок 2).

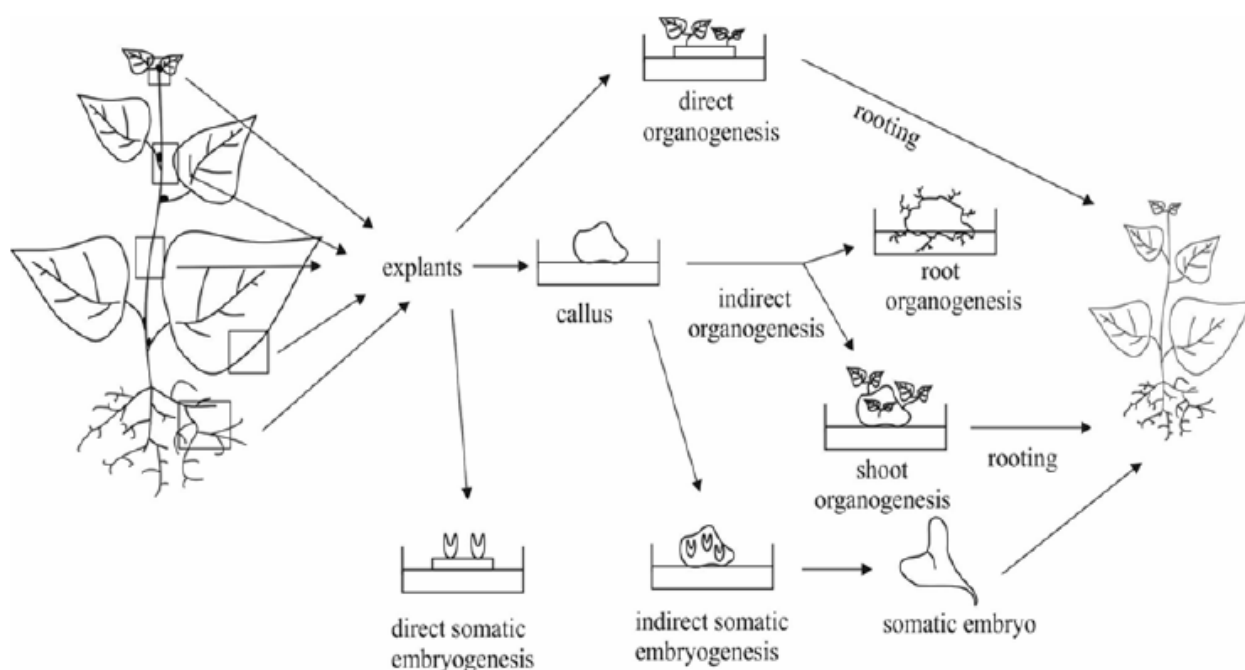


Рисунок 2 – Схема морфогенеза клеток и тканей растений в культуре *in vitro* (Adamczuk et al., 2012).

Ключевым событием в развитии исследований органогенеза *de novo* было выявление преобладающей роли ауксина и цитокинина в качестве химических детерминант (Skoog, Miller, 1957). В последующем было проведено множество работ по исследованию органогенеза, однако молекулярные механизмы, лежащие в основе органогенеза *in vitro*, слабо изучены. Органогенез *in vitro* зависит от применения экзогенных регуляторов роста, в частности ауксина и цитокинина, а также от способности ткани реагировать на изменчивость регуляторов роста во время культивирования. На первом этапе клетки эксплантов приобретают «компетенцию», которая определяется, как способность реагировать на те или иные гормональные сигналы. Процесс приобретения органогенной компетентности в дальнейшем именуется «дедифференцировкой». Компетентные клетки в культивируемых эксплантах под влиянием определенного состава регуляторов роста формируют ткани специфичные для того или иного органа. Затем морфогенез протекает независимо от экзогенно введенных регуляторов роста. Клетки, которые приобрели компетентность для органогенеза корней, подвергаются организованному делению с образованием зачатков адвентивных

корней в соответствующих культуре условиях. Клетки, компетентные к формированию побегов во процессе дедифференцировки, могут быть индуцированы к образованию адвентивных побегов с помощью цитокининов (Sugiyama, 1999). Кандидатом на роль ключевого регулятора в процессе органогенеза побегов является белок KNOTTED1 (KN1) и связанные с KN1 белки. *Kn1* отвечает за фенотип с высоким количеством междоузлий и кодирует белок гомеодомена (Vollbrecht et al., 1991). Транскрипт *Kn1* широко представлен в апикальной меристеме побегов, но не в примордиях листьев. Тесная корреляция между экспрессией *Kn1* и меристемой побега наблюдалась при пролиферации меристемы аксиллярного побега и формировании адвентивной меристемы в кукурузе и ячмене (Jackson et al., 1994; Zhang et al., 1998). Выявлено, что экспрессия *Kn1* или *Kn1*-гомологов приводит к образованию адвентивных побегов из нормально детерминированных органов (Sinha et al., 1993; Lincoln et al., 1994). Гомологи *Kn1* были обнаружены также в дифференцирующих тканях *Panicum virgatum* L., *Populus alba* L., *Phalaenopsis amabilis* var. *aphrodite* (Du et al., 2009; Wuddineh et al., 2016; Fang et al., 2016). Недавние исследования показали, что интеркалярные меристемы накапливают белок KN1, тогда как кофакторы VLH12/14 данного белка предотвращают преждевременную дифференциацию (Tsuda et al., 2017). Избыточная экспрессия *Kn1* значительно снижает накопление лигнина в кукурузе и табаке (Townsend et al., 2013). Этот ген как показано, непосредственно регулирует GA₂-оксидазу для поддержания низкого уровня гибберелина в апикальных меристемах (Hay et al., 2002; Bolduc, Nake, 2009).

Соматический эмбриогенез – особый тип дифференцировки клеток растений *in vitro*. Он заключается в образовании эмбриоидов, зачатков интактного растения, способных формировать взрослое растение. Уникальность растений состоит в их способности продуцировать соматические эмбрионы (Jayasankar et al., 2001). Все соматические клетки внутри растения содержат весь набор информации, необходимой для создания полноценного и функционального растения (Wang, 1997). Соматический эмбриогенез является еще одной альтернативой традиционным методам вегетативного размножения, поскольку он

допускает быструю крупномасштабную систему распространения (Fuentes et al., 2000). Кроме того, регенеранты, полученные путем соматического эмбриогенеза, наиболее схожи с растением донором эксплантов (Martin, 2003).

Von Arnold et al. (2002) определили соматический эмбриогенез как процесс, в котором биполярная структура, напоминающая зиготический эмбрион, развивается из незиготной клетки без сосудистой связи с исходной тканью. Этот тип соматического эмбриогенеза называют первичным. Вторичный соматический эмбриогенез представляет собой явление, при котором новые соматические эмбрионы инициируются соматическими эмбрионами (Vasic et al., 2001). Хотя аналогичные, структурно и физиологически, соматические эмбрионы характеризуются отсутствием защитных семенных оболочек, питательных вспомогательных тканей и покоящейся фазы, как у зиготических эмбрионов.

Соматический эмбриогенез представляет собой многоступенчатый процесс регенерации, начинающийся с образования проэмбриогенных масс, с последующим образованием, созреванием, высушиванием и регенерацией соматических зародышей (Hussein et al., 2006). Соматические эмбрионы могут быть получены посредством прямого или косвенного соматического эмбриогенеза. В прямом эмбриогенезе эмбрионы происходят непосредственно из тканей в отсутствие заметной пролиферации каллуса (Aly et al., 2002), тогда как непрямой эмбриогенез включает пролиферацию каллуса, а эмбриогенные ткани предшествуют развитию эмбриона (Fuentes et al., 2000). Индукция соматических эмбрионов непосредственно из растительной ткани является наиболее желательным подходом для избегания соматических изменений (Aoshima, 2005). Кроме того, это сокращает время, необходимое для регенерации растений, что может быть полезно для минимизации индуцированных культурой генетических изменений.

Культуру клеток и тканей растений *in vitro* используют во всем мире для микроразмножения, сохранения биоразнообразия, исследования изменения генома изолированных клеток, генной инженерии уже многие десятки лет. Благодаря явлению тотипотентности растений, возможно вызвать

дифференцировку клеток под воздействием регуляторов роста и индуцировать регенерацию. Возможность получения тысяч особей растений из небольшого фрагмента ткани является привлекательным феноменом, который теоретически можно было бы использовать для сохранения редких, исчезающих и эндемичных видов растений. Но открытие явления соматической изменчивости ставит под сомнение основную идею сохранения растений *in vitro* – это сохранение их генетического разнообразия в исходном виде (Larkin, Scowcroft, 1981). Протекание генетических процессов в культуре *in vitro* зачастую не поддается какой-либо закономерности.

В сохранении генофонда растений с использованием культур *in vitro* более всего нуждаются редкие и исчезающие виды, эндемики и растения, имеющие большое хозяйственное значение, полученные методами генной инженерии сорта. В настоящее время число видов, находящихся под угрозой исчезновения, постоянно увеличивается из-за климатических изменений и активной хозяйственной деятельности человека. На основе методов культуры *in vitro* разрабатываются технологии сохранения биоразнообразия различных растительных объектов в сохраняемых коллекциях клеток, тканей, изолированных органов и микроклонально размножаемых растений. Коллекции поддерживаются путем субкультивирования в пересадочной культуре. Подобные подходы трудозатратны и требуют тщательного поддержания условий культивирования во избежание изменчивости. Эпигенетическая изменчивость зачастую не приводит изменению фенотипических признаков, тогда как генетические полиморфизмы могут повлиять на фенотип даже через несколько поколений при половом размножении. Подобная изменчивость зачастую видоспецифична, так в Отделе биологии клеток и биотехнологии ИФР РАН более 50 лет поддерживалась культура *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz без потери стабильности (Бутенко, 1987). Для многих видов генетическая стабильность подтверждена молекулярно-генетическими методами, так, для *Hedysarum theinum* Krasnob. показана стабильность регенерантов на протяжении пяти пассажей и их идентичность материнскому растению (Эрст и др., 2015). Однако подобные

примеры являются скорее исключением, и мутагенез *in vitro* проявляется на различных уровнях организации генома (Hofmann et al., 2004; Machczyńska et al., 2015). Различные способы и стадии культивирования также могут оказывать разное воздействие на полиморфизм ДНК. Например, для *Fragaria vesca* L. в результате криосохранения тканей апекса показано, что у посткриогенных регенерантов появление морфологически измененных форм растений не было отмечено, тогда как вариабельность ДНК-маркеров снижалась в два раза, независимо от продолжительности дегидратации (Соловьева и др., 2016). В то же время, по данным Бутенко (1999), различные виды растений в коллекции проходят своеобразную эволюцию по типу конвергенции и дивергенции. Существует множество подходов к уменьшению скорости подобной «эволюции» *in vitro* – низкие температуры, гипоксия, использование осмотиков и веществ, тормозящих рост и развитие растений.

Микроразмножение, основанное на прямой регенерации, – наиболее распространенный метод для сохранения лекарственных или редких и эндемичных видов растений (Sarasan et al., 2006). Данная техника позволяет получать из одного растения-донора тысячи регенерантов. В связи с коротким периодом времени пребывания органов растений на питательной среде с регуляторами роста, снижается риск мутирующего влияния ауксинов на генетический материал растений (Ładyżyński et al., 2002). Культура протопластов основана на выращивании в жидкой питательной среде изолированных растительных клеток в присутствии регуляторов роста и ингибиторов образования клеточной стенки (Daveya et al., 2005). Отдельные клеточные линии возможно сохранить в жидком азоте, что в будущем позволяет провести регенерацию по пути соматического эмбриогенеза (Engelmann, 2011). Соматический эмбриогенез – более длительный процесс, связанный с формированием развитого зародыша из отдельной клетки или группы клеток. Часто данный процесс связан с каллусогенезом. Дедифференцировка клеток вызывается изменением соотношения регуляторов роста в сторону ауксинов. Данная культура, как и культура протопластов, наиболее подвержена

соматональной изменчивости. В большинстве случаев изменения в геноме не затрагивают работу генов, отвечающих за формирование фенотипа растения, что связано с их высоким присутствием в геноме. Так как значительная часть генома представлена мобильными генетическими элементами, вариации проявляются только в размере генома, не затрагивая кодирующие последовательности генов (Kumar, Bennetzen, 1999). Однако повышение генетической неоднородности клеток может привести к формированию новых признаков, особенно при длительном культивировании клеток в каллусной культуре. Кроме изменений на уровне генома, возможны различные мутации кариотипа такие, как делеции хромосом или полиплоидия.

Среди вариантов сохранения видов в культуре *in vitro*, является техника поддержания медленного роста клеточных линий при низких температурах. Так культура краснокнижного вида *Gladiolus imbricatus* L., хранился до одного года на среде Мурашиге и Скуга, после чего 25% линий успешно регенирировала (Rakosy-Tican et al., 2012).

Особое значение имеют коллекции лекарственных растений, находящихся под угрозой исчезновения. Такие виды растений, как *Gymnema sylvestre* R. Br., *Leptadenia reticulata* (Retz.) Wight et Arn., *Saussurea involucre* DC., *Zeyheria montana* Mart., *Swertia chirayita* Buch-Ham. и многие другие успешно поддерживаются на питательных средах в присутствии регуляторов роста, тем самым снижая давление человека на природные источники лекарственного сырья (Ramakrishnan et al., 2017). Среди самых крупных коллекций сохраняемых видов растений *in vitro* являются: «Phytera» (Sheffields, UK), содержащая более 1000 каллусных линий лекарственных видов растений и коллекция «Sylvagen» (Vancouver, Canada), хранящая несколько тысяч клеточных линий хвойных видов растений (Cyr, 2000; Spencer, 1999), а также коллекция плодово-ягодных растений «Коллекция генетических ресурсов растений ВИР» (Дунаева, Гавриленко, 2007). Кроме клеточных линий, одним из самых популярных и успешных методов сохранения по всему миру, является прямой органогенез из апикальных меристем проростков или почек и массовая продукция регенерантов. Такие виды как,

Quercus euboica Papaioann, *Leontopodium nivale* (Ten.) Huet ex Hand.-Mazz., *Rauwolfia serpentine* (L.) Benth. ex Kurz., *Nilgirianthus ciliatus* (Nees). Bremek., *Leucocroton havanensis* Borhidi были размножены именно с использованием данного подхода (Kartsonas, Papafotiou 2007; Pace et al. 2009; Senapati et al. 2014; Rameshkumar et al., 2016; Alfonso et al., 2017). Совмещая прямой органогенез и хранение регенерирующих культур при низких температурах возможно сохранять виды растений длительное время. Подобный метод был применен для регенерантов *Ramonda serbica* Pancic and *Ramonda nathaliae* Pancic et Petrovic, хранение которых поддерживалось более 12 месяцев (Gashi et al., 2015).

В биотехнологической практике известно множество способов селекции растений, связанных с сохранением мутаций в кариотипе и генотипе. Такие распространенные мутации, как полиплоидия широко используются для увеличения экспрессии интересующих генов. Путем отбора и сохранения соматоклональных вариантов, становится возможным получать новые морфологические формы растений и выделять новые ценные признаки (Li et al., 2010; Sun et al, 2013). Данные методы довольно просто реализуемы путем изменения состава регуляторов роста в питательных средах или воздействием на каллусные культуры разного рода физическими или химическими мутирующими агентами (Ehsanpour, 2007). В основном, для индукции раннего проявления соматоклональной изменчивости, используют УФ-излучение и излучение радиоактивных элементов. Изменения в соматических клетках каллуса в большинстве случаев делят на 3 группы: геномные мутации и полиплоидия, хромосомные и плазмонные мутации (Iuliana, Cerasela, 2014; Muthusamy, Jayabalan, 2014). Получаемые тетра-, гекса- и октоплоиды активно используются в растениеводстве, но полиплоидия лишь подтверждает риск применения метода для сохранения редких растений в культуре *in vitro*.

1.3. Изменчивость растений в культуре *in vitro*

Индуктируемая культивированием тканей *in vitro* и проявляющаяся у растений-регенерантов изменчивость получила название «сомаклональной изменчивости», а измененные растения были названы соматклонами. Термин соматклональная изменчивость впервые появился в 1981 г. (Larkin, Scowcroft, 1981), хотя об этом явлении неоднократно сообщалось и ранее. Так изменчивость регенерантов была отмечена еще в 1971 г. в лаборатории ИФР РАН (Бутенко, 1999). Соматклональная изменчивость по морфологическим, биохимическим и геномным признакам обнаружена у большинства исследованных видов растений, одновременно является как преимуществом, так и недостатком растительных организмов. В культурах *in vitro* возможно получать продукты вторичного метаболизма, синтезировать новые соединения, благодаря исходной генетической неоднородности и высокой генетической изменчивости клеточных популяций.

Установлено, что клетки *in vitro* содержат не только различный кариотип, от гаплоидного до окта- и декаплоидного с различными хромосомными перестройками, но и генотип который в зависимости от длительности культивирования, приобретает значительные мутации (Reed, 2011). В некоторых исследованиях процент полиморфных локусов, в результате культивирования *in vitro* достигает до 40 % уже после 3-4 пассажей и зависит от характера используемых фитогормонов (Khan, 2008). Отмечены изменения генотипа при изменении состава питательной среды и условий выращивания, в частности, при переходе от поверхностного выращивания каллусной ткани к глубинному (Spiridonova, 2007). Исследования динамики изменений генома культур клеток и тканей, а также поиск способов снижения данных изменений необходимы как для лекарственных растений, культивируемых на данный момент, так и для заново вводимых в культуру *in vitro*. Ставится под сомнение сохранение редких и исчезающих растений с помощью методов биотехнологии, широко используемых при реализации программ по сохранению биоразнообразия и генетических ресурсов, так как отсутствует универсальный подход по культивации *in vitro* из-за

возможных генетических перестроек, кардинально меняющих структуру генома и отражающихся на анатомо-морфологических признаках. Между тем, методы биотехнологии растений широко используются как в промышленности, так и в лабораториях по всему миру без анализа генетических изменений.

Соматональные варианты могут быть обнаружены с использованием различных методов, которые можно разделить на морфологические, физиологические, биохимические и молекулярные методы (Kaeppler et al., 2000). Морфологические признаки уже давно используются для идентификации видов, родов и семейств растений. Варианты могут быть легко обнаружены на основе таких признаков, как разница в ростовых характеристиках растения, морфологии листа и аномалий в пигментации (Israeli et al., 1991; Rodrigues et al., 1998; Zaid, Al Kaabi, 2003). Однако морфологические признаки часто сильно зависят от факторов окружающей среды и могут не отражать генетические особенности растения (Mandal et al., 2001).

Изменения фенотипа соматональных форм может выражаться изменениями в габитусе, листовых пластинок и их размерах. В работе Li et al. (2010), соматональные варианты *Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze отличались уменьшенным вдвое габитусом и укороченными побегами. Однако, чаще всего фенотипические изменения наблюдаются в органах, выполняющих генеративные функции. Так для *Torenia fournieri* Lind. выявлены морфологические изменения в структуре пыльцы, что повлияло на ее жизнеспособность. В зависимости от длительности культивирования *in vitro* на питательных средах в присутствии регуляторов роста наблюдалось снижение жизнеспособности пыльцевых зерен (Sun et al., 2013). Клонально размноженные представители рода *Chrysanthemum* L. отличаются вариациями в цвете и пигментации соцветий (Miler, Zalewska, 2014). Изменчивость в форме соцветий, симметрии и пигментации, также характерна для регенерантов рода *Coreopsis* L. (Trader et al., 2006). Использование физиологических ответов или биохимических тестов для обнаружения соматональной изменчивости, как и ПЦР-анализ может быть проведен на начальных стадиях культивирования (Israeli et al., 1995).

Реакция растений на физиологические факторы такие, как гормоны и свет, может быть использована в качестве основы для дифференциации нормальных и соматоклональных вариантов (Peyvandi et al., 2009). Например, нарушения метаболизма и уровня гиббереллиновой кислоты были предложены как один из возможных индикаторов соматоклональной изменчивости высших растений (Phinney, 1985; Sandoval et al., 1995). Основываясь на ответах на экзогенную гибберелловую кислоту, карликовые формы многих видов растений были классифицированы как реагирующие или не реагирующие на гибберелловую кислоту (Graebe, 2003). Многие авторы использовали различные биохимические тесты для различия соматоклонов. Данные подходы были использованы для количественной оценки некоторых соматоклональных вариантов (Daub, Jenns, 1989; Kole, Chawla, 1993; Thomas et al., 2006). Уровень усвоения двуокси углерода, синтез пигментов, хлорофилла, каротиноидов, антоцианов также используется в качестве основы для обнаружения соматоклональных вариантов (Alia, 1995). К сожалению, подобные типы анализов так же, как и морфологические признаки, могут сильно коррелировать с условиями культивирования как в культуре *in vitro*, так и в условиях интродукции.

До недавнего времени изозимы были одним из наиболее широко используемых молекулярных маркеров для изучения генетической изменчивости у большинства организмов (Weising et al., 2005). Исторически изозимы такие, как пероксидаза, малатдегидрогеназа и супероксиддисмутаза, широко использовались для изучения соматоклональных вариантов культивируемых растений (Bonner et al., 1974; Rivera 1983; Srivastava et al., 2005; Gonzalez et al., 2010). Хотя анализ образцов изоферментов конкретных ферментов является удобным для обнаружения генетических изменений, однако он не всегда отражает изменчивость генома, так как может подвергаться факторам окружающей среды.

Более эффективными методами детекции соматоклональной изменчивости являются методы молекулярно-генетические. Молекулярные маркеры представляют собой ценный инструмент для обнаружения вариации последовательностей близкородственных геномов, например, между исходными

растениями и соматклонами, регенерированными через культуру тканей. Использование RAPD (Williams et al., 1990), AFLP (Vos et al., 1995), RAF (Waldron et al., 2002), SSR (Gupta et al., 1994), ISSR (Godwin et al., 1997) позволяет относительно быстро анализировать изменения генетических полиморфизмов исследуемых растительных объектов. Эти методы используются для оценки соматклональных изменений в тканевой культуре (Bairu et al. 2011; Rewers et al. 2012; Singh et al. 2013; Nybom et al. 2014). С использованием RAPD и ISSR маркеров показано, что регенеранты *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb, размноженные с использованием техник прямого морфогенеза, не отличались от материнского растения (Martins et al., 2004). Для редкого вида *Viola uliginosa* Besser с использованием AFLP маркеров обнаружен низкий полиморфизм регенерантов (Slazak et al., 2015).

Крупные цитогенетические перестройки кариотипа клонируемых клеток часто происходят на длительных сроках культивирования. К таким изменениям можно отнести утраты частей или целых хромосом, полиплоидия и эндополиплоидия. Зачастую подобные вариации выявляются исследованием состава и картирования хромосом, а также методами проточной цитометрии. Кариологический анализ и наблюдение хромосомных aberrаций с использованием световой микроскопии были успешно использованы для обнаружения соматклональных изменений в регенерантах *in vitro* (Raimondi et al., 2001; Mujib et al., 2007). На примере *Trifolium alexandrinum* L. было показано формирование полиплоидных регенерантов с плоидностью в результате частичного или полного эндомитоза в каллусной культуре (Masoud, Hamta, 2008). Кроме кратного увеличения хромосомного состава, особенно при длительном культивировании, наблюдаются утраты нескольких хромосом. Например, соматклональные варианты *Gossypium hirsutum* L. отличались хромосомными утратами 4-5 хромосом (Jin et al., 2008).

Изменение плоидности, хромосомных чисел и структуры хромосом является непосредственным доказательством высокой вероятности изменения генетического состава организма (Kunitake et al., 1995; Al-Zahim et al., 1999).

Хромосомы, а также другие ядерные компоненты такие, как вариации содержания РНК и ДНК, являются важными методами обнаружения соматональных вариаций, которые широко использовались во многих работах (Bogdanova, 2003; Nakano et al., 2006; Fiuk et al., 2010). Исследование кариотипов микроскопически - трудоемкий процесс, особенно когда хромосомы трудно наблюдаемы (Doležel, 1997). Новые возможности для исследования изменений кариотипов у соматональных вариантов появились с развитием методов проточной цитофотометрии (Doležel et al., 2004). Этот метод используется для оценки стабильности кариотипа, быстрого определения плоидности большого числа образцов многих видов растений (Nehra et al., 1992; Gimenez et al., 2001; Loureiro et al., 2005; Loureiro et al., 2007; Sharma et al., 2007; Скапцов и др., 2016). На примере *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Robinson было показано, что анализ размера генома не выявил значительных отклонений в размере генома регенерантов (Viehmanna et al., 2014). Регенеранты *Coriandrum sativum* L., полученные в результате соматического эмбриогенеза, также имели размером генома схожий с образцами растений доноров (Ali et al., 2017). Несмотря на присутствие в составе питательных сред ауксинов, для *Lepidosperma concavum* R.Br. и *L. laterale* R.Br. было выявлено только 0,2 % регенерантов с эндополиплоидией, а вариации размера генома находились в пределах значений, характерных для природных популяций (Kodum et al., 2012).

В природе вместе с генеративной полиплоидией встречается и эндополиплоидия, широко распространенная у цветковых растений. Часто явления эндополиплоидии встречаются в культуре *in vitro* или опосредованы ее условиями. Явление заключается в различном уровне плоидности тканей (Barow, Meister, 2003). Эндополиплоидия является следствием эндоредупликации, при которой повторяющиеся циклы синтеза ДНК существуют в отсутствие деления клеток (Nagl, 1976). Степень эндополиплоидизации варьирует в пределах органов. Специализированные органы или другие части растения могут иметь разные уровни эндополиплоидии (Kosová, Mártonfi, 2011). Эндополиплоидизация высока в семядолях, листьях и нижних листьях, но ниже в органах цветка, корнях и

верхних листьях (Barow, 2006). Основной характеристикой эндополиплоидии является появление трех пиков на гистограммах (2C, 4C, 8C), когда обычно гистограмма содержит один или два пика (2C, 4C). Второй пик обычно содержит клетки в G₂ стадии митоза (Bainard et al., 2011; Скапцов, Куцев, 2014; Skaptsov et al., 2017). Уровень эндополиплоидии может зависеть от внешних или внутренних факторов таких, как свет, температура и содержание питательных веществ (Gendreau et al., 1998; Jovtchev et al., 2007; Lee et al., 2007). Также было высказано предположение, что эндополиплоидия является путем эволюции генома, позволяющим приобрести альтернативный способ адаптации (Cookson et al., 2006; Gegas et al., 2014). Являясь элементом ответа растений на стресс, эндополиплоидия – частое явление в культуре *in vitro* (Sliwinska, Lukaszewska, 2005). Эндополиплоидия, возможно, является одним из способов акклиматизации растений к изменениям среды в отличие от аллополиплоидии и автополиплоидии, образуя новые аллели генов. Эндополиплоидия приводит к увеличению размера генома, тем самым увеличивая количество копий генов и экспрессии генов, также изменяется их комбинация (Scholes et al., 2013; Scholes, Paige 2015).

Одним из самых современных методов анализа соматоклональных вариантов является секвенирование ДНК и NGS-секвенирование (секвенирование следующего поколения). В результате за один запуск секвенирования может быть получен большой массив данных, содержащий информацию об активности мобильных генетических элементов, эпигенетических изменениях, случайных мутациях и однонуклеотидных заменах, вставках и делециях. Активность транспозонов, уровень метилирования, модификации гистонов, микро РНК могут стать причиной наследственных генетических вариаций в ответ на воздействия окружающей среды. Мобильные генетические элементы являются важным механизмом изменчивости и регуляции генов, а также имеют отношение к адаптивной дивергенции к новым условиям (Stapley et al., 2015). Секвенирование следующего поколения является мощным инструментом в анализе мутационного процесса. Так, в работе Ossowski et al. (2010) благодаря NGS-секвенированию было выявлено, что скорость спонтанных мутаций генома *Arabidopsis Heynh.*

оценивается в 7×10^{-9} замещений оснований на сайт за одно поколение. Тогда как Jiang et al. (2011) использовали NGS для оценки вариации последовательности генома пяти регенерирующих линий *Arabidopsis*. В первом поколении были идентифицированы SNP и небольшие делеции (< 2 п.н.). Частота мутаций составляла $(10,5 \pm 1,0) \times 10^{-7}$ замещений оснований на сайт за поколение, примерно в 60-350 раз выше, чем скорость спонтанных мутаций.

Известно, что явление соматклональной изменчивости является, в некоторой степени, следствием применения регуляторов роста цитокининового и ауксинового ряда, значительного накопления в тканях *in vitro* полифенолов и неупорядоченного роста, а также проявляется в культурах, к которым применяется частое субкультивирование, вследствие подверженности каллусных тканей реакциям стресса (Benzion, 1988; Todd et al., 1993; Kaeppler et al., 2000; Hossain et al., 2004). Вместе с тем, учитывая обширные литературные данные, демонстрирующие на цитологическом уровне значительную изменчивость генома клеток растений в культуре *in vitro*, остался открытым вопрос о возможности преодоления или снижения частоты соматклональной изменчивости.

Во многих исследованиях авторы последнюю роль уделяют изучению стресса и ответа растений на стресс. Роль стресса была выявлена в индукции соматического эмбриогенеза. Добавление экзогенного регулятора роста 2,4-Д является одним из ключевых этапов индукции, в частности, в приобретении эмбриогенной компетентности во многих растительных клетках, культивируемых *in vitro*. Считается, что 2,4-Д, а также абсцизовая кислота действуют как стрессовое вещество, что приводит к приобретению эмбриогенной компетентности (Kikuchi et al., 2006). Важная роль передачи сигналов абсцизовой кислоты была подтверждена на мутантных гиперчувствительных и нечувствительных мутантах *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Gaj et al., 2006). Результаты других исследований также подтверждают значение стресса при индукции эмбриогенеза. К ним относятся осмотический шок с сахарозой или хлоридом натрия (Wetherell, 1984; Kiyosue et al., 1989), применение ионов тяжелых металлов или высокой температуры (Kiyosue et al., 1990; Kamada et al.

1994). Другие виды стресса, например, недостаток ауксина, также может эффективно индуцировать эмбриогенез (Feher et al., 2003; Quiroz-Figueroa et al., 2006). Интересно, что некоторые гены, вовлеченные в эмбриогенез такие, как *OsSERK1*, активируются и при грибковых поражениях и индуцируются защитными сигнальными молекулами такими, как салициловая кислота, жасмоновая кислота и абсцизовая кислота (Hu et al., 2005). Было также обнаружено, что стресс играет важную роль в андрогенезе. Различные типы стресса, включая тепловой шок, осмотический стресс и недостаток питательных веществ, способны инициировать переход микроспорового развития от гаметофитного к спорофитному пути. Было показано, что другие типы стресса такие, как азотное голодание, ауксин, химические вещества, гамма-облучение или холодовая обработка, провоцируют андрогенез с более низкими показателями (Maraschin et al., 2005; Hosp et al., 2007; Vazquez, Linacero, 2010).

Соматональная изменчивость при микроразмножении генотипов многих растений остается серьезной проблемой, особенно при задачах, связанных с сохранением видов находящихся под угрозой исчезновения. В связи с этим, раннее выявление соматональных вариантов является необходимым мероприятием по контролю генотипов в сохраняемых коллекциях. Соматональная вариация, вызванная условиями культивирования, ограничивает использование *in vitro* микроразмножения, так как это приводит к изменениям в ядерном и цитоплазматическом геномах и вызывает генетическую дифференциацию регенерированных растений (Lee, Phillips, 1988; D'Amato, 1991; Vazquez, 2001; Rodriguez-Enriquez et al., 2011; Neelakandan, Wang, 2012; Wang, Wang, 2012). Перед реинтродукцией размноженных растений требуется подтверждение генетической идентичности с исходным материалом размера генома и отсутствия репродуктивных аномалий регенерированных растений (Thiem, Sliwinska, 2003; Ochatt et al., 2011; Singh et al., 2013; Thiem et al., 2013; Nybom et al., 2014).

1.4. Генетическая трансформация и изменчивость трансгенных конструкций в культуре растений *in vitro*

Для трансформации растений требуется конструирование вектора, составленного из целевого гена и контролирующих элементов, промоторов, посттранскрипционных сигналов, терминаторов, сайтов репликации и маркерных участков, которые позволяют клонировать его в бактериальной системе и обеспечивают стабильное включение, транскрипцию и экспрессию в растении. В качестве векторов для генетической трансформации наиболее часто используются Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*. Данные методы, основанные на использовании агробактерий, более удобны и эффективны, чем описанные до сих пор (Goodman, Hauptli, 1987). Трансформация, опосредованная *Agrobacterium tumefaciens* основана на ее природных способностях трансформировать клетки растений с помощью Ti-плазмиды, хорошо описана и использована для конструирования эффективных векторов для введения чужеродных генов в геном высших растений (Chilton, 1983). Чаще всего используют метод сокультивации участков растительной ткани с последующей селекцией трансформированных участков (рисунок 3). Несмотря на успех этого метода с такими видами растений, как *Petunia × atkinsiana* (Sweet) D. Don ex W. H. Baxter (Fraley, 1983), *Nicotiana tabacum* L. (Herrera-Estrella, 1983), *N. plumbaginifolia* Viv. (Horsch, 1984) и *Hyoscyamus muticus* L. (Hanold, 1983), необходимость к изоляции и регенерации протопласта ограничивает использование многих видов растений.

A. tumefaciens была впервые выделена из виноградных галлов в 1897 году и позже изолирована из маргаритки в 1907 году (Cavara, 1897; Smith, Townsend, 1907). Механизм заражения включает в себя инициирование и передачу специфического фрагмента ДНК (Т-ДНК) из бактериальной опухолепродуцирующей (Ti) плазмиды. Перенос ДНК приводит к чрезмерному производству растительных гормонов ауксина и цитокинина, что приводит к опухолям.

Procedure for plant transformation

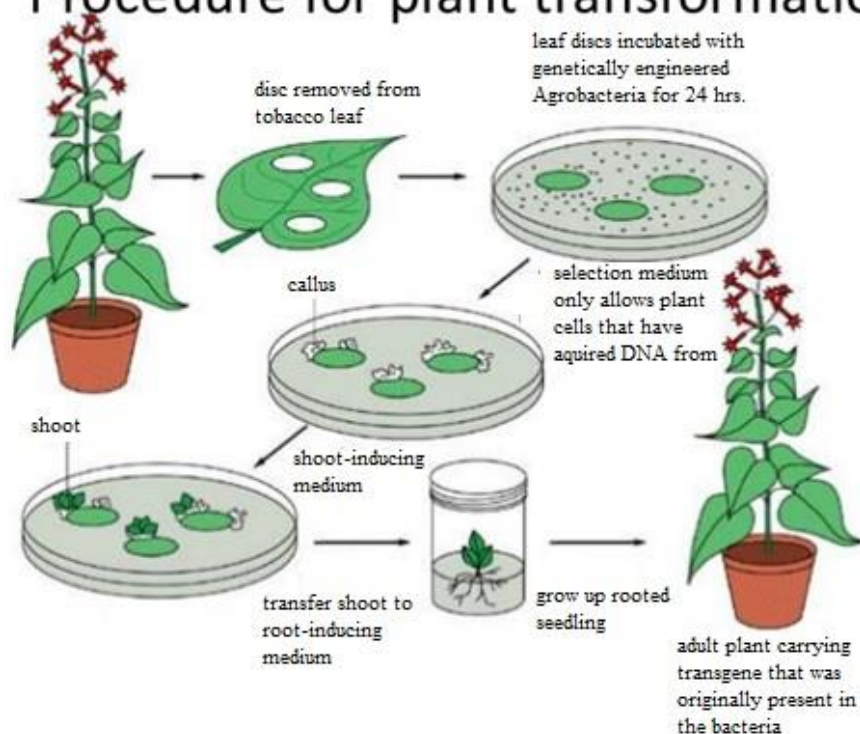


Рисунок 3– Схема агробактериальной трансформации растений (Alberts et al., 2014).

Способность транскрипционного переноса ДНК *Agrobacterium* и возможность замены онкогенов в Т-ДНК на интересующие гены сделали агробактериальную трансформацию самым популярным методом для получения трансгенных растений. *Agrobacterium* воспринимает различные сигналы растительного происхождения в ризосфере с помощью кодируемого Тi-плазмидой вирулентного гена (ген *vir*) и хромосомного гена вирулентности (гена *chv*). Агробактериальная трансформация растений представляет собой очень сложный механизм, приобретенный в процессе эволюции, включающий молекулярно-генетические пути взаимодействия бактерии и клетки растения-хозяина. Генетические компоненты, переносимые *A. tumefaciens*, которые необходимы для трансформации растений, включают Т-ДНК, которая переносится в растительную клетку, область вирулентности Тi-плазмиды *vir*, запускающие процесс распознавания и переноса, а также три хромосомных локуса вирулентности, необходимых для процесса переноса, *chvA*, *chvB* и *pscA* (Stachel et al., 1985;

Douglas et al., 1985; Thomashow et al., 1987), экспрессия которых является конститутивной по сравнению с *vir*-областью (рисунок 4).

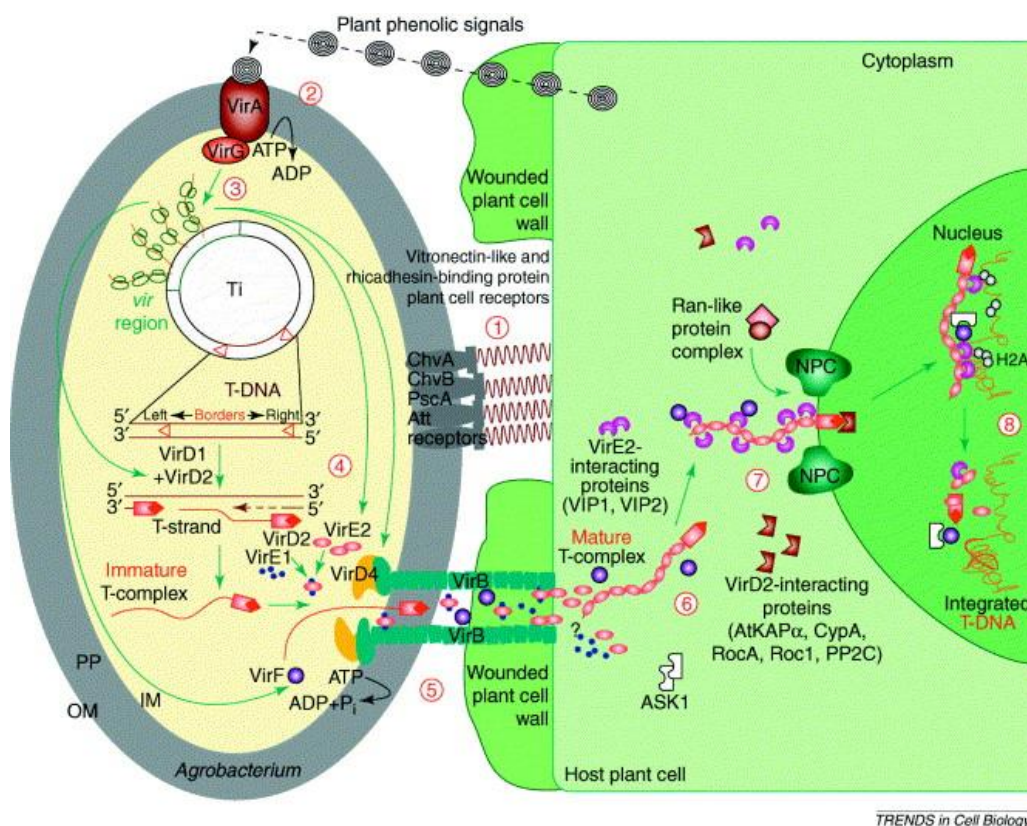


Рисунок 4 – Схема передачи и встраивания Т-ДНК из *A. tumefaciens* в клетку растения (Tzfira, Citovsky, 2002).

Область Т-ДНК фланкирована последовательностями 25 п.н. в прямо повторяемой ориентации. Интересующий ген располагается между левым и правым краями повторов Т-ДНК (Gelvin, 2003). Область *vir* включает в себя восемь оперонов, *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* и *virH* кодирующие белки, регулирующие обработку и передачу Т-ДНК. Растительные клетки выделяют низкомолекулярные соединения, которые специфично распознаются *Agrobacterium* в качестве сигнальных молекул, которые индуцируют экспрессию *vir* гена и тем самым активируют передачу Т-ДНК (Stachel et al., 1985). Т-ДНК вместе с несколькими белками *vir* экспортируется в клетку-хозяин с помощью системы секреции 4-го типа *VirB/D4* (Christie, 2004). Известно, что растительные белки вносят значительный вклад в агробактериальную трансформацию, белки *BT11*, *VIP1*, *Ku80*, *CAK2Ms*, гистоны *H2A*, *H3-11* и *H4*, *SGA1* и многие другие

участвуют в передаче Т-ДНК в цитоплазме, ядре, интеграции Т-ДНК, стабильности и ответе на заражение (Gelvin, 2010; Magori, Citovsky, 2011; Tenea, 2012). Следует отметить, что Т-ДНК успешно переносится в клетки растений даже при очень большом размере встройки. Так, в 1992 г. А. Миранда с соавторами первыми показали, что при изменении ориентации участка RB Т-ДНК в растения может переноситься полная копия Ti-плазмиды. В 1996 г. К. Гамильтон с соавторами, используя бинарную векторную систему, осуществили перенос из *Agrobacterium* в растительные клетки фрагментов хромосомной ДНК человека размером до 150 т.п.н. (Щелкунов, 2004).

Агробактериальная трансформация растений является предпочтительным методом трансформации из-за ее простоты и точности. Тем не менее, многие проблемы еще не решены такие, как подверженность трансформации видов растений; использование *Agrobacterium* для направленной на конкретный сайт рекомбинации; стабильная интеграция трансгена и последовательное наследование в последующих поколениях без потери или изменения экспрессии; введение крупных кассет экспрессии. Детальный анализ растительных белков, участвующих в облегчении доставки Т-ДНК в геном хозяина, расширение диапазона трансформируемых генотипов и эксплантов с лучшим пониманием взаимодействия хозяин-патоген, а также разработка методов минимизации некроза в трансформированных тканях улучшают трансформацию и повышают общую эффективность (Ziemienowicz, 2014).

A. rhizogenes так же несут плазмиды (Ri-плазмида); их патогенные функции у диких штаммов проявляются в виде заболевания растений, называемого «косматым корнем». Ri-плазмида похожа на Ti-плазмиду за исключением того, что плазмида *A. rhizogenes* отвечает за синтез только ауксинов и опинов. В их Т-ДНК отсутствуют участки, синтезирующие цитокинины. Можно совмещать Т-ДНК Ti-плазмид с генами *vir* Ri- или Ti-плазмидами и наоборот. Функции Т-ДНК Ri-плазмид по сравнению с Т-ДНК Ti-плазмиды менее изучены. Предполагается, что механизм передачи Т-ДНК тот же. Так же, как и для *A. tumefaciens* с помощью

векторов созданных на основе Ri-плазмид был модифицирован широкий спектр видов растений (Mugnier, 1988).

Основой знаний по агробактериальной трансформации являются работы Хорша и коллег, в которых показано, что трансгенные растения могут быть получены из листовых эксплантов после сокультивирования с агробактериями (Horsch, 1985). Большинство ныне существующих трансгенных растений было получено методом сокультивирования, которые, показали, стабильную интеграцию и экспрессию чужеродных генов. В основном трансгенные растения показали стабильность и менделеевскую сегрегацию трансгена (Fraley, 1986). Метод совместного культивирования включает инкубацию стерилизованных эксплантов или выращенных в асептических условиях растений вместе со свежей суспензией агробактерий. Концентрация бактерий и состав среды может варьировать в зависимости от штамма агробактерии и видов растений.

Экспланты перемещаются в асептические селективные среды, содержащие антибиотики такие, как цефотаксим, карбенициллин, ампициллин и другие, для селекции бактерий. Правильный подбор селективных сред и антибиотиков позволяют провести селекцию трансформированных клеток с помощью пролиферации каллуса. Агробактериальная трансформация ограничена в основном двудольными растениями, для которых характерна сильная реакция на повреждение. У однодольных отсутствуют реакции на повреждение, тем самым виды слабо восприимчивы к агробактериальной инфекции. Однако в 1993 и 1994 годах две независимые группы ученых (Chan, 1993; Hiei, 1994) сообщили о трансформации риса посредством сокультивации с агробактериями; они имитировали раневой ответ, добавив в среду для сокультивирования ацетосирингон. Существует множество модификаций данного метода для увеличения эффективности трансформации. Например, использование вакуумных камер и силиконовых ПАВ для снижения поверхностного натяжения воды и последующее погружением цветочных почек в среду для сокультивации (Викторэк-Смагур, 2009).

Способность вирусов растений вводить свой генетический материал в геном растений побудило ученых еще в 1980-х годах использовать их в качестве векторов трансформации. Однако какого-либо большого прогресса, как ожидалось, в этом не было из-за широкого разнообразия устройства и генетического аппарата (РНК, ДНК одно- и двух цепочечных), режимов инфицирования и репликации, образа жизни и свойств организма. Из всех вирусов вирус мозаики цветной капусты считается наиболее приемлемым для трансформации растений, т.к. его геном состоит из двухцепочечной ДНК. Хотя вирусные векторы могут быть весьма эффективно использованы для внедрения и переноса генов, эти гены не могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина и не наследуются. Однако использование вирусов позволяет при заражении даже одной клетки организма растения вызывать проявление генов вируса во всем растении. Вирусные векторы используются для очень быстрого воспроизводства белков в растении и разработки систем экспрессии в растительном организме.

Чаще используется метод химической трансформации протопластов. Многие химические вещества такие, как полиамины (Поли-L-орнитин и поли-L-лизин) и декстран сульфат, стимулируют поглощение ДНК протопластами растений, что, однако, сокращает жизнеспособность клеток (Draper, Scott, 1991). Из многих экспериментально проверяемых на способность стимулировать поглощение ДНК веществ наиболее эффективным оказался полиэтиленгликоль (ПЭГ), которым обрабатывается смесь ДНК и протопластов. ПЭГ используется в довольно высоких концентрациях ($> 28 \%$) и с высокой молекулярной массой (4000 – 8000, рН 8–9) (Paszkowski et al., 1989). Обработка протопластов $MgCl_2$ (5–25 мМ) значительно усиливает вставку ДНК (Negrutiu и др., 1987). Используемый для трансформации ген должен находиться в линейной форме.

Популярным физическим методом внедрения новых генов в протопласты является использование электрического поля, которое делает клеточные стенки протопластов временно проницаемыми для ДНК (Langridge et al., 1985; Shillito et al., 1985; Fromm et al., 1987). Растительные протопласты помещают в небольшую камеру с электродами на противоположных концах, наполненную ионным

раствором, содержащим векторную ДНК. Скачок напряжения, приложенного к электродам, создает временные поры (ок. 30 мкм) на плазматической мембране клеток, что позволяет ДНК диффундировать в клетки. Правильная обработка протопластов позволяет клеткам регенерировать клеточную стенку, пролиферировать до каллуса и регенерировать в целое растение. Установлено, что наличие в растворе ПЭГ (до 13 %) значительно повышает эффективность электропорации. Также способствует трансформации незначительный тепловой шок.

Прямое введение ДНК в протопласты растений с использованием тонких наконечников позволяет увеличить эффективность трансформации, при введении ДНК в ядро – до 14 %, а в цитоплазму – до 6% (Crossway et al., 1986). Наиболее эффективными (эффективность до 10–30 %) оказались микроинъекции в 12-клеточные эмбрионы пыльцы. Данный процесс требует больших расходов и высококвалифицированных специалистов и не получил широкого распространения, так же, как и метод лазерной микроинъекции. Это наиболее элегантный и эффективный из методов, но в то же время наименее используемый и ресурсозатратный.

Одним из распространенных методов трансформации является биолистическая трансформация. Для доставки ДНК в клетки растений используются микрочастицы вольфрама или золота (1-3 мкм), покрытые генетически измененной ДНК. Частицы разгоняются с помощью потока газа и на большой скорости внедряются в растительные клетки. Частицы проникают в клетки и освобождают ДНК благодаря изменению электрического заряда внутри клетки, которая экспрессируется транзистентно или случайно встраивается в геном в процессе пролиферации клеток в культуре *in vitro*. Этот метод преодолевает многие проблемы других способов трансформации такие, как специфика круга хозяев агробактерий и восстановление растений из протопластов. Данный метод стал вторым наиболее распространенным методом генетической трансформации растений (Gray, Finer, 1993).

Для создания трансгенных растений необходимы не только эффективные методы переноса генов, но и сигналы регуляции экспрессии. Для подобных исследований вместо целевых генов используют репортерные гены, позволяющие идентифицировать трансгенные клоны среди больших популяций нетрансформированных клеток. Репортерные гены кодируют соединения, катализирующие специфические реакции, продукты которых можно легко обнаружить. Продукты репортерных генов должны легко идентифицироваться, с высокой чувствительностью и с возможностью количественного анализа (Ziemienowicz, 2001). Ген хлорамфениколацетилтрансферазы (*cat*) является одним из наиболее распространенных репортерных генов, что связано с относительной стабильностью фермента, с чувствительностью и легкостью ферментативного анализа; *cat* был первым бактериальным геном, который вводился в растительные клетки (Herrera-Estrella et al., 1983).

Одним из самых распространенных репортерных генов является *uidA* (Jefferson et al., 1986), кодирующий β -глюкуронидазу (Jefferson et al., 1987). Различные варианты детекции: спектрометрические, флуориметрические и гистохимические делают данный анализ одним из самых удобных в применении. В гистохимическом анализе в качестве субстрата X-Gluc. Бесцветный водорастворимый продукт ферментативного расщепления X-Gluc подвергается окислительной димеризации с получением индиго-синего, которая усиливается с использованием окислительных катализаторов.

Люцифераза *Photinus pyralis*, кодируемая геном *luc*, катализирует окислительное карбоксилирование люциферина, 6-гидроксибензотиазола, до оксилюциферина в присутствии АТФ ионов магния и кислорода. Каталитическая реакция инициируется образованием связанного ферментом люциферин-аденилата. Последующее изменение конформации белка, декарбоксилирование и расщепление комплекса приводит к образованию CO_2 , H_2O , АМФ и возбужденной формы оксилюциферина. В присутствии избытка субстрата реакция вызывает излучение с максимумом 562 нм (Ziemienowicz, 2001). Зеленый флуоресцентный белок (*gfp*) медузы *Aequorea victoria* характеризуется

интенсивной флуоресценцией обусловленной природой хромофора, состоящего из модифицированных аминокислот Ser-Tyr-Gly внутри полипептида (Prasher et al., 1992; Cody et al., 1993). *gfp* имеет два пика возбуждения при 395 нм и 470 нм, а спектр излучения в зеленом (509 нм). Кроме того, *gfp* является необычно стабильным белком, поэтому его спектральные свойства относительно не подвержены влиянию денатурирующих факторов.

Использование экспрессии репортерных генов как фенотипического признака соматоклональных изменений или изменений в регуляции и характера экспрессии трансгенов является обычной практикой. Использование генов *rolC* (Kumar, Fladung, 2000) *gusA* (Ahuja, 1997) *gfp* и *nptII* (Nocarova et al., 2010) и многих других позволяет достаточно оперативно осуществлять отбор проб для дальнейших исследований. Ген *gusA* используется для контроля экспрессии при культивировании растений *in vitro* с последующим наблюдением за экспрессией при размножении и выращивании в грунте (Mori, 2007). В работах различных исследователей ген *gusA* используют для наблюдений и исследования соматоклональных вариаций – изменчивости трансгенных конструкций опосредованные соматоклональной изменчивостью (Ahuja, 1997). Так, вариации экспрессии *gusA* наблюдали в течение вегетационного периода в молодых листьях, когда в старых листьях экспрессия снижалась (Ellis et al., 1996). Основываясь на уровнях экспрессии *gusA* в трансгенных растениях *Populus L.* и *Picea A.Dietr.*, Ellis et al. (1996) пришли к выводу, что экспрессия *gusA* наименее вариабельна во время культивирования регенерированных трансформантов *in vitro* и наиболее вариабельна во время выращивания в грунте.

Многие исследователи соматоклональной изменчивости сообщали о мутациях в трансгенных растениях таких, как чахлый рост растений, аномалии стебля, листьев и цветка, снижение фертильности и полиплоидизации (Imai et al., 1993; Lynch et al., 1995; Cervera et al., 2000; Sala et al., 2000). Labra et al. (2004) исследовали геномные изменения в трансгенных растениях *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., полученных с помощью агробактериальной трансформации, и пришли к выводу, что изменчивость в основном коррелирует со стрессом,

налагаемым культурой ткани, а не с интеграцией чужеродного гена. При параллельном культивировании трансгенных и нетрансгенных линий *Agapanthus L'Hér.*, отмечены сходные соматональные вариации на примере репортерного гена *gusA* (Mori et al., 2007). Степень соматональной изменчивости в трансгенных растениях может коррелировать со стрессом, вызванным тканевой культивацией (Sala et al., 2000; Labra et al., 2001).

В нескольких работах зафиксировано отклонение расщепления по Менделю в трансгенных растениях (Shrawat et al., 2007; Weinhold et al., 2013). Это выявило существование до сих пор неизвестных клеточных механизмов, которые регулируют экспрессию трансгенов. В течение последних трех десятилетий многие работы о нестабильности трансгена и причинах этих событий были в центре внимания (Charrier et al., 2000; Stroud et al., 2013). Объяснение инактивации/молчания трансгенной активности было связано с отсутствием транскрипции вследствие метилирования промотора наряду с конденсацией хроматина или деградацией транскриптов с помощью прочих механизмов (Fagard, Vaucheret, 2000).

Одним из источников появления новых признаков в трансформированных растениях являются инсерционные эффекты, появляющиеся в процессе вставки Т-ДНК (Kessler et al., 1992; König et al., 2004). В дополнение к встраиваемой ДНК, во многих случаях также добавляется дополнительная ДНК. Дополнительная ДНК может происходить либо из растительного генома, либо быть неизвестного происхождения (Kohli et al., 1999; Krysan et al., 2002; Forsbach et al., 2003; Makarevitch et al., 2003; Sallaud et al., 2003). Также часто встречаются небольшие делеции в геномной ДНК растений, фланкирующие сайт инсерции. Эти делеции, как правило, менее 100 п.н., хотя иногда также наблюдаются довольно крупные делеции (Forsbach et al., 2003; Kim et al., 2003). Например, в *Arabidopsis thaliana*, трансформированном с использованием *Agrobacterium tumefaciens*, были обнаружены хромосомные транслокации (Nacry et al., 1998; Forsbach et al., 2003). Тем не менее, эти источники непреднамеренных изменений в своей основе не отличаются от тех, которые происходят при традиционном размножении или

посредством естественных перестроек генома (Venkatesh et al., 2014). Генерация новых открытых рамок считывания (ORF), которые могут возникать при вставке последовательностей ДНК в процессе трансгеноза, также может иметь место при обычном размножении или являться результатом естественных геномных перестроек (Schnell et al., 2015; Beker et al., 2016).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты и схема исследования

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. Ранее нами на основе методов фрагментного анализа были проведены скрининговые исследования по поиску видов с высоким внутривидовым полиморфизмом, возможности длительного культивирования каллуса и подверженности агробактериальной трансформации. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали экстрагированную ДНК из высушенных гербарных образцов исследуемых видов из коллекции гербария Алтайского государственного университета (АлТУ). В целом было использовано более 150 образцов, 12 видов растений из 25 популяций (Таблица 1).

Таблица 1 - Анализ генетического разнообразия на основе вычислений частоты полиморфных локусов и индекса видового разнообразия Шеннона

Вид	Место произрастания популяции	P, %	I	SE
<i>Potentilla shmakovii</i> Kechaikin	Монголия, хр. Каралахту, пер. Обатын Доба	33,33	0,202	0,056
	Монголия хр. Байтаг-Богда, г. Алтан-Обо	48,15	0,291	0,059
<i>Potentilla chamaeleo</i> Sojak	Монголия, хр. Каралахту, пер. Обатын Доба	52,78	0,319	0,051
	Монголия хр. Байтаг-Богда, г. Алтан-Обо	33,33	0,202	0,048
	Монголия хр. Дзун-Джаргалант, дол. р. Ар-Шаатын-Гол	44,44	0,269	0,051
<i>Potentilla pamirica</i> Th. Wolf	Монголия, хр. Каралахту, пер. Обатын Доба	26,92	0,158	0,055
	Монголия хр. Байтаг-Богда, г. Алтан-Обо	30,77	0,198	0,061
<i>Taraxacum glabrum</i> DC	Россия, Респ. Алтай, плато Укок	16,67	0,101	0,068
	Россия, Алтайский край, верховья р. 1ая Шумишка	8,33	0,057	0,057

<i>Taraxacum bessarabicum</i> (Hornem.) Hand.-Mazz.	Россия, Алтайский край, Аллейский р-он, степь	7,69	0,047	0,047
	Россия, Респ. Алтай, долина р. Чуя, г.Ржанная	46,15	0,279	0,087
<i>Veronica linariifolia</i> Pall. ex Link	Россия, Алтайский край, Смоленский р-он среднее течение р. Песчанная	20,00	0,117	0,049
	Россия, Иркутская обл., побережье оз.Байкал, м. Киркирей	37,05	0,215	0,061
<i>Rumex acetosa</i> L.	Россия, Алтайский край, Смоленский р-он низовья р. Песчанная	75,70	0,344	0,024
	Россия, г. Барнаул, долина р. Обь	47,70	0,215	0,031
<i>Inula britannica</i> L.	Россия, Респ. Алтай, с. Акташ, долина р.Чуя	66,67	0,399	0,073
	Россия, Респ. Алтай, пос. Манжерок, долина р. Катунь	55,56	0,314	0,07
<i>Woodsia alpina</i> (Bolton) Gray	Россия, г. Курган, урочище Иванов камень	11,11	0,067	0,067
	Китай, г. Сонг Шу Гоу, деградирующий лиственный лес	22,22	0,134	0,089
<i>Woodsia asiatica</i> Schmakov et Kiselev	Китай, г. Сонг Шу Гоу, деградирующий лиственный лес	55,56	0,336	0,106
	Россия, Чарышский р-он, сев. макросклон г. Каменная	22,22	0,134	0,089
<i>Woodsia calcarea</i> (Fomin) Schmakov	Россия, респ. Алтай, верховья р.Аккол	55,56	0,336	0,106
	Россия, Змеиногорский р-он, зап. берег оз.Кольванское	44,44	0,269	0,106
<i>Allium nutans</i> L.	Россия, Алтайский край, Змеиногорский р-он, западный склон Тигерекского хребта	35,77	0,207	0,048
	Россия, Респ. Алтай, Кош-Агачский р-он, на слиянии рек Чаган-Узун и Чуя	51,07	0,302	0,060

Примечание: P – Уровень полиморфизма локусов популяций; I – Индекс Шеннона; SE – стандартная ошибка среднего.

Согласно данным фрагментарного анализа RAF были выявлены значительные отличия в полиморфизме популяций таких видов как *Potentilla shmakovii* Kechaikin, *P. chamaeleo* Sojak, *Taraxacum glabrum* DC., *Veronica linariifolia* Pall. ex Link, *Rumex acetosa* L., *Inula britannica* L. На основе данных о достаточно высоком уровне полиморфизма, а также возможности длительного культивирования каллуса и генетической трансформации представители родов *Inula* L. (*I. britannica*) и *Rumex* L. (*R. acetosa*) были отобраны в качестве модельных таксонов для анализа изменчивости генетического полиморфизма в коллекции *in vitro* (Скапцов и др., 2015). Виды рода *Rumex* являются привлекательными модельными объектами для изучения хромосом, полового хроматина и соотношения полов, морфогенеза в культуре *in vitro* (Błocka-Wandas et al., 2007; Grabowska-Joachimak et al., 2012; Ślesak et al., 2012). В связи с данным фактом для исследования использовали интродуцированные мужские экземпляры *R. acetosa*, отбор контролировали с помощью проточной цитометрии.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Культивирование *in vitro*

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*. Отбор образцов осуществляли согласно схеме (рисунок 5); в качестве меры изменчивости в фенотипе каллусных линий и регенерантов использовали экспрессию репортерного гена *gusA*.



Рисунок 5 – Схема эксперимента.

Образцы для RAF-анализа, цитометрии, анализа хромосом и NGS-секвенирования отбирали из нетрансформированных линий для исключения влияния последствий трансгенеза. Для дальнейших анализов были сформированы следующие линии *in vitro* (таблица 2).

Таблица 2 – Линии *in vitro*, используемые для анализов

<i>R. acetosa</i> L.	<i>I. britannica</i> L.	Стадия культивирования <i>in vitro</i>
P1	I1	Листовые экспланты
P2	-	Каллусы после 3 месяцев культивирования на среде для пролиферации
P3	I2	Каллусы после 6 месяцев культивирования на среде для пролиферации
P4	I3	Каллусы после 12 месяцев культивирования, перенесенные на среду для геммогенеза
P5	I4	Регенеранты, полученные в каллусной культуре после 12 месяцев пролиферации

В качестве растительного материала использовали мезофильные экспланты *Rumex acetosa* L. и *Inula britannica* L. Экспланты стерилизовали в 70 % этаноле в течение одной минуты, обрабатывали 2%-ым раствором гипохлорита натрия (Вектон, Россия) в течение 15 минут и трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Культивирование *in vitro* изолированных тканей и органов растений осуществляли согласно общепринятым рекомендациям с вариациями (Сохранение вегетативно..., 2011; Бутенко, 1999). На различных этапах экспериментальной работы использовали минеральную основу питательных сред МС (таблица 3) с добавлением 30 г/л сахарозы и 0,3 % фитагеля (Sigma-Aldrich, Германия) и различными вариациями регуляторов роста (Муратова и др., 2010; Murashige, 1962). Культивацию осуществляли в климатической камере КС-200 (СКТБ, Россия).

Таблица 3 – Компонентный состав питательной среды МС (Murashige, 1962)

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
NH ₄ NO ₃	1650	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25
KNO ₃	1900	KI	0,83
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440	Fe ₂ SO ₄ x 7H ₂ O	27,8
MgSO ₄ x 4H ₂ O	370	Na ₂ -ЭДТА x 2H ₂ O	37,3
KH ₂ PO ₄	170	Тиамин - HCl	0,1
MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,3	Пиридоксин - HCl	0,5
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025	Никотиновая кислота	0,5
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6	Мезо-инозит	100
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025	-	-

Для количественного определения суммы полифенолов каллусы высушивали при 40 °С в вытяжном шкафу. Высушенные каллусы измельчали в ступке до размера частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 2 мм. Для экстракции 40 мг измельченных каллусных тканей помещали в пробирки типа Эппендорф и заливали 1 мл дистиллированной воды, после чего плотно закрытые пробирки помещали в твердотельный термостат (BioSan) на 1,5-2 часа при температуре 40 °С, смесь встряхивали на вортексе каждые 15 мин. По

окончании процесса экстракции образцы центрифугировали (MultiSpin, Eppendorf GmbH) 1 мин. при 10 тыс. об. до осветления раствора, полученный экстракт использовали в дальнейших исследованиях. Суммарное содержание фенольных соединений определяли модифицированным методом Фолина-Чокальтеу в пересчете на галловую кислоту (Руководство по методам..., 2003). Для изучения метрологических показателей использовали программное обеспечение Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.).

ДНК экстрагировали с использованием коммерческих наборов DiamondDNA (АБТ, Россия) согласно протоколу производителя. Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли с помощью флуориметра MaxLife Fluorometer (МВМ-Диагностик, Россия). Классическую ПЦР проводили на термоциклере MyCycler (Bio-Rad, США). Количественную ПЦР проводили на CFX96 (Bio-Rad, США). Обработку данных количественной ПЦР осуществляли с использованием стандартного программного обеспечения производителя. Электрофорез продуктов амплификации при ПЦР-скрининге проводили в 1,5 %-ном агарозном геле с использованием буфера 0,5 x TAE (0,02 М Трис, 0,01 М уксусная кислота, 0,5 мМ ЭДТА, pH 8,4) с добавлением бромистого этидия в течение 40–60 мин при напряженности электрического поля 3–6 В/см. Микрофлюидный электрофорез проводили с использованием электрофорезной станции Experion (Bio-Rad, США). Визуализацию агарозных гелей и фотодокументацию проводили с использованием трансиллюминатора Quantum ST4 (Vilber Lourmat, Германия). NGS-секвенирование осуществляли с использованием секвенатора по технологии 454 GSJunior (Roche, Швейцария). Данные обрабатывали с использованием стандартного программного обеспечения производителя.

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

2.2.2. Агробактериальная трансформация и анализ трансформированных линий

Конструирование векторной ДНК

Для получения достаточного количества плазмидной ДНК для трансформации *Agrobacterium tumefaciens* и химической трансформации протопластов использовали *Escherichia coli* штамма XL1-Blue. Трансформацию проводили вектором pBIK102iGS (далее пДНК). Для получения компетентных клеток *E. coli* использовали ускоренный протокол (Chung, 1989). Из стока (-80°C) высевали бактерии петлей в жидкую среду LB (10 г/л триптон, 10 г/л хлорид натрия, 5 г/л дрожжевого экстракта, pH 7,5) с 12 мг/мл тетрациклина и выращивали 8 часов при 37°C на шейкере при 200 об/мин. Пересевали культуру на жидкую среду LB, содержащую дополнительно 20мМ глюкозы и 10мМ MgCl_2 . Растили при 37°C и интенсивном встряхивании до $\text{OD}_{600} = 0,3$ ОЕ. Все дальнейшие манипуляции проводили при 0°C . Охлажденную суспензию клеток центрифугировали 5 минут, 5000 об/мин, тщательно удаляли супернатант. Осадок клеток ресуспендировали в 12 мкл LB, содержащего 20мМ глюкозу и 10мМ MgCl_2 , добавляли 13мкл 2xTSS (LB, содержащий 50мМ MgCl_2 и 20% 3000 ПЭГ). В 100 мкл суспензии добавляли 50 нг пДНК, пробирку с клетками охлаждали и переносили на 30 сек. в твердотельный термостат при 42°C , затем сразу в лед на 2 мин. Далее клетки переносили в пробирку с жидкой средой LB и культивировали 1 час при 37°C . Центрифугировали и сливали супернатант. Клетки ресуспендировали в 100 мкл среды LB и высевали микробиологическим шпателем по 50 мкл в чашки Петри с агаризованной средой LB содержащей 12 мг/мл тетрациклина, 50 мг/л канамицина и 15 г/л агара. Культивировали в термостате при 37°C в течение 8 часов. Трансформированные колонии выращивали в жидкой питательной среде LB при 37°C 8-12 часов и выделяли плазмидную ДНК. Выделение пДНК осуществляли с использованием набора для выделения плазмидной ДНК Wizard Plus SV Minipreps Spin Column, согласно методике производителя. Для конструирования вектора pBIK201iGs

двухнаправленный промотор маннопинсинтетазы был амплифицирован с помощью специфичных олигонуклеотидов содержащих сайты рестрикции HindIII и XbaI. Амплифицированный фрагмент в дальнейшем был клонирован в вектор pVIK102iGs, тем самым был получен вектор pVIK201iGs с промотором маннопинсинтетазы в обратном направлении (рисунок 6).

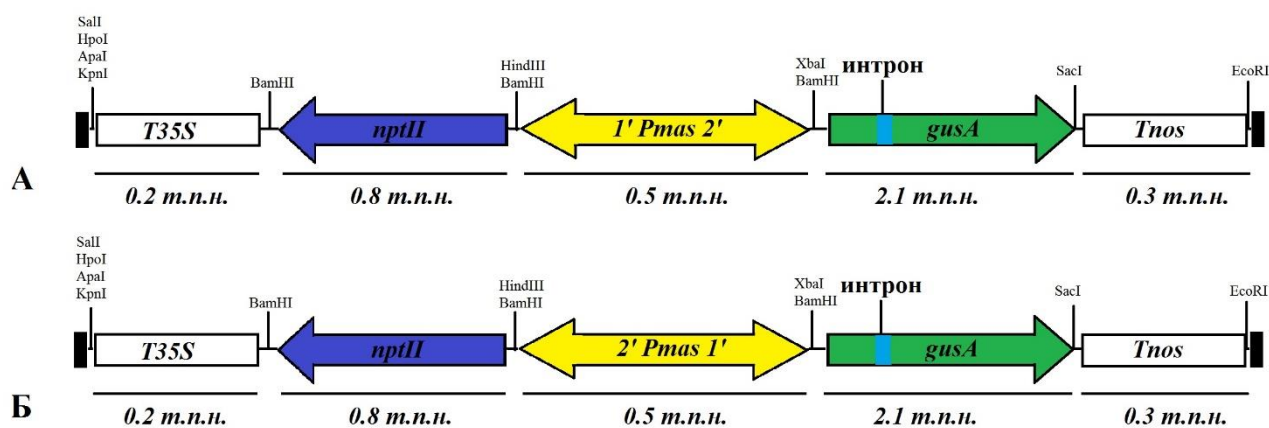


Рисунок 6 – Карта Т-ДНК векторов pVIK102iGs (А) и pVIK201iGs (Б) с обозначением основных структурных элементов.

Амплификацию проводили с разработанными нами олигонуклеотидами MasXb 5' ААТСТАGAAAAGTGCACAСТТСТАТАСТ 3' и MasHi 5' АСАAGСТТАGАСGAGATGAАТТАТGСАА 3' в буфере, содержащем каждый dNTP в концентрации 0,2 мМ, 0,5 пМ каждого олигонуклеотида, 50 нг ДНК вектора pVIK102iGs, 1 ед. Таq-полимеразы (СибЭнзим, Россия), 0,2 ед Pfu-полимеразы (СибЭнзим, Россия). Объем реакционной смеси составлял 50 мкл. Реакцию проводили при следующих условиях: предварительная денатурация при 95 °С – 5 мин.; [95 °С – 30 сек.; 54 °С – 30 сек.; 72 °С – 1 мин.]x25; 72 °С – 7 мин. Рестриктию проводили в отдельных пробирках для продукта амплификации и вектора. Рестриктию с HindIII (20 ед.) эндонуклеазой (СибЭнзим, Россия) проводили в SE-буфере W при 37 °С в течение 60 минут. Затем концентрацию Tris доводили с помощью 1 М Tris-HCl (рН 7,6) до 50 мМ добавляли 20 ед. эндонуклеазы XbaI (СибЭнзим, Россия). Инкубировали при 37 °С, в течение 60

минут. Инактивацию ферментов, осуществляли нагреванием до 65 °С, в течение 20 минут. ДНК осаждали изопропанолом.

Рестрикты лигировали с использованием T4 ДНК лигазы (СибЭнзим, Россия). Для реакции брали 50-100 нг гидролизованной ДНК вектора и 150-300 нг амплификата. Реакцию проводили при 4 °С в течение ночи. Продукты лигирования осаждали изопропанолом и растворяли в 10 мкл воды. Сразу ставили реакцию трансформации *E. coli*. ПЦР-скрининг колоний *E. coli* осуществляли с использованием ПЦР с разработанными нами олигонуклеотидами Mas1 5' AGTATAGAAGTGTGCACTTTT 3' и GUS1 5'GAGTGACCGCATCGAA 3' в буфере, содержащем каждый dNTP в концентрации 0,2 мМ, 0,5 пМ каждого олигонуклеотида, 1 ед. Taq-полимеразы. Объем реакционной смеси составлял 10 мкл. Колонии выборочно забирали стерильной зубочисткой на свежую селективную питательную среду и часть в пробирку с ПЦР смесью. Реакцию проводили при следующих условиях: предварительная денатурация при 95 °С, 5 мин.; [95 °С, 20 сек.; 54 °С, 30 сек.; элонгация – 72 °С, 30 сек.]_{30x}. Фрагменты разделяли в агарозном геле. Колонии, содержащие вектор pВК201iGs с обратным направленным промотором, наращивали для выделения пДНК и трансформации *A. tumefaciens*.

Агробактериальная трансформация

Для генетической модификации использовали бактерию *A. tumefaciens* обезоруженного штамма ЕНА105. Культивацию осуществляли на агаризованной питательной среде АВ, дополненной 25 мкг/л рифампицина (Clark, 1967).

Трансфекцию пДНК проводили методом электропорации на электропораторе Multiporator (Eppendorf, Германия), согласно стандартным методикам с модификациями (Mersereau, 1990). Колонии *A. tumefaciens* пересеивали стерильной петлей в жидкую среду LB, содержащую 25 мкг/л рифампицина, и культивировали на шейкере при 30 °С до значения OD600 = 1,5–2,0 ОЕ. Центрифугировали 5 мин. при 6000 об/мин и промывали осадок холодной стерильной водой 5-7 раз. Осадок ресуспендировали в стерильном 10%-ом глицерине до концентрации клеток 5×10^{11} клеток/мл. Переносили 800 мкл

суспензии в стерильную пробирку Эппендорф и добавляли 50 нг пДНК. Электропорацию проводили в стандартной кювете Эппендорф с размером щели 4 мм при 1800 В в течение 5 сек. После клетки переносили в пробирку с 5 мл жидкой среды LB и культивировали 1 час при комнатной температуре. Центрифугировали 5 мин при 6000 об/мин. Осадок ресуспендировали в 800 мкл среды LB и высевали микробиологическим шпателем на агаризованную среду АВ, содержащую 25 мкг/л рифампицина, 50 мг/л канамицина и 15 г/л агара. Культивировали в термостате при 30 °С в течение 1-2 суток.

Культивацию агробактериальных колоний для трансформации растений проводили на среде LB, которая содержала 50 мг/л канамицина и 25 мг/л рифампицина (Wise, 2006).

Генетическую трансформацию проводили методом агробактериальной сокультивации с использованием штамма *Agrobacterium tumefaciens* ЕНА105 и векторной конструкции рВІК102iGs, любезно предоставленных нам заведующей группой генной инженерии Аграрной экспериментальной станции Фукуи (Япония). Штамм для молекулярного клонирования *Esherichia coli* XL1-blue любезно передан нам лабораторией фармакогеномики ИХБФМ СО РАН (Новосибирск).

Для высокоэффективной агробактериальной трансформации *I. britannica* L. и *R. acetosa* L. использовали модифицированную методику по Shinoyama et al. (2003). В качестве эксплантов использовали листовые пластинки *I. britannica* L. и *R. acetosa* L. Вырезанные экспланты сокультивировали с агробактериями в среде для инфекции в течение 15 мин. Суспензию агробактерий с $OD_{600} = 1,5$ ОЕ добавляли в соотношении 1/5 к МС, содержащей 30 г/л сахарозы, 0,1 % Silwett L-77 и 100 мкМ ацетосирингон, рН 5,8 (Skaptsov et al., 2016).

В качестве вектора для генетической трансформации использовали вектор рВІК102iGs, несущий репортерный ген *gusA*, включающий в себя интрон и ген *nptII*, кодирующий устойчивость к антибиотикам неомицин, генетицин, канамицин, паромомицин, под контролем двунаправленного промотора маннопинсинтетазы-1' и 2' (*mas 1'-2'*) из дикого типа *Agrobacterium tumefaciens*.

После инфицирования экспланты перемещали в чашки Петри на поверхность среды для сокультивирования на основе МС, содержащей 30 г/л сахарозы, 15 г/л агара, 1 г/л гидролизата казеина, 2 мг/л НУК и 1,0 мг/л БА, рН = 5,8. Сокультивацию проводили при 25 °С в темноте в течение 3 суток.

По прошествии времени экспланты переносили в чашки Петри на поверхность среды для элиминации бактерий на основе МС, дополненной 30 г/л сахарозы, 15 г/л агара, 400 мг/л цефотаксима, 2 мг/л НУК и 1 мг/л 6-БА, рН = 5,8. Культивировали при 25 °С в темноте в течение 7 суток.

После полной элиминации бактерий экспланты переносили в чашки Петри на поверхность среды для селекции трансформированных клеток на основе МС, содержащей 30 г/л сахарозы, 15 г/л агара, 300 мг/л цефотаксима, 30 мг/л генетицина, 2 мг/л НУК и 1 мг/л 6-БА, рН = 5,8. Культивировали при 25 °С с 16-часовым фотопериодом в течение 14 суток с последующим пассированием на свежие среды для селекции.

Эффективность агробактериальной трансформации рассчитывали по формуле: *Эффективность трансформации (%) = количество трансформированных эксплантов/общее количество эксплантов * 100.*

Гистохимический анализ

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). Для анализа ткани трансформированных эксплантов после стадии элиминации агробактерий инкубировали в реакционном буфере, содержащем 50 мМ NaH₂PO₄ (рН = 7), 0,01 % Tween 20, 10 мМ Na₂EDTA and 0,3 % (вес/объем) 5-бromo-4-хлоро-Х-Gluc в качестве субстрата для β-глюкуронидазы. Ткани инкубировали при 37°С в течение 12-24 часов и наблюдали за появлением синей окраски, характерной для проявления работы β-глюкуронидазы.

ПЦР-анализ

Наличие трансгена исследовали с помощью классической ПЦР с разработанными нами олигонуклеотидами GUS-f 5' GATCGCGAAAАСТGTGGAAT-3' и обратный GUS-r 5' ТААТGAGTGACCGCATCGAA-3' (ПЦР продукт 212 п.н.), Gus4-f 5' GTATCGTGCTGCGTTTTCGAT 3' и Gus1-r 5' ТААААСGACGGCCAGTGAAT 3' (ПЦР продукт 1912 п.н.), Gus4-f и Gus2-r 5' ААGACCGGCAACAGGATTC 3' (ПЦР продукт 1692 п.н.), Gus4-f и Gus4-r 5' СТGТАAGTGCGCTTGCTGAG 3' (ПЦР продукт 923 п.н.). Олигонуклеотиды конструировали на основе последовательности участка Т-ДНК вектора рВІК102iGs с использованием Primer-BLAST (Ye et al., 2012). Амплификацию выполняли в буфере, содержащем каждый dNTP в концентрации 0,2 мМ, 0,5 пМ каждого олигонуклеотида, 100 нг геномной ДНК, 1 ед. Таq-полимеразы. Объем реакционной смеси составил 25 мкл. Реакцию проводили при следующих условиях: 95 °С – 3 мин.; [95 °С – 20 сек; 60 °С – 30 сек; 72 °С – 30 сек.] x30.

ПЦР в режиме реального времени

Количество копий целевого гена исследовали с помощью ПЦР в реальном времени. Для амплификации использовали олигонуклеотиды GUS-f, GUS-r, а также TaqMan зонд меченый по 5' VIC по 3' BHQ2: GUS-VIC 5'-ТАТАССGAAAGGTTGGGCAG-3'. Амплификацию выполняли в буфере, содержащем каждый dNTP в концентрации 0,2 мМ, 0,5 пМ каждого олигонуклеотида и зонда, 100 нг геномной ДНК и 100 нг ДНК вектора рВІК102iGs в пяти десятикратных разведениях, 1 ед. Таq-полимеразы. Объем реакционной смеси составил 25 мкл. Реакцию проводили при следующих условиях: 95 °С – 3 мин.; [95 °С – 10 сек; 60 °С – 30 сек; 72 °С – 30 сек.] x39. Амплификацию и анализ данных количественной ПЦР в реальном времени проводили с использованием термоциклера CFX96 и стандартного программного обеспечения (Bio-Rad, США).

Количество копий рассчитывали согласно формуле:

Количество копий на один геном = Количество копий общее / Кол-во геномов образца, где x = Разведение образца, 10000 = Разведение стандарта,

Молекулярная масса вектора pВК102iGs (201iGs) = $1,664 \cdot 10^{-5}$ пг, N_v = Концентрация вектора/ $1,664 \cdot 10^{-5}$ пг, $N_s = x \cdot N_v / 10000$, Кол-во геномов образца = концентрация ДНК/размер генома. Количество копий общее = N_s / количество геномов образца.

2.2.3. Цитогенетический анализ

Проточная цитометрия

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). Для анализа использовали не менее 30 образцов с каждой стадии культивирования. Каллусы и молодые листья регенерантов измельчали при помощи лезвия в 500 мкл охлажденного буфера Otto I (Otto, 1990) с модификациями (0,1 М лимонной кислоты, 0,5 % Triton X-100) и инкубировали 10 мин. при комнатной температуре (Doležel et al., 2007). Образцы фильтровали через нейлоновую мембрану с размером пор 50 мкм и смешивали с раствором для окрашивания, состоящим из 1 мл Tris-MgCl₂ буфера (0,2 М Tris-HCl, 4 mM MgCl₂·6H₂O) с PI (50 мкг/мл)/DAPI (4 мкг/мл), РНазы (50 мкг/мл) и β-меркаптоэтанола (1 мкл/мл) (Doležel et al., 1998; Pfosser et al., 1999; Скапцов и др., 2016). В качестве стандарта для определения относительного содержания ДНК *I. britannica* L. использовали изолированные ядра *Pisum sativum* L. ‘Глориоза’ с известным содержанием ДНК $2C = 9,38$ пг (Скапцов и др., 2014).

В качестве стандарта для определения относительного содержания ДНК *R. acetosa* L. использовали *Vicia faba* L. ‘Inovec’ ($2C = 26,90$ пг) (Doležel et al., 1992). Данные флюоресценции изолированных ядер детектировали при помощи проточного цитометра Partec CyFlow PA (Partec, GmbH) с лазерным источником излучения с длиной волны 532 нм и УФ-светодиодом. Обработку данных цитометрии осуществляли с использованием стандартного программного обеспечения прибора и программного обеспечения Flowing software 2.5.1.

Для трансформации данных из логарифмического в линейное представление использовали формулу: $f = 10^{X/64}$ (Marie, Brown, 1993). Содержание ДНК рассчитывали исходя из формулы $2C = f \cdot M$, где f – индекс (разница между средними значениями пика образца и стандарта в линейной шкале); X – разница между средними значениями пиков (каналов) стандарта и образца в логарифмической шкале; 64 – частное между количеством каналов шкалы прибора на количество декад на полной логарифмической шкале (256/4 для Partec CyFlow PA); M – среднее значение пика образца.

Уровень эндополиплоидии регенерантов и каллусных культур оценивали с использованием показателя эндополиплоидизации – среднего уровня редупликации на ядро (Cycle value) – рассчитывали согласно формуле: $\text{Cycle value} = (0 \times n_{2C} + 1 \times n_{4C} + 2 \times n_{8C} + 3 \times n_{16C} \dots) / (n_{2C} + n_{4C} + n_{8C} + n_{16C} \dots)$, где n_{2C} , n_{4C} , n_{8C} , n_{16C} соответствуют количеству ядер пика (высота пика), характеризующих уровень плоидности на гистограмме (2C, 4C, 8C...) (Barow, Meister, 2003). Согласно методу M. Barow (2003), уровень эндополиплоидизации более значения 0,1 свидетельствует о присутствии эндополиплоидии.

Анализ количества хромосом

Для подтверждения данных цитометрии использовали метод давленных препаратов из кончиков корней регенерантов и растений-доноров эксплантов с окрашиванием ацетоорсеином. Корни помещали в воду с температурой таяния льда и инкубировали 24 часа в темноте. Предфиксационную обработку проводили в 0,05 % растворе колхицина (Serva, Германия) при температуре 25 °C в течение трех часов, затем фиксировали в смеси этанола и ледяной уксусной кислоты (Вектон, Россия) (3:1) в течение трех часов. Перед окрашиванием образцы промывали в 45 % растворе уксусной кислоты. Мацерацию проводили в смеси 1 N соляной кислоты (Вектон, Россия) и 2%-го ацетоорсеина (1:9) при 60 °C в течение 15 секунд. Инкубировали при комнатной температуре 15 минут. Затем добавлял свежий ацетоорсеин и окрашивали 20 минут. Для получения монослоя клеток проводили раздавливание наиболее интенсивно окрашенных участков в 45%-ой уксусной кислоте под покровным стеклом. Полученные препараты

исследовали методом прямой световой микроскопии и подсчитывали хромосомные числа клеток контрольных растений (кончики корешков пророщенных семян) и регенерантов (Барыкина, 2004). Анализировали не менее чем 20 регенерантов с исследованием не менее чем 20 метафазных пластинок.

2.2.4. Фрагментный анализ

Культура *in vitro* позволяет в течение короткого времени проследить активность мутационных процессов на уровне генома и генотипа. В нашей работе мы использовали RAF-анализ для оценки генетических различий каллусных линий и линий регенерантов *in vitro*. RAF-анализ эффективно используется для оценки генетического разнообразия и межпопуляционных взаимоотношений как у животных, так и растений. Для оценки полиморфизмов в культуре *R. acetosa* L. и *I. britannica* L. использовали олигонуклеотиды серии k02a (5' CATTCGAGCA 3') и k02b (5' GTCTCCGCAG 3'), определенные как оптимальные в результате скрининговых исследований и процесса оптимизации ПЦР (Waldron et al., 2002).

Аmplификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 5 нг ДНК, 2,5 мкл 10x ПЦР буфера, 25 mM MgCl₂ (СибЭнзим, Россия), 1 мкл 5 mM смеси dNTPs (Медиген, Россия), 1 мкл каждого 10 mM олигонуклеотида и 1 ед. Taq-полимеразы (Медиген, Россия). ПЦР проводили на амплификаторе MyCycler (Bio-Rad, США), используя RAF протокол: 94,0 °C – 5 мин. [94,0 °C – 30 сек., 57,0 °C – 1 мин., 56,0 °C – 1 мин., 55,0 °C – 1 мин., 54,0 °C – 1 мин., 53,0 °C – 1 мин.]x35, 72,0 °C – 10 мин., 4,0 °C в конце процесса. Фрагменты ДНК разделяли с помощью метода микрофлюидного электрофореза с использованием набора Experion DNA 1K Analysis Kit (Bio-Rad, США). После амплификации и электрофоретического разделения продуктов ПЦР формировали матрицу признаков на основе присутствия (1) или отсутствия (0) фрагментов равной длины. Указанную матрицу использовали для расчета данных молекулярных вариаций (AMOVA), генетического разнообразия, полиморфизма, индекса Шеннона и генетических дистанций между линиями клонов в программном

обеспечении GeneALEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2012). Для определения генетической гомогенности использовали программное обеспечение Structure v. 2.3.3 (Pritchard et al., 2000). Анализ был проведен с использованием модели без генетического смешивания, принимая во внимание соотношение частот аллелей в различных линиях *in vitro* (калусных линий, регенерантов и контрольных образцов). Модель предполагает генетическое сходство сравниваемых популяций. Создание цепей Маркова проводили в течение 1 миллиона итераций для $K = 1-10$ в трех повторах для каждого значения K .

2.2.5. NGS-секвенирование

Секвенирование фрагментов RAF-анализа

В данном исследовании использовали продукты амплификации RAF с олигонуклеотидами K02a и K02b, для линий *R. acetosa* L. – P1 (контрольная линия), P2 (калусная линия после трех месяцев культивирования), P4 (калусная линия после 12 месяцев культивирования), P5 (регенеранты после 12 месяцев культивирования каллуса). Ампликоны были секвенированы с использованием технологии 454.

Продукты амплификации выделяли изопропанолом по следующему протоколу. К смеси ДНК добавляли 20 мкл 7 М ацетата калия и доводили до объема 200 мкл с помощью TE-буфера. Добавляли равный объем изопропанола и центрифугировали 5 минут при 13000 g. Осадок промывали 70 % этанолом и подсушивали в термостате при 56 °C. Осадок растворяли в 10-50 мкл воды или TE-буфера. Библиотеку ампликонов готовили с использованием набора GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kits (Roche 454, Branford, CT). Эмульсионную ПЦР и пиросеквенирование подготавливали с использованием наборов Roche454 с лигированными концами и осуществляли согласно инструкции производителя. Реакцию секвенирования производили с использованием секвенатора Roche 454 GSJunior. Сборку, нормализацию, поиск ошибок и дублированных

последовательностей осуществляли с использованием программного обеспечения Geneious, Biomatters Limited. Поиск гомологичных последовательностей по алгоритмам BLAST в базах данных последовательностей олигонуклеотидов nr/nt осуществляли с использованием программного обеспечения Blast2GO (Conesa, Götzt, 2008).

MAFLP-анализ и NGS-секвенирование ПЦР продуктов.

Для секвенирования метилированных последовательностей ДНК *R. acetosa* L. использовали модифицированный метод (рисунок 7) метил чувствительного полиморфизма длин амплифицированных фрагментов – MAFLP (Marconi et al., 2013).

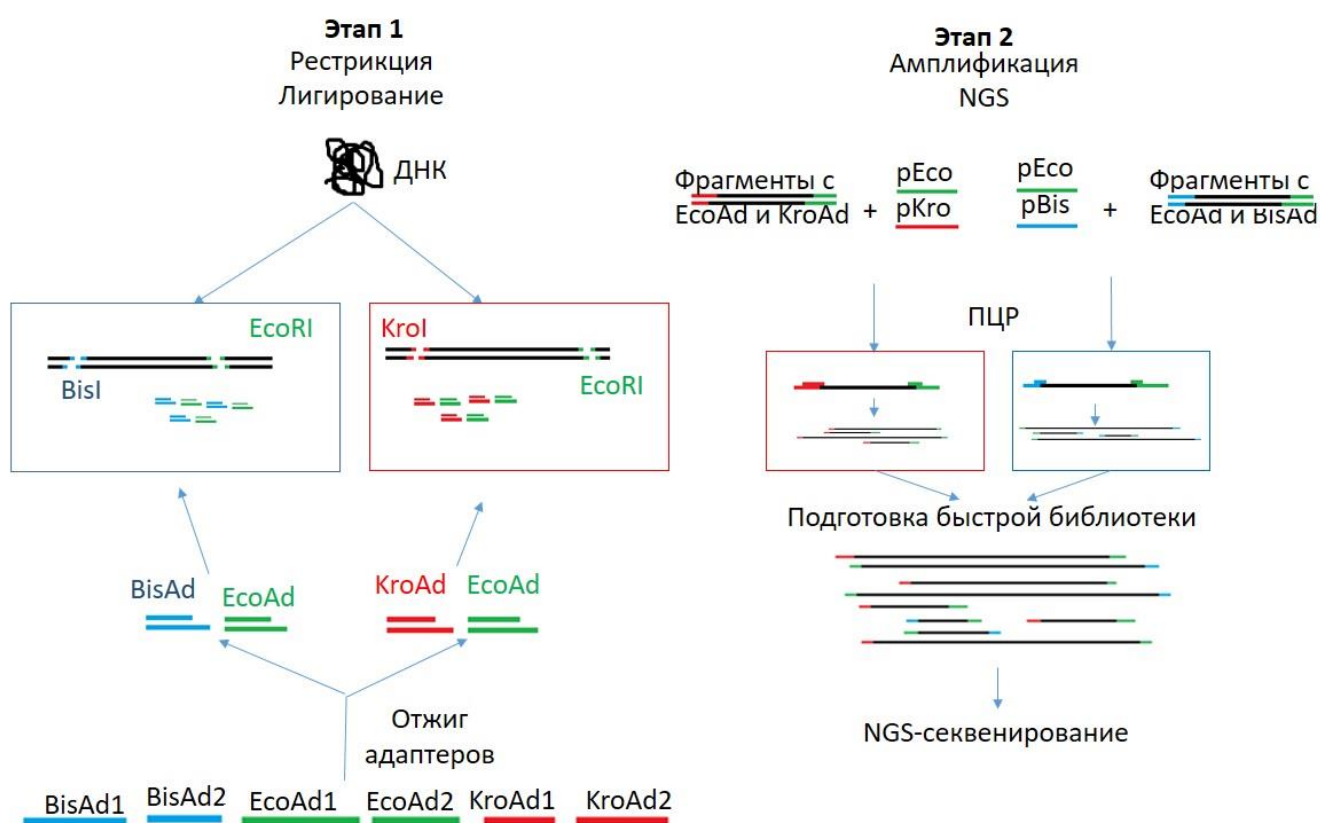


Рисунок 7 – Краткая схема подготовки образцов ДНК к NGS-секвенированию.

Геномную ДНК различных линий культур *R. acetosa* L. *in vitro* обрабатывали метилзависимыми эндонуклеазами рестрикции BisI (C(5mC)↓NGC) /KroI (G↓C(5mC)GGC) и эндонуклеазой EcoRI (G↓AATTC) (СибЭнзим, Россия),

лигировали с синтетическими адаптерами и амплифицировали со специфичными олигонуклеотидами по следующему протоколу.

Для отжига адаптеров использовали разработанные нами олигонуклеотиды, содержащие специфичные последовательности к сайтам рестрикции используемых в исследовании эндонуклеаз: EcoAd1 5' TATTGACGCGCACAGCGAT 3', EcoAd2 5' AATTATCGCTGTGCGCGTCAATA 3', BisAd1 5' GGTCACGGATGCGCATT 3', BisAd2 5' NAATGCGCATCCGTGACC 3', KroAd1 5' CCGGGTCACGGATGCGCСТА 3', KroAd2 5' TAGGCGCATCCGTGAC 3'.

Раствор олигонуклеотидов EcoAd1 (100 мкМ) и EcoAd2 (100 мкМ), растворы олигонуклеотидов BisAd1 (1 мМ), BisAd2 (1 мМ), а также KroAd1 (1мМ), KroAd2 (1 мМ) попарно смешивали в соотношении 1:1 и нагревали в течение 3 минут при 95 °С и оставляли для остывания при комнатной температуре на 5 минут для получения трех типов адаптеров.

Готовили смесь для проведения реакции рестрикции/лигирования следующего состава: 1,1 мкл 10x SE буфер W, 100-500 нг геномной ДНК, 5 ед. EcoRI эндонуклеазы, 1 ед. BisI/KroI эндонуклеазы, 1 мМ БСА, 1 мкл BisI/KroI-адаптера, 1 мкл EcoRI адаптера, 5-10 ед. T4-Лигазы, АТФ 1 мМ, вода до 11 мкл. Реакцию рестрикции/лигирования проводили в амплификаторе по следующей программе: 37 °С – 3 ч.; 14 °С – 12-16 ч. Реакцию останавливали, добавляя 1 мкл 0,5 М Трилон Б.

Амплификацию проводили с разработанными нами специфичными олигонуклеотидами pBis 5' GTCACGGATGCGCСТANGC 3', pKro 5' CGCATCCGTGACCCGGC 3', pEco 5' ACGCGCACAGCGATAАТТС 3'. Для ПЦР использовали 10 мкл реакционной смеси, содержащей 0,5 ДНК с лигированными адаптерами, 1 мкл 10x ПЦР буфера, 25 мМ MgCl₂ (СибЭнзим, Россия), 0,4 мкл 5 мМ смеси dNTPs (Медиген, Россия), 1 мкл каждого 10 мМ олигонуклеотида и 0,5 ед. Таq-полимеразы (Медиген, Россия). ПЦР проводили на амплификаторе MyCycler (Bio-Rad, США), протокол: 94,0 °С – 5 мин. [94,0 °С – 30 сек., 64,0 °С – 30 сек., 72 °С – 1 мин.]x6 (Touchdown 1 °С); [94,0 °С – 30 сек., 58,0 °С – 30 сек., 72

°C – 1 мин.]x25; 72,0 °C – 10 мин. Продукты амплификации выделяли изопропанолом.

Секвенирование продуктов MAFLP-анализа

Библиотеку ампликонов готовили с использованием набора GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kits (Roche 454, Branford, CT). Эмульсионную ПЦР и пиросеквенирование подготавливали с использованием наборов Roche454 с лигированными концами и осуществляли согласно инструкции производителя. Реакцию секвенирования производили с использованием секвенатора Roche 454 GSJunior. 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 осуществляли с использованием программного обеспечения Blast2GO со значением e-value не менее 1×10^{-3} .

Секвенирование транскриптома

РНК выделяли из образцов *R. acetosa* L. со стадии культивирования каллуса 12 месяцев. Для выделения РНК использовали следующий протокол. 50-100 мг растительного материала измельчали с помощью пластикового пестика в пробирке Эппендорф 1,5 мл. Добавляли 10 мкл папаина, 10 мкл меркаптоэтанола. Добавляли 700 мкл буфера для денатурации (50 мМ Tris-HCl, 10 мМ Трилон Б, 4 М Гуанидин тиоционат. pH 4,3). Встряхивали на вортексе. Сразу добавляли 300 мкл смеси хлороформ/изоамиловый спирт (92/8). Встряхивали до состояния эмульсии. Центрифугировали (ЦФ) 1 минуту при 13000 g. Супернатант переносили в новую пробирку. Добавляли равный объем смеси хлороформ/изоамиловый спирт. ЦФ 1 минуту на максимальных оборотах. Супернатант переносили в новую пробирку. Добавляли равный объем холодного изопропанола. ЦФ 10 минут на максимальных оборотах. Изопропанол сливали. Осадок промывали в 70 % этаноле. Центрифугировали 30 секунд. Остаток спирта удаляли пипеткой. Осадок растворяли в 250 мкл TE-буфера. Добавляли 250 мкл раствора для преципитации (6 М хлорид лития). Переносили на -20 °C, 10 минут. ЦФ 10-20 минут на максимальных оборотах. Супернатант удаляли пипеткой.

Осадок ополаскивали в 70 % этаноле. Этанол удаляли. Осадок подсушивали на воздухе 10 мин. Растворяли в 20-50 мкл воды.

К препарату РНК (2 мкг) добавляли 20 ед. ингибитора РНКаз и 10 ед. ДНКазы. Инкубировали 30 минут при 37 °С. Инактивировали фермент при 65 °С в течение 20 минут. Ставили реакцию обратной транскрипции с полиТ-олигонуклеотидом. Для синтеза второй цепи кДНК в смесь для обратной транскрипции добавляли 0,2 мкг Random-гексануклеотида и 5 ед. фрагмента Кленова (СибЭнзим, Россия). Инкубировали в амплификаторе в течение 2 часов при 37 °С. Дц-кДНК очищали с использованием магнитных частиц КлинМаг (Евроген, Россия) по протоколу производителя. Библиотеку кДНК готовили с использованием набора GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kits (Roche 454, Branford, CT). Эмульсионную ПЦР и пиросеквенирование подготавливали с использованием наборов Roche454 и осуществляли согласно инструкции производителя. Реакцию секвенирования производили на секвенаторе Roche 454 GSJunior. *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} (Skaptsov et al., 2016).

ГЛАВА 3. ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

3.1. Введение в культуру *R. acetosa* и *I. britannica*, оптимизация питательных сред

Существенным моментом, обеспечивающим длительное поддержание активно пролиферирующей культуры *in vitro*, является выбор питательной среды и оптимальное соотношение регуляторов роста. Как показали результаты наших исследований темпы роста каллуса *R. acetosa* L. и *I. britannica* L. максимальны при концентрациях 1 мг/л БА и 2 мг/л НУК на питательной среде МС (таблица 4).

Таблица 4 – Влияние регуляторов роста на индукцию каллуса *R. acetosa* L. и *I. britannica* L.

Регуляторы роста, мг/л	% эксплантов, индуцирующих каллус	Темп роста каллуса	% эксплантов, индуцирующих каллус	Темп роста каллуса
	<i>R. acetosa</i> L.		<i>I. britannica</i> L.	
БА+НУК				
1,0 + 2,0	100	+++	100	+++
0,4 + 1,9	50	++	70	++
0,4 + 3,7	70	+	70	+
БА+2,4-Д				
1,0 + 2,0	50	+	70	++
0,4 + 2,2	5	–	10	–
2,2 + 2,2	80	+	70	+
БА+АТХП				
1,0 + 2,0	50	+	60	++
0,4 + 2,4	50	+	50	+
1,1 + 2,4	20	+	30	+

Примечание: « – » после инициации рост прекращается, « + » рост незначителен, « ++ » хороший рост.

В настоящий момент существует множество способов по снижению накопления фенольных производных в каллусных тканях; в питательные среды

добавляют аскорбиновую кислоту, цистеин, дитиотриол, активированный уголь и др. Для продления срока культивации нами были предварительно проведены скрининговые исследования на примере *R. acetosa* L. 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. У эксплантов, культивируемых на среде с ПВП, срок жизни составлял максимум 45 суток, тогда как у контрольных образцов вследствие излишнего накопления полифенолов в тканях каллуса наблюдалось прекращение роста после 30 суток (таблица 5). На немодифицированных средах содержание суммы полифенолов превышает данные значения для модифицированных сред. Количественное содержание суммы полифенолов в пересчете на сырые каллусные ткани *Rumex acetosa* L. на модифицированных средах с ПВП и натрий тиосульфатом на 1 г ткани после 30 дн. культивирования варьирует от 0,6 мг до 3,0 мг и от 2,1 мг до 6,0 мг после 40 дн. культивирования. Значения концентраций полифенолов для тканей культивировавшихся на средах без ПВП и антиоксидантов составляет от 2,5 мг до 6,0 мг на 1 г ткани после 30 дн. и от 5,0 мг до 9,9 мг после 40 дн. культивирования соответственно.

Таблица 5 – Содержание суммы полифенолов в каллусных тканях *R. acetosa* L.

Тип среды	Т, сут.	Мин. конц., мг/ 1 г. ткани	Макс. конц., мг в 1 г. ткани	Среднее и ст. отклонение, мг на 1 г. ткани
МС модиф-ая	30	0,6	3,0	1,5 ± 0,6
	40	2,1	6,0	3,3 ± 1,1
МС не модиф-ая	30	2,5	6,0	4,3 ± 1,0
	40	5,0	9,9	7,4 ± 2,1

В нашей работе были получены положительные результаты по снижению накопления производных полифенолов при культивировании каллусной ткани *R. acetosa* L. в присутствии ПВП и натрий тиосульфата. Полученные нами данные свидетельствуют о целесообразности применения ПВП и натрий тиосульфата для

продления срока жизни размножаемых методом поверхностного культивирования тканей растений, если существует проблема с чрезмерным накоплением фенольных производных в культурах растений требовательных к частой смене питательных сред.

Для стимулирования органогенеза мы проводили скрининговые исследования по оценке влияния регуляторов роста. В результате скрининговых исследований по стимулированию органогенеза, выявлено, что органогенез морфогенных зон каллусов наступает при переносе на питательные среды без гормонов. Также, в результате скрининга влияния регуляторов роста нами установлено, что мультипликация побегов после отделения от каллуса наблюдается на питательной среде с регуляторами роста 1 мг/л БА и 0,25 мг/л НУК. Образование корней наблюдали при переносе на питательную среду ½ МС с концентрацией НУК 0,2 мг/л и 0,005 мг/л 24-эпибрассинолида (Sigma-Aldrich, Германия) (Скапцов, Куцев, 2013).

3.2. Культивирование *in vitro* *R. acetosa* и *I. britannica*

Мезофильные экспланты размером 0,5 × 0,5 мм изолировали с использованием инструмента «Cork Borer» с зазубренными кромками от центральной жилки листовых пластинок. Для *R. acetosa* L. отбирали мужские экземпляры с характерным относительным содержанием ДНК ≈ 7,5 пг. Более 100 эксплантов *R. acetosa* L. и *I. britannica* L. 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.

Сформированные каллусы отделяли от первоначального экспланта и культивировали в течение 12 месяцев в тех же условиях. Пассажи на свежие питательные среды производили каждые 14 дней. Для индукции органогенеза 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-эпибрасинолида), часть повторно культивировали на среде для мультипликации побегов. Побеги культивировали до образования корней. После переноса эксплантов на модифицированные питательные среды активную пролиферацию каллуса *R. acetosa* L. наблюдали через 2 недели. Каллусы формировали 100 % эксплантов. Твердые зеленые каллусы были сформированы после отделения пролиферирующих клеток от первоначального экспланта (рисунок 8 б).

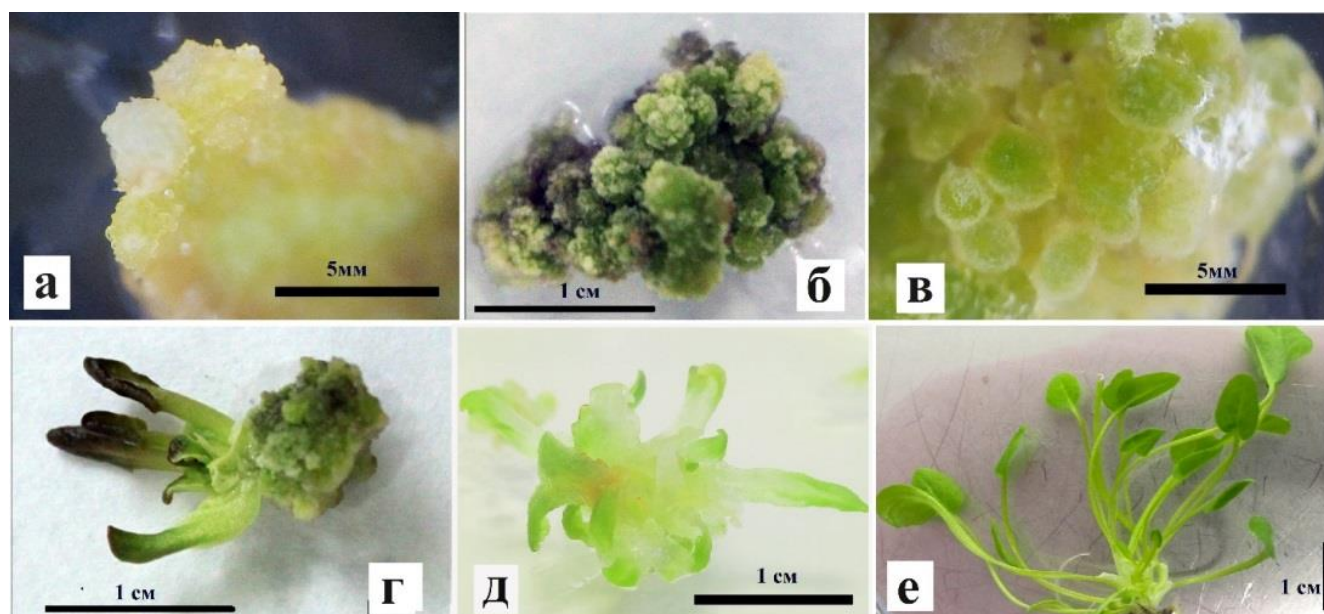


Рисунок 8 – Стадии культивирования *Rumex acetosa* L. *in vitro*. а – Инициация каллуса. б – Пролиферация каллуса. в – Формирование органогенных зачатков. г – Органогенез побегов в культуре *in vitro*. д-е – мультипликация побегов.

На 12-ом месяце культивирования часть каллусов переносили на питательные среды для индукции органогенеза. Формирование первых побегов наблюдали через 4-8 недель с частотой 65 % (рисунок 8 г). После переноса части побегов на среду для мультипликации, в течение 4-6 недель наблюдали образование дополнительных побегов (рисунок 8 д, е). До 80 % побегов,

перенесенных на среду для ризогенеза, формировали корни в течение 4 недель. Листовые экспланты, каллусы (3, 6 и 12 месяцев культивирования) и регенеранты (полученные из каллусов 3, 12 месяцев культивирования) были использованы для дальнейших исследований.

После переноса эксплантов *I. britannica* L. на модифицированные питательные среды активную пролиферацию каллусных клеток наблюдали через две недели после переноса. 100 % эксплантов формировали каллусные ткани. После отделения каллусных клеток от первоначального экспланта формировались твердые зеленые каллусы, которые мы культивировали в течение 12 месяцев. После субкультивирования каллусных тканей девяти месяцев культивирования на безгормональных питательных средах в течение трех месяцев наблюдали индукцию органогенеза и мультипликацию побегов (рисунок 9 а, б). После мультипликации на среде для ризогенеза отдельные побеги образовывали корни (рисунок 9 в).

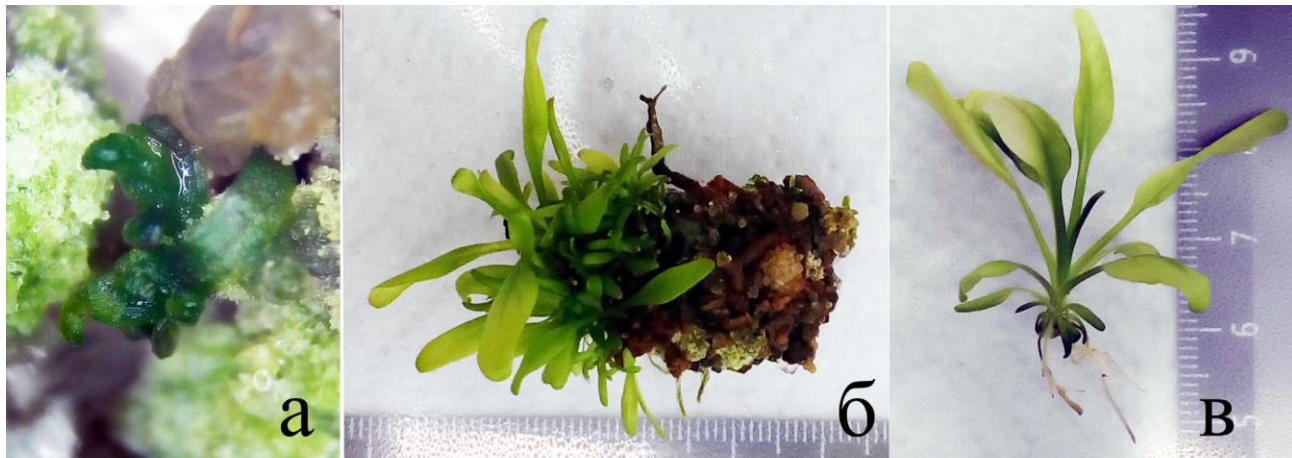


Рисунок 9 – Этапы культивирования *Inula britannica* L. *in vitro* (а) органогенез в каллусной культуре; б – мультипликация побегов; в – отделение единичных побегов и ризогенез.

ГЛАВА 4. ЭКСПРЕССИЯ β -ГЛЮКУРОНИДАЗЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

4.1. Агробактериальная трансформация и экспрессия *gusA*

На основе оценки уровня экспрессии гена *gusA* в результате скрининговых гистохимических исследований было показано, что в случае с *R. acetosa* L. и *I. britannica* L. наблюдается более высокий уровень продукции β -глюкуронидазы в случае использования вектора pBIK102iGs (рисунок 10). Кроме того, отмечено, что эффективность трансформации с использованием вектора pBIK201iGs для *R. acetosa* L. составила 15 %, для *I. britannica* L. – 20 %, а в случае с pBIK102iGs эффективность снижалась до 10 % и 15 % соответственно. Интерпретация полученных данных позволяет утверждать о более высокой силе промотора в случае использования в направленности 1' *mas* 2', в связи с чем вектор pBIK102iGs использовали для дальнейших исследований.

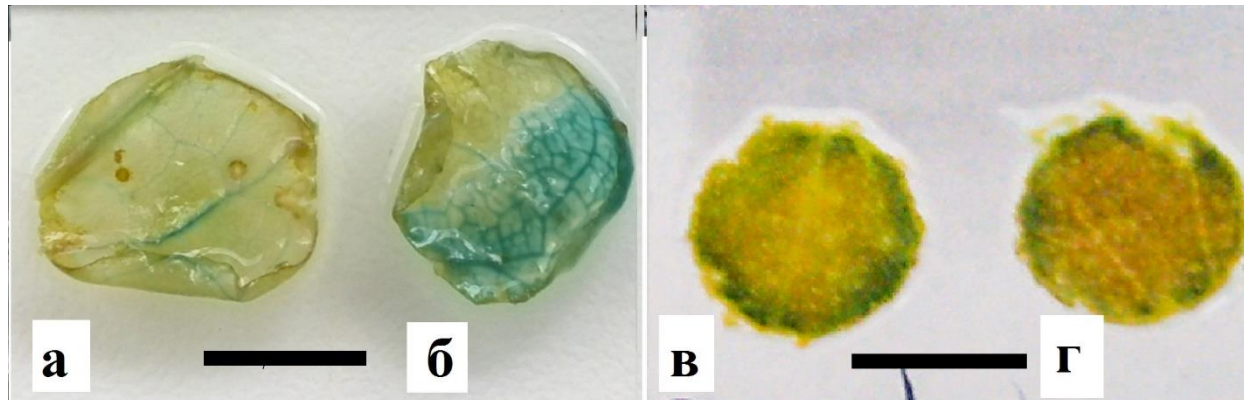


Рисунок 10 – Экспрессия гена *gusA*. а – *Inula britannica* L. pBIK201iGs; б – *Inula britannica* L. pBIK102iGs; в – *Rumex acetosa* L., pBIK102iGs; г – *Rumex acetosa* L., pBIK201iGs.

Для оценки уровня соматической изменчивости в культуре *in vitro* *R. acetosa* L. и *I. britannica* L. в качестве фенотипического маркера использовали ген *gusA*, для введения которого использовали метод агробактериальной

трансформации. Так как трансформированные клетки расщепляют X-Gluc, то в ходе анализа окрашиваются в синий цвет, что доказывает экспрессию гена *gusA*.

Для генетической трансформации использовали более 100 эксплантов *R. acetosa* L. и *I. britannica* L. Эффективность трансформации рассчитывали после селекции эксплантов на селективных средах. Для *R. acetosa* L. эффективность трансформации составила 9 %, для *I. britannica* L. – 14 %. Пролиферирующие каллусы были отделены от первоначальных эксплантов и перенесены на питательную среду без антибиотиков. Культивация каллусов проводилась в течение 1 года.

Присутствие репортерного гена анализировали с использованием ПЦР-анализа с использованием олигонуклеотидов Gus-f и Gus-r (рисунок 11).

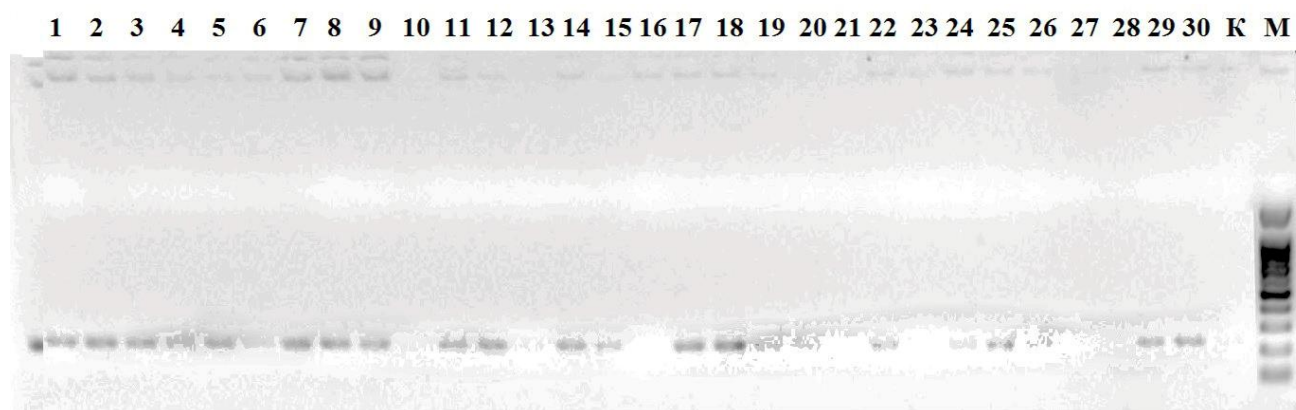


Рисунок 11 – ПЦР-скрининг присутствия гена *gusA*. 1-16 – *Inula britannica* L. 17-31 – *Rumex acetosa* L. Стадия культивирования – каллус 3 месяца (2 недели после селекции трансформированных клеток).

Для каллусных линий (P2) и регенерантов (P5) *R. acetosa* L., а также каллусных линий (I2) и регенерантов (I4) исследовали копияность экспрессионной конструкции с использованием количественной ПЦР-РВ (рисунок 12). Для расчетов и подтверждения достоверности результатов принимали данные ПЦР со значениями $E > 85 \%$ и $r^2 > 0.90$ (Bustin, 2004) (рисунок 13).

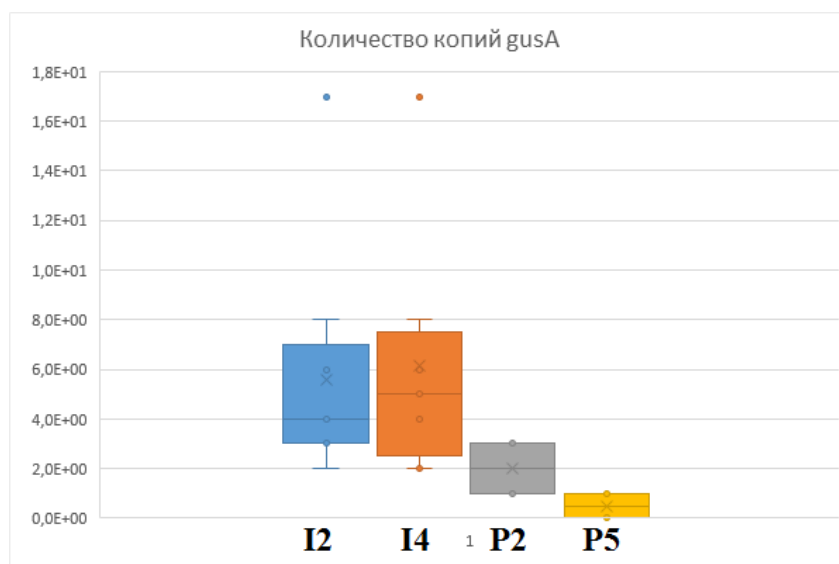


Рисунок 12 – Вариации в количестве копий *gusA*. I2 – на стадии каллуса 3 месяцев культивирования *Inula britannica L.*; I4 – на стадии регенерации 12 месяцев культивирования *Inula britannica L.*; P2 – на стадии каллуса 3 месяцев культивирования *Rumex acetosa L.*; P4 – на стадии регенерации 12 месяцев культивирования *Rumex acetosa L.*

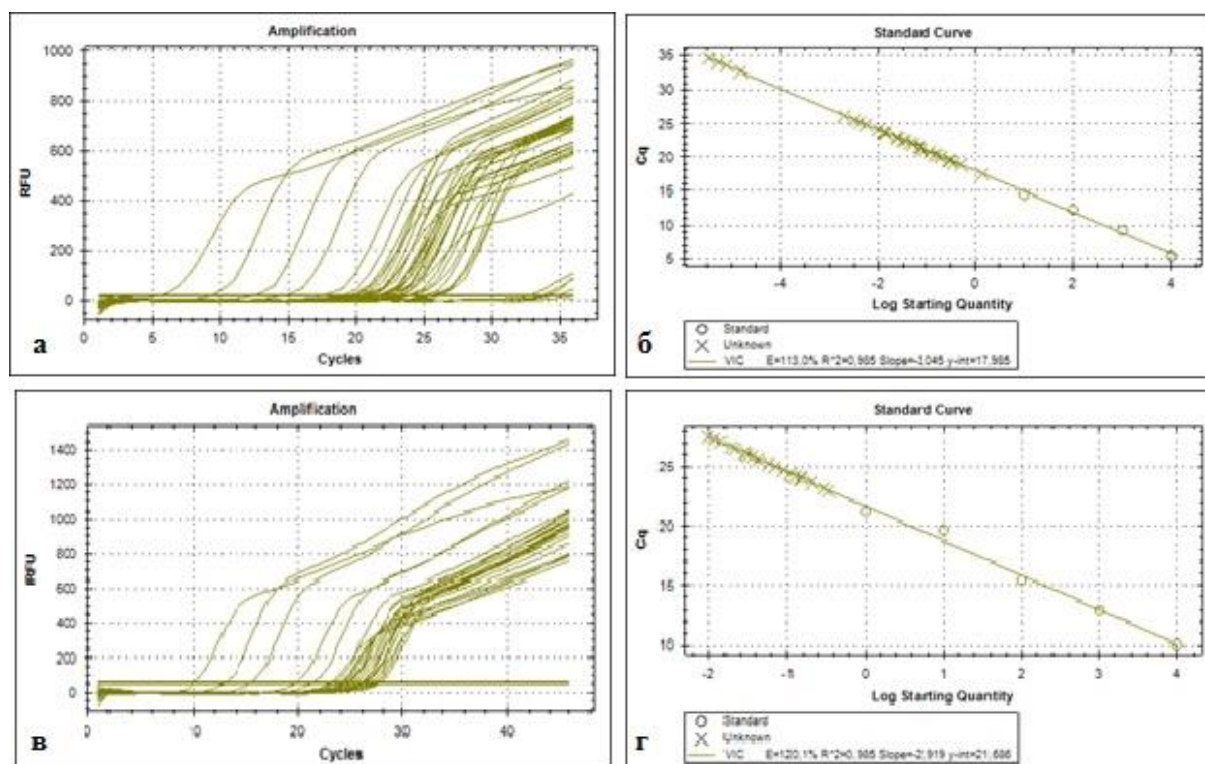


Рисунок 13 – Образцы данных флуоресценции и калибровочных кривых ПЦР-РВ при расчете количества копий вставки для трансформированных образцов *Rumex acetosa L.* (в-г) и *Inula britannica L.* (а-б).

Для *I. britannica* L. среднее значение составляло 4-5 копий на геном как на стадии культивирования каллуса, так и на стадии регенерации. Обратная ситуация наблюдалась для *R. acetosa* L., 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.

С помощью гистохимического анализа установлено, что для *R. acetosa* L. экспрессия *gusA* наблюдается в течение 3 месяцев пролиферации каллуса. На стадии шести месяцев гистохимический анализ показывает отсутствие экспрессии, тогда как в ПЦР-анализ подтверждает присутствие гена *gusA* у четырех из 20 проанализированных образцов. Через 12 месяцев культивирования каллусов регенерировавших растений экспрессия *gusA* и вставка селективного маркера отсутствует (таблица 6).

Таблица 6 – ПЦР скрининг *gusA* в культуре *in vitro* *R. acetosa* L. и *I. britannica* L.

	Эксплант	Каллус 3 мес.	Каллус 6 мес.	Каллус 9 мес.	Каллус 12 мес.	Регенерант 12 мес.
<i>R. acetosa</i> L.						
Кол-во образцов	15	15	15	15	15	15
Копии <i>gusA</i>	14	10	4	0	0	0
Экспрессия <i>gusA</i>	+	+	-	-	-	-
<i>I. britannica</i> L.						
Кол-во образцов	15	15	15	15	15	15
Копии <i>gusA</i>	15	13	14	13	13	15
Экспрессия <i>gusA</i>	+	+	+	+	+	+

Обратная ситуация отмечена для *I. britannica*. Экспрессии *gusA* отмечен на всех стадиях культивирования *in vitro* и регенерантах (рисунок 13).

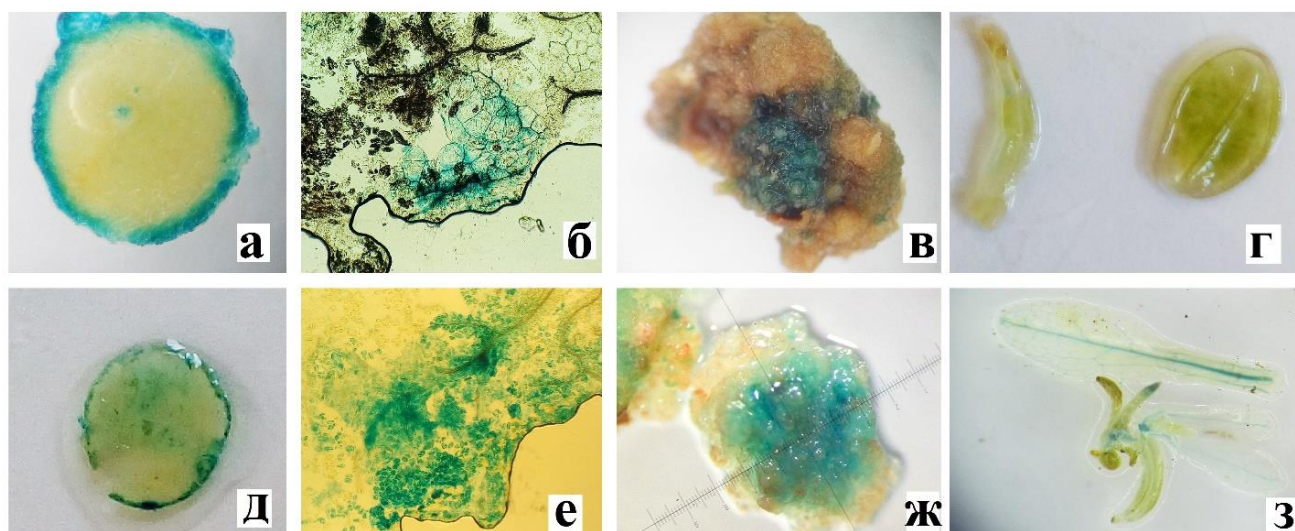


Рисунок 13 – Гистохимическое исследование *Rumex acetosa*: а – эксплант; б – дедифференцировка клеток экспланта; в – каллус 3 месяца; г – регенерант. *Inula britannica*: д – эксплант; е – дедифференцировка клеток экспланта; ж – каллус 3 месяца; з – регенерант.

Выборочный ПЦР-анализ образцов после 6 месяцев культивирования (рисунок 14) *I. britannica* L. и *R. acetosa* L. с олигонуклеотидами Gus4-f, Gus1-r, Gus2-r, Gus4-r демонстрирует амплификацию ПЦР-продукта с ожидаемыми длинами для всех проанализированных образцов *I. britannica* L., тогда как для *R. acetosa* L. – только с парой олигонуклеотидов Gus-f – Gus-r (212 п.н.), что может свидетельствовать о наличии мутаций во встроенной области Т-ДНК. Данное явление коррелирует с отсутствием экспрессии *gusA* на данной стадии для *R. acetosa* L.

Похожие результаты были получены в исследовании Škof, Luthar (2005); в данной работе авторы также отмечают снижение экспрессии гена *gusA* у регенерантов *Humulus lupulus* L. и влияние возможных мутаций в экспрессионной кассете. В большинстве же работ исследования проводят на линиях регенерантов, уже переведенных в условия *in vivo*, так как нежелательные линии отбрасываются еще на стадии каллуса и регенерации. Например, в работе Nocarova et al. (2010) изучено явление элиминации репортерного гена *gfp* у регенерантов *Solanum tuberosum* L. различного возраста, и полученных из различных линий *in vitro*. У

некоторых линий элиминация экспрессии не наблюдалась в течение длительного времени, когда у других экспрессия *gfp* пропадала уже после регенерации.

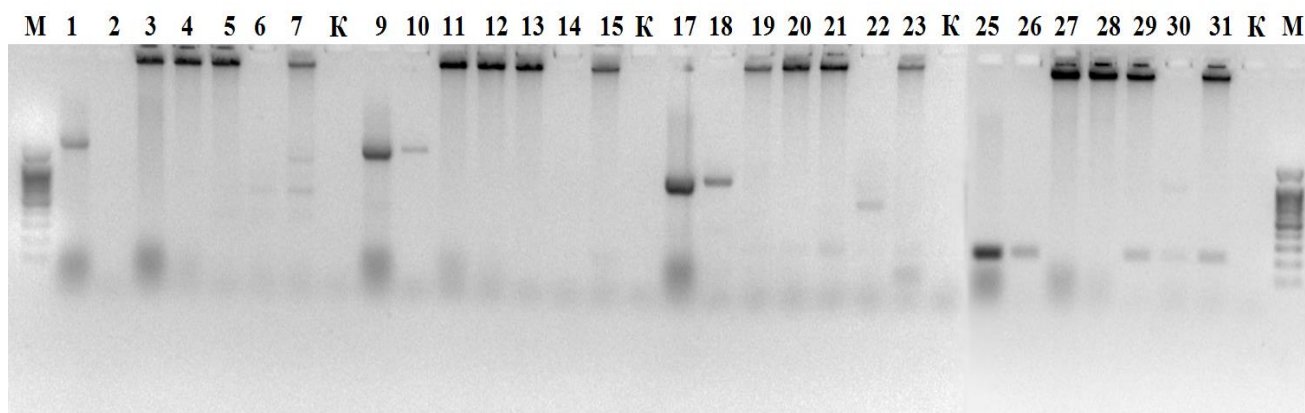


Рисунок 14 – ПЦР-скрининг образцов *Inula britannica* L. (1-2, 9-10, 17-18, 25-26) и *Rumex acetosa* L. (3-7, 11-15, 29-23, 27-31) с парами олигонуклеотидов Gus4-f – Gus1-r (1-7), Gus4-f – Gus2-r (9-15), Gus4-f – Gus4-r (17-23), Gus-f Gus-r (25-31) на стадии культивирования каллуса 6 месяцев.

Снижение или исчезновение экспрессии авторы связывают с изменчивостью на эпигенетическом уровне. Вместе с тем, уровень экспрессии репортерного гена в культуре *I. britannica* L. и его присутствие на различных стадиях культивирования остаются на постоянном уровне. В данном исследовании отмечено, что элиминация экспрессии репортерного гена у *R. acetosa* L. происходит после 6-12 месяцев культивирования. Предполагается, что подобное явление обусловлено мутациями и вариациями эпигенетического контроля на фоне проявления соматклональной изменчивости. Что касается мутаций, связанных со встраиванием Т-ДНК, то их последствия для генома растения-реципиента незначительна.

В разных исследованиях была проведена оценка мутагенеза трансформированных растений, полученных при размножении *in vitro* (Jiang et al., 2011; Sabot et al., 2011; Miyao et al., 2012; Kawakatsu et al., 2013). В этих исследованиях частота мутаций в среднем в 250 раз превышала частоту замен оснований, наблюдаемых у растений в природе. В большинстве исследований, как

предполагают авторы, поскольку процесс генетической модификации обычно включает в себя фазу тканевой или клеточной культуры и фазу регенерации, мутации, обнаруженные в растениях, по сравнению с их родительскими растениями, гораздо более вероятно, были вызваны культивированием *in vitro*, чем самой трансформацией. Было высказано предположение, что это различие обусловлено изменением соматона во время культивирования *in vitro*, где не последнюю роль играет активность ретротранспозонов (Müller et al., 1990). Тем не менее, изменчивость может наблюдаться и в результате мутаций в самой последовательности. Например, в работе Flavell (1994) высказывается гипотеза, что мутации могут возникать в связи посттранскрипционным контролем экспрессии генов, особенно с множеством копий в геноме.

Антисмысловая РНК может формироваться на накопленных, неэффективно обработанных РНК РНК-зависимой РНК-полимеразой и вызывать потерю гомологичных мРНК с последующей модификацией гомологичных генов. В связи с этим, возможные соматональные изменения в культуре *R. acetosa L.*, особенно эпигенетического характера, могут влиять на системы контроля экспрессии собственных генов, а также трансгенной конструкции на основе механизмов посттранскрипционного и транскрипционного сайленсинга.

В результате нашего исследования были получены данные о элиминации трансгена при сроке пролиферации каллуса *R. acetosa L.* более шести месяцев. Несмотря на самые распространенные версии подобной элиминации, связанные с метилированием, ген *gusA* не обнаруживался ПЦР-реакцией. Тогда как в культуре *I. britannica L.* вставка *gusA* обнаруживалась различными типами олигонуклеотидов и продукт ПЦР-реакции соответствовал ожидаемым длинам фрагментов.

ГЛАВА 5. ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

5.1. Цитогенетическая изменчивость *R. acetosa*

Количество хромосом *R. acetosa* L. в контрольных образцах составило $2n = 15$ (рисунок 15 а). В некоторых случаях присутствовали особи с некрратным увеличением количества хромосом (рисунок 15 в). У образцов, регенерировавших после 12 месяцев культивирования, в основном выявлена полиплоидия (рисунок 15 б).

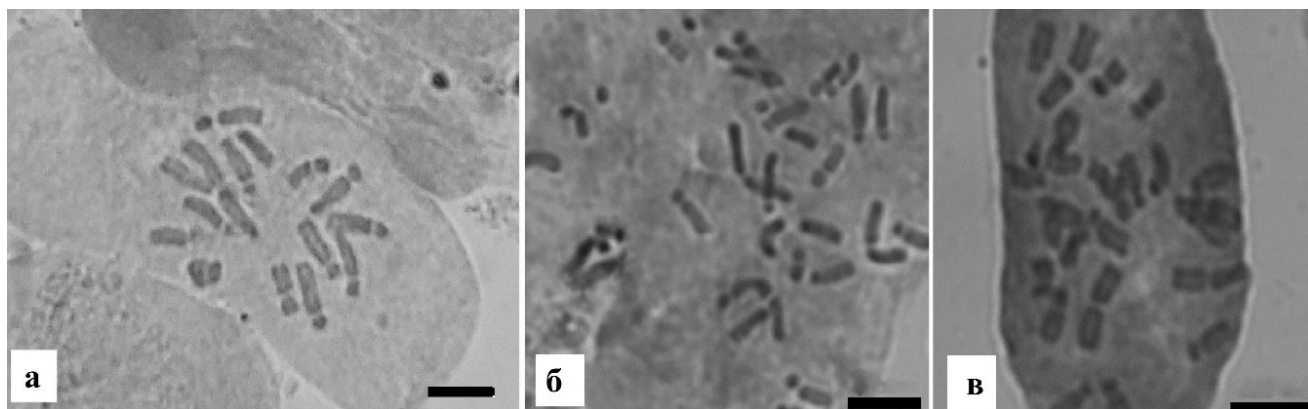


Рисунок 15 – Обнаруженные вариации в хромосомном числе *R. acetosa* L. а – $2n = 15$; б – $2n = 30$; в – $2n = 24$. Бар – 3 мкм.

Данные проточной цитометрии позволили определить относительное содержание ДНК у *R. acetosa* L. в контроле ($2C = 7,50$ пг), что соответствует литературным данным (Влока-Wandas et al., 2007). В дальнейшем использовался в качестве внутреннего стандарта для исследования линий *in vitro* (рисунок 16 а). Относительное содержание ДНК в каллусных линиях в большинстве случаев варьировало от 4,77 пг до 25,99 пг. Относительное содержание ДНК регенерантов варьировало от 6,73 пг до 14,92 пг. Средние значения относительного содержания ДНК для диплоидных и тетраплоидных линий регенерантов приведены в таблице 7.

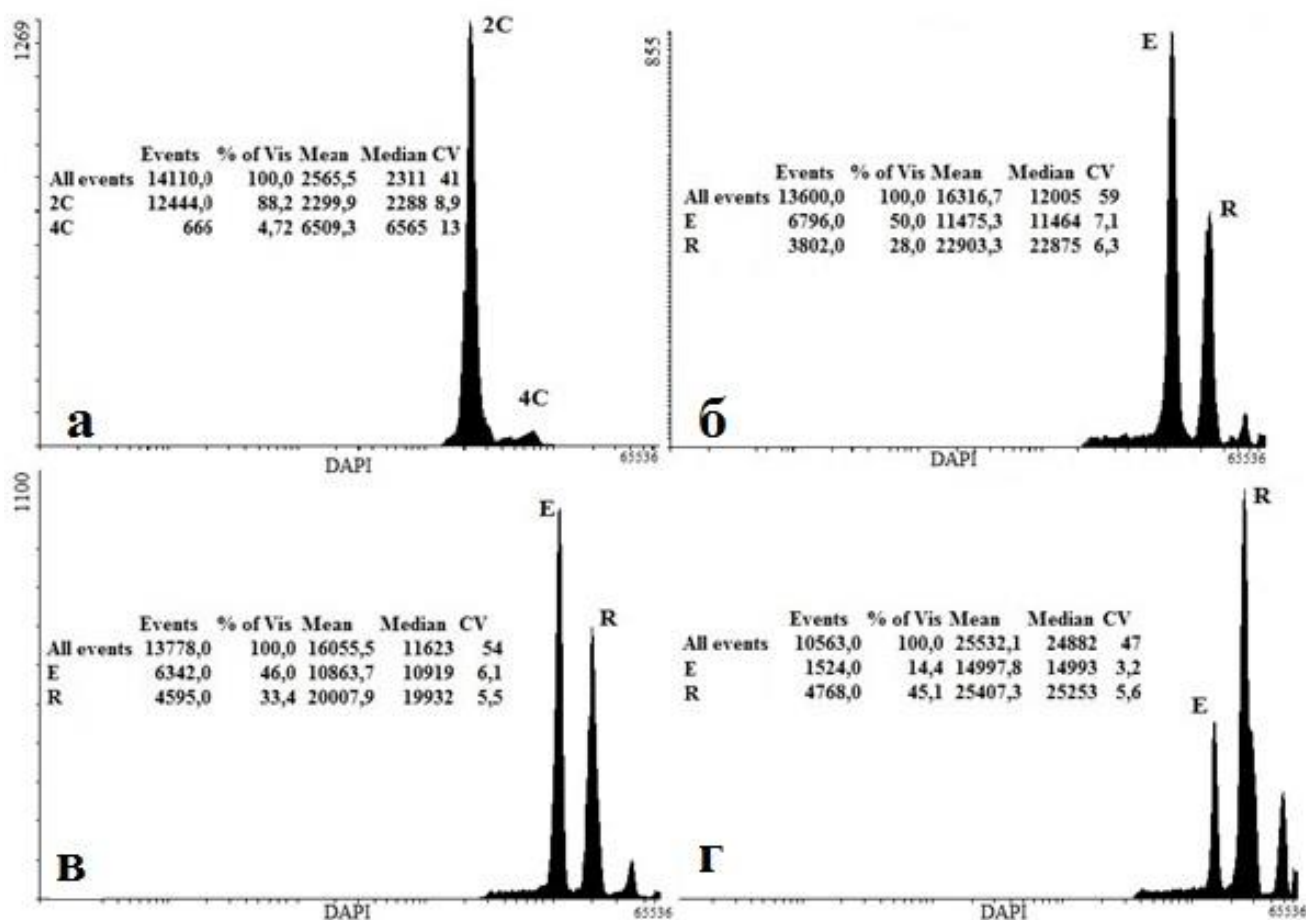


Рисунок 16 – Анализ относительного содержания ДНК регенерантов *Rumex acetosa* L. а – гистограмма в норме ($2C = 7,50$, $2n = 15$); типичные гистограмма полиплоидных регенерантов; б – $2C = 14,92$ пг; в – $2C = 13,81$ пг; г – $2C = 12,70$ пг. E – пик экспланта; R – пик регенеранта; Events – количество событий; % of Vis – процентное содержание ядер пика; Mean – среднее значение канала на гистограмме; Median – медиана пика на гистограмме; CV – коэффициент вариации пика.

Кроме того, отмечено снижение такого показателя, как размер моноплоидного генома ($1Cx$), 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 $1Cx$ снижался до $3,52$ пг при среднем содержании ДНК на одну хромосому $0,46$ пг. Каллусные

культуры 12 месяцев культивирования и более содержали в своем составе только полиплоидные клетки.

Таблица 7 – Анализ данных плоидности, количества хромосом относительно содержания ДНК регенерантов *R. acetosa* L. *in vitro*.

	#обр.	Плоидность	2n	2С, пг	1С, Мбп ¹	RDC	1Сх ± S, пг
Ех	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 Мбп (Doležel et al., 2003); RDC – среднее содержание ДНК на 1 хромосому.

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 (рисунок 17 а). Каллусная культура старше 12 месяцев культивирования отличалась преобладанием тетраплоидных ядер (рисунок 17 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 (рисунок 17 б). Показатель эндополиплоидизации снижался на стадии мультипликации до значения 0,77 (рисунок 17 в). 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.

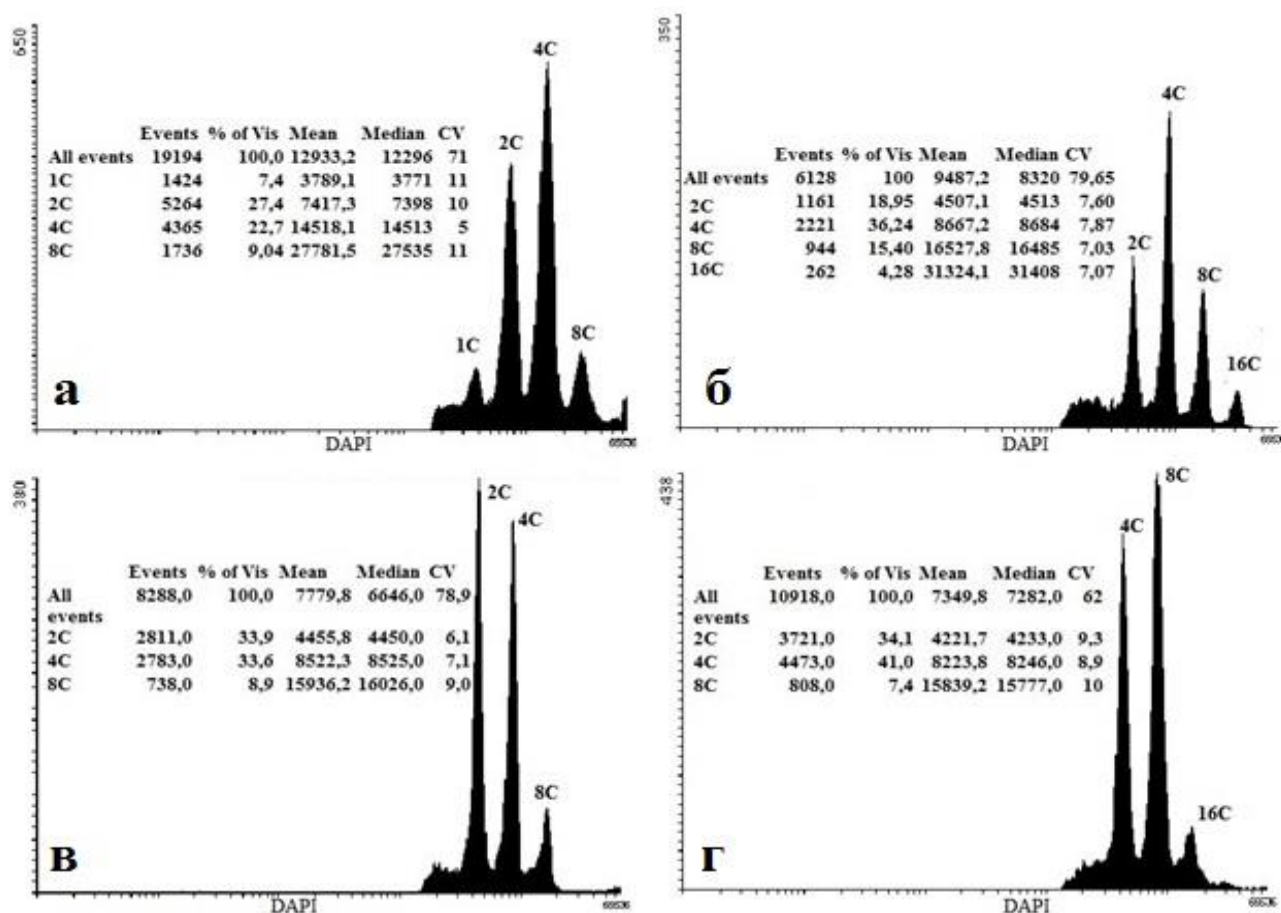


Рисунок 17 – Типичные гистограммы *Rumex acetosa L.*, демонстрирующие различные варианты эндополиплоидии: а – каллус, 3 месяца пролиферации; б – регенеранты, полученные из каллусов трех месяцев культивирования; в – регенеранты на стадии мультиплицирования; г – каллус, 12 месяцев пролиферации.

Нами были отмечены масштабные цитогенетические перестройки регенерантов *R. acetosa L.* Вариации в количестве хромосом регенерантов на ранних сроках культивирования не были отмечены. В некоторых случаях изменения относительного содержания ДНК происходили в сторону уменьшения. В связи с отсутствием изменений количества хромосом на фоне уменьшения содержания ДНК нами сделан вывод о наличии протяженных спонтанных делеций.

Нами выявлено, что при более продолжительном культивировании, преобладала полиплоидия. В большинстве своем, после года культивирования каллусов были получены тетраплоидные регенеранты. В некоторых случаях с утратой пар хромосом. Получение полиплоидных растений *R. acetosa* L. известно при искусственной гибридизации, тогда как в природе полиплоидные формы не образуются или крайне редки (Singh, 1968). Хотя подобные варианты в природе возможны, данные процессы не происходят из-за множества причин, таких как разрывы в ареалах произрастания и различной фенологии. Таким образом, при сохранении редкого вида в культуре *in vitro* возможно образование нехарактерных для эволюции генотипов. Более того, было отмечено некратное увеличение содержания ДНК полиплоидов (уменьшение моноплоидного генома), что позволяет предположить о происходящих делециях в процессе митоза (Bennetzen et al., 2005). Эти активные процессы возможно связаны со стимулированием пролиферации клеток ауксинами, ускоренными процессами митоза и накоплением делеций.

На всех стадиях культивирования было отмечено явление эндополиплоидии с максимальным значением эндополиплоидизации у каллусов *R. acetosa* L. трех месяцев культивирования, что, возможно, объясняет увеличение полиморфизма данной линии. Эндополиплоидия сохраняется в каллусах и регенерантах со сроком культивирования более года, для которых было характерно отсутствие диплоидных ядер. Схожие результаты были отмечены в культурах клеток *Mammillaria san-angelensis* Sanchez-Mejorada, где уровень плоидности клеток доходил до восьми (Palomino et al., 1999). Системная эндополиплоидия с полиплоидным рядом 2C, 4C и 8C была обнаружена в культуре *in vitro* *Spathoglottis plicata* Blume (Yang, Loh, 2004). В культурах клеток *Citrus limon* (L.) Burm. методами проточной цитометрии были выявлены цитохимерные линии, содержащие диплоидные и тетраплоидные клетки (Orbović et al., 2008). Удвоение генома было выявлено в регенерантах *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* Christenson и *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, полученных после индукции

развития боковых почек на средах с преобладанием цитокининов (Chen et al., 2009; Gomes et al., 2014).

Кроме регуляторов роста, стимулирующих эндоредупликацию клеток, уровень эндополиплоидизации зависит от различных внешних и внутренних факторов таких, как свет, температура, химический состав сред. Эндополиплоидия часто наблюдается в ответ на повреждение и может быть одним из механизмов ответа на стресс. Явление эндополиплоидии отмечено не только в пролиферирующих каллусных культурах. Ранее было показано, что высокое содержание НУК повышает уровень эндополиплоидии в соматических эмбрионах, а введение экзогенной АБК индуцирует эндополиплоидию в корнях (Lim, Loh, 2003). Кроме того, предполагается, что данное явление, как и полиплоидия – один из механизмов адаптации и микроэволюции растений (Gegas et al., 2014; Scholes, Paige, 2015).

Изучая биологическое значение эндополиплоидии, большинство исследователей склоняется к двум гипотезам: эндополиплоидия как механизм усиление метаболической активности и регуляции генов; эндополиплоидия как явление необходимое для дифференциации и специализации функций некоторых клеток, для которых нужна определенная масса ДНК для поддержания их функционального состояния (Barow, 2006). В нашем исследовании данный процесс, возможно, стимулирован стрессом и активируется с целью повышения количества аллелей генов и снижения влияния возможных мутаций, что позволяет компенсировать изменения в функционировании генетического аппарата. Предположения о роли эндополиплоидии как механизма компенсации путем увеличения генома и, соответственно, количества копий генов, их экспрессии и комбинации, отмечались и ранее для природных популяций (Scholes, 2013).

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 деление в клетке является важным процессом сокращения числа хромосом и гаплоидизации *in vivo*, что впервые было продемонстрировано на видах рода *Trillium*, где хотя и с очень низкой частотой,

диплоидное ядро может разделяться на две гомологичные хромосомные группы, которые организуют двойные веретены, ответственные за производство четырех гаплоидных клеток, что было 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* (Bennici et al., 1976) и каллусах из почек *Allium sativum* (Novak, 1974), где гаплоидизация происходила с довольно высокой частотой, и увеличивалось в зависимости от возраста культуры. 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).

Полученные данные, а также данные литературных источников позволяют утверждать, что значительное влияние на полиморфизм генома культур тканей *in vitro* оказывает длительность стадии активной пролиферации каллусных культур. Тогда как стимуляция прямого морфогенеза или эмбриогенеза позволяет снизить активность геномных перестроек, часто связанных с длительным культивированием тканей в присутствии регуляторов роста растений.

Результаты исследования изменчивости генома *R. acetosa* L. демонстрируют такие явления, как полиплоидия, анеуплоидия, эндополиплоидия, полиморфизмы размера генома в условиях культивирования растительного материала *in vitro*. Указанные механизмы в природе являются составляющей частью микроэволюции растений, для сохранения которых в геноме необходимо длительное время и смена множества поколений. В культуре клеток и тканей растений *in vitro* данные процессы протекают более активно и в более короткие сроки, что, с одной стороны, является плюсом в селекции, но, с другой стороны, подвергает сомнению использование методов культуры клеток и тканей растений для сохранения именно генетического разнообразия таксонов и свидетельствуют о

необходимости тщательного контроля генетической изменчивости, выбора типов культуры, видов эксплантов, состава питательных сред и анализа ответа различных генотипов на стресс в условиях *in vitro*.

5.2. Цитогенетическая изменчивость *I. britannica*

В результате цитологического исследования установлено, что количество хромосом *I. britannica* L. в норме равно $2n = 16$ (рисунок 18 г), что соответствует литературным данным (Пробатова, Соколовская, 1990).

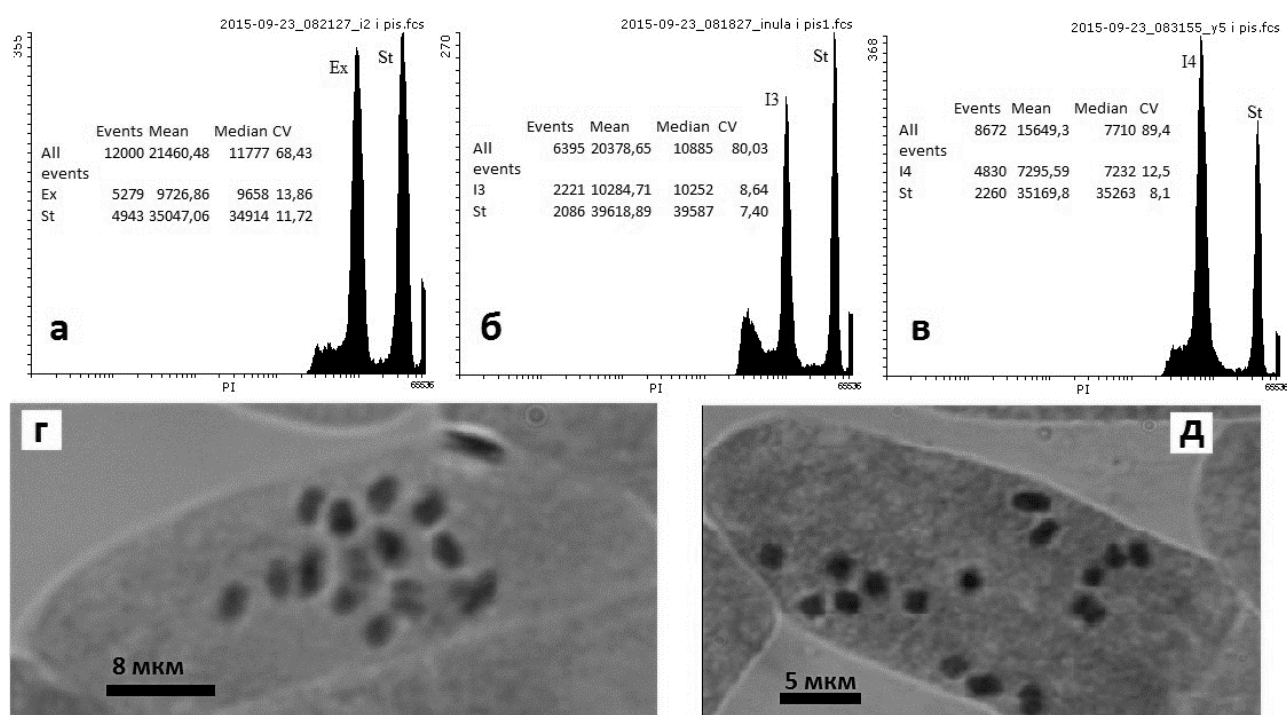


Рисунок 18 – Кариологические и цитофлюориметрические исследования регенерантов *Inula britannica* L.: а – гистограмма относительного содержания ДНК в норме, $2C = 2,60$ пг; б – гистограмма относительного содержания ДНК регенерантов из каллусной линии 12 месяцев культивирования, $2C = 2,42$ пг; в – гистограмма относительного содержания ДНК регенерантов из линии регенерантов после 12 месяцев культивирования, $2C = 1,95$ пг; г – регенерант *I. britannica* L. из линии регенерантов после 12 месяцев культивирования с утратой пары хромосом; д – хромосомный состав в норме.

В результате исследования методом проточной цитометрии относительного содержания ДНК *I. britannica* L. в норме составило $2C = 2,6$ пг (рисунок 18 а). Размер изменений размера генома каллусов после 3 и 6 месяцев культивирования являлся незначительным (рисунок 18 б). В редких случаях наблюдалось значительное уменьшение относительного содержания ДНК в I4 (регенеранты после 12 месяцев культивирования) до 1,95 пг (рисунок 18 в). 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* L. и *I. britannica* L. Отличительной особенностью регенерантов *R. acetosa* L. являлась полиплоидия и значительные изменения в относительном содержании ДНК, тогда как для регенерантов *I. britannica* L. была отмечена утрата хромосом и соответствующее снижение относительного содержания ДНК. Как таковых фенотипических изменений на стадии регенерации для *R. acetosa* L. и *I. britannica* L. отмечено не было, хотя возможные последствия при развитии, в том числе формировании цветков и генеративных органов вполне возможны. Так как для двулетних, многолетних и особенно древесных растений должно пройти продолжительное время для проявления мутаций, особенно связанных с генеративными функциями. Например, для *Elaeis guineensis* Jacq. выявлено до 5 % мутантных форм при микроклональном размножении, тогда как выявить подобные мутации возможно только через 5-6 лет. В связи с этим использование молекулярно-генетических и цитогенетических методов исследования имеет все большее значение в биотехнологии растений (Giorgetta, Castiglione, 2016).

ГЛАВА 6. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* НА ОСНОВЕ RAF-МАРКЕРОВ

6.1. Генетическая изменчивость *R. acetosa*

Были исследованы линии каллусов, трех (P2), шести (P3), 12-ти месяцев (P4) культивирования, регенеранты из каллуса 12 месяцев культивирования (P5) и контрольные линии (P1) по 12 образцов из каждой. После амплификации и электрофоретического разделения продуктов ПЦР была сформирована матрица по 106 признакам для 60 образцов на основе присутствия (1) или отсутствия (0) фрагментов равной длины.

Полиморфизм растений-доноров эксплантов составил 75,7 %. Полиморфизм в каллусной линии трех месяцев пролиферации увеличивался 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) (рисунок 19 в). Индекс Шеннона, используемый в качестве меры разнообразия внутри исследуемых групп, подтверждал данные полиморфизма. Также, 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) (рисунок 19 а, б).

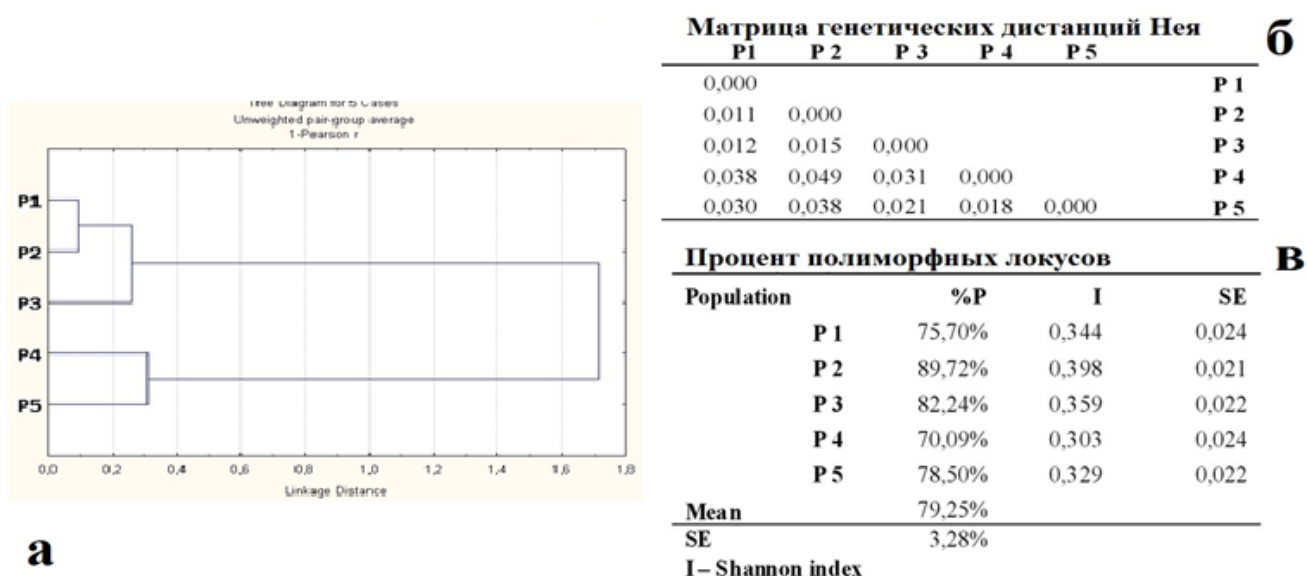


Рисунок 19 – Анализ генетического разнообразия с использованием генетических дистанций Нея (а, б); полиморфизма с индексом Шеннона (в). %P – процент полиморфных локусов; I – индекс Шеннона; SE – стандартная ошибка среднего.

AMOVA-анализ пяти линий показал, что 93 % вариаций возникли внутри линий, а 7 % – между линиями ($P < 0,001$). Среднее попарное значение Φ_{PT} (аналог F_{ST}), 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 апостериорной 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 апостериорной вероятности было получено для числа групп $K = 5$ (рисунок 20 б).

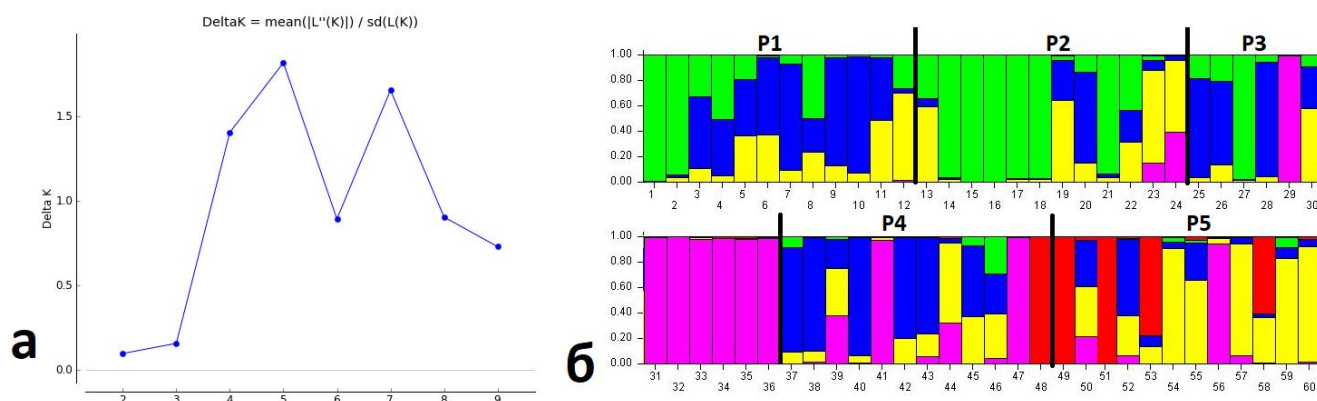


Рисунок 20 – Выходные данные кластерного анализа в программе Structure. а – данные расчета DeltaK; б – кластеризация при $K = 5$.

Соматональная изменчивость – важный генетический фактор развития культур клеток и тканей растений *in vitro*. Данное явление наблюдают практически при любом типе культивирования, особенно при длительной пролиферации каллуса. Согласно Р.Г. Бутенко (1999), генетическая гетерогенность популяций клеток, является необходимым условием ее существования, основой адаптационных возможностей популяции и является важным фактором гомеостаза. Зачастую возможности растения к дедифференцировки клеток и стабильное размножение в культуре *in vitro* зависит не только от вида, но и от генотипа растений. Анализ соматональной изменчивости заслуживает особого внимания при использовании метода культуры тканей для сохранения биоразнообразия, микроразмножения, культивирования лекарственных растений и селекции.

Ранее методы фрагментного анализа такие, как RAF, DAF, ISSR использовались в основном для анализа полиморфизма природных популяций. В биотехнологии растений данные методы нашли активное применение для исследования соматональной изменчивости в культуре *in vitro*. В некоторых работах анализируются процессы генетических изменений лишь в каллусной культуре, при этом авторы отмечают значительные изменения в геноме в процессе пролиферации каллуса, но не учитывают полиморфизмы растений-доноров и регенерантов (Ghorbanpoura, Khadivi-Khubb, 2015). Генетическая и

эпигенетическая изменчивость может возникать не только в длительно пролиферирующих каллусных культурах, но и при соматическом эмбриогенезе, где внутривидовые вариации и эпигенетические различия обусловлены ответом на стресс. Зачастую уровень изменчивости в культуре *in vitro* зависит от состава регуляторов роста, типа экспланта или генотипа растительного объекта (Bairu et al., 2011). В нашем случае результаты анализа выборки методом генетических дистанций Нея и расчета полиморфизма линий (с помощью индекса Шеннона) показали, что длительное культивирование клеток на питательной среде с преобладанием ауксинов вызывает увеличение полиморфизма линий каллусов и регенерантов в культуре *R. acetosa L.* К моменту дифференциации и регенерации полиморфизм генов восстанавливается к начальному уровню. На данных этапах наблюдается снижение генетического полиморфизма, вследствие, как предполагается, терминации клеток с летальными мутациями.

Подобное явление было описано в работе Ву Дык Куанга, на примере популяций клеток *Zea mays L.* в которой через 12 месяцев культивирования популяции клеток оказались практически идентичными исходной популяции по асинхронности и генетической гетерогенности генотипов (Ву Дык Куанг, Шамина, 1983). По-видимому, через 4-6 месяцев пролиферации каллуса происходит отсеивание клеток с летальными мутациями.

Противоположную ситуацию мы наблюдали при расчете генетических дистанций между линиями *Rumex in vitro*. Несмотря на восстановление полиморфизма генов, после культивирования на средах с преобладанием цитокининов, генетические дистанции между эксплантами и регенерантами имели тенденцию к увеличению, что ведет к образованию растений с генотипом, отличным от растения-донора.

Построение дендрограммы на основе данных генетических дистанций Нея позволяет наглядно представить отличия растений-доноров эксплантов и регенерантов. В данном случае регенеранты и каллусы 12 месяцев культивирования отходят в отдельную кладу, что свидетельствует о возникновении значительной генетической неоднородности между ними и

эксплантами. Оценивая генетические группы, полученные в Structure, отмечена высокая генетическая гетерогенность и смешанная генетическая природа. Схожую ситуацию внутри линий наглядно демонстрирует AMOVA-анализ. Несмотря на то, что уровень молекулярных вариаций между линиями каллусных культур имеет сходные значения, данные для растений-доноров и регенерантов, а также каллусов и регенерантов заметно различаются. Приведенные статистические данные свидетельствуют о значительной изменчивости как образцов внутри каллусных линий и регенерантов, так и между ними на всех стадиях культивирования *in vitro*. Проводя параллели изменчивости экспрессии репортерного гена с уровнем соматической изменчивости, наблюдается зависимость между снижением экспрессии и увеличением генетического полиморфизма.

6.2. Генетическая изменчивость *I. britannica*

Анализ генетического полиморфизма *I. britannica* L. проводили аналогично *R. acetosa* L. Были исследованы линии каллусов шести (I2) и 12-ти месяцев (I3) культивирования, регенеранты из каллуса 12 месяцев культивирования (I4) и контрольные линии (I1) по 12 образцов из каждой. После проведения электрофоретического разделения амплифицированных фрагментов с RAF-маркерами для *I. britannica* L. было получено 64 фрагмента для каждого образца.

Анализ выборки методом генетических дистанций Нея и расчета полиморфизма линий (с помощью индекса Шеннона) по всем 64 генетическим признакам показал, что длительное культивирование клеток на питательных средах в присутствии ауксинов и цитокининов вызывает увеличение полиморфизма соматических клонов. 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 (таблица 8).

Таблица 8 – Процентное содержание полиморфных локусов *I. britannica* L. на различных стадиях культивирования *in vitro*.

Линия	%P	I	SE
I1	75,00 %	0,398	0,032
I2	85,94 %	0,421	0,027
I3	78,13 %	0,340	0,027
I4	75,00 %	0,295	0,029
Среднее	78,52 %	–	–
SE	2,58 %	–	–

Примечание: %P – процент полиморфных локусов; I – индекс Шеннона; SE – стандартная ошибка;

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 (рисунок 21).

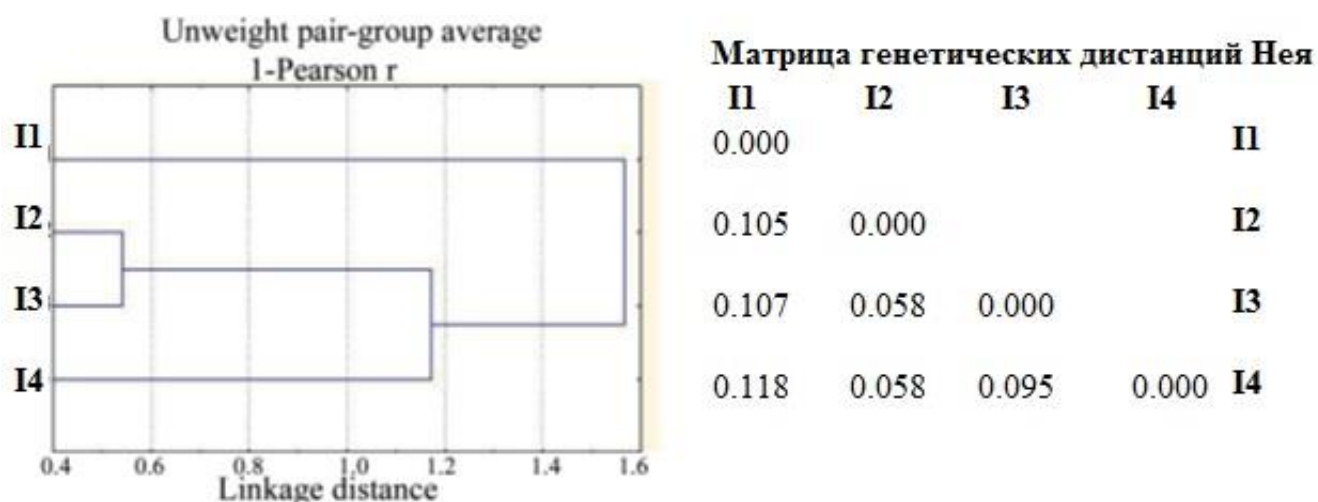


Рисунок 21 – Статистическая обработка данных фрагментного анализа. Дендрограмма UPGMA на основе матрицы генетических дистанций Нея.

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). Несмотря на тот факт, что внутри таких линий *in vitro* увеличиваются генетические дистанции, полиморфизм генов в каллусных линиях снижается. AMOVA косвенно подтверждает полученные данные. Примечательно, что при анализе молекулярных вариаций минимальный показатель генетической дифференциации PhiPT мы наблюдали между контрольной линией и каллусной линией после 6 месяцев культивирования. Значения полиморфизма и индекса Шеннона позволяют утверждать, что уже на стадии пролиферации каллуса наблюдается увеличение генетических дистанций. Несмотря на восстановление полиморфизма в линии регенерантов, матрица генетических дистанций Нея показывает различие в генетических дистанциях между линиями. Обработка данных матрицы в UPGMA-тесте с построением UPGMA-дендрограммы разбивает линии на 3 основных кластера, причем максимальная генетическая дистанция наблюдается между контрольными линиями и линиями регенерантов (Скапцов и др., 2015). Несмотря на результаты анализа генетических дистанций, генетическая дифференциация при анализе методом Байеса с использованием программного обеспечения Structure достоверно не установлена.

В результате исследований культур клеток и тканей *I. britannica* L. *in vitro* методами проточной цитометрии и фрагментного анализа выявлено, что на ранних стадиях (6 месяцев) изменения в относительного содержания ДНК достоверно не фиксируются, тогда как RAF-анализ показал генетическую неоднородность линии регенерантов и увеличение генетической дистанции между регенерантами и контрольными линиями. На более поздних стадиях (12 месяцев) соматональная изменчивость выявляется методом проточной цитометрии в виде

редукции генома. Данные проточной цитометрии показали вариации в относительном содержании ДНК *I. britannica* L. и в некоторых случаях это было подтверждено исследованием хромосом, где в основном была отмечена утрата пары хромосом.

Во многих работах отмечено, что уровень соматической изменчивости является видоспецифичным показателем. Разные геномы по-разному реагируют на стресс, что указывает на то, что соматическая изменчивость не только видоспецифична, но и варьирует в зависимости от генотипа внутри одного вида. Так, в работе Lee, Phillips (1997) на культурах каллуса *Fragaria vesca* L. показано, что генотип и тип экспланта сильно влияет на проявление соматической изменчивости.

Зачастую данные молекулярно-генетических исследований и цитогенетических исследований могут противоречить друг другу. Подобное явление было отмечено для *Viola uliginosa* Besser, где был показан низкий полиморфизм AFLP маркеров, тогда как данные проточной цитометрии выявили тетраплоидные формы регенерантов (Slazak et al., 2015), что, видимо, связано с возможностями и ограничениями методов. В нашей работе молекулярно-генетические вариации в культуре *R. acetosa* L. значительно превышали значения, полученные для *I. britannica* L. Цитогенетическая изменчивость показала похожую зависимость. Хотя для *I. britannica* L. была выявлена цитогенетическая изменчивость, некоторые методы обработки молекулярно-генетических данных не выявили разнородность исследуемых групп.

Все выше описанные факты подтверждают необходимость исследования вариаций признаков у видов растений в сохраняемых коллекциях на различных уровнях организации растительного организма. Таким образом, для отслеживания явления соматической изменчивости необходимо использовать комплексные подходы, включающие молекулярно-генетические методы, хромосомный анализ, а также проточную цитометрию растений. Использование этих методов в комплексе позволит анализировать как изменения кариотипа и генотипа, так и цитотипа культивируемых растений.

ГЛАВА 7. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *R. ACETOSA* НА ОСНОВЕ ДАННЫХ NGS-СЕКВЕНИРОВАНИЯ

7.1. NGS-секвенирование случайных фрагментов ДНК

Показанный ранее высокий полиморфизм RAF-маркеров 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 секвенирования было получено 29550 последовательностей ДНК с общей длиной 6640138 п.н. После сборки, удаления повторов и нормализации было получено 222 последовательности ДНК.

Собранные по схожести последовательности были кластеризованы с использованием утилиты Geneious Tree Builder и в дальнейшем анализировались по отдельности с помощью утилит для выравнивания ClustralW и поиска полиморфизмов Geneious SNP Finder, а также аннотировались с использованием алгоритмов BLAST на основе баз данных нуклеотидов (nr/nt).

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 (таблица 9), мутации в которых обнаружены только у одного (рисунок 22).

Таблица 9 – Ближайшие гомологи к расшифрованным последовательностям ДНК, амплифицированным с использованием RAF-маркеров.

Аннотация	Покрытие	e-value	Идентичность	№, NCBI
<i>Pyrus pyrifolia</i> genes for F-box proteins, S ribonuclease, complete cds, haplotype: S4	91 %	2e-17	70 %	AB545981.1
<i>Silene latifolia</i> subsp. <i>alba</i> SIAP3Y gene for flower buds-specific protein SIAP3Y, complete cds, strain: K	85 %	0.031	73 %	AB771927.1
<i>Eriogonum leptocladon</i> isolate U2509 trnM-trnS intergenic spacer, partial sequence; tRNA-Gly (trnG) gene, complete sequence; and photosystem II protein Z (<i>ycf9</i>) gene, complete cds; chloroplast	89 %	2e-81	88 %	FJ204289.1



Рисунок 22 – Гомологичный участок последовательности, полученной после RAF-анализа, к депонированной в NCBI последовательности «*Pyrus pyrifolia* genes for F-box proteins, S ribonuclease, complete cds, haplotype: S4».

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 (рисунок 23).

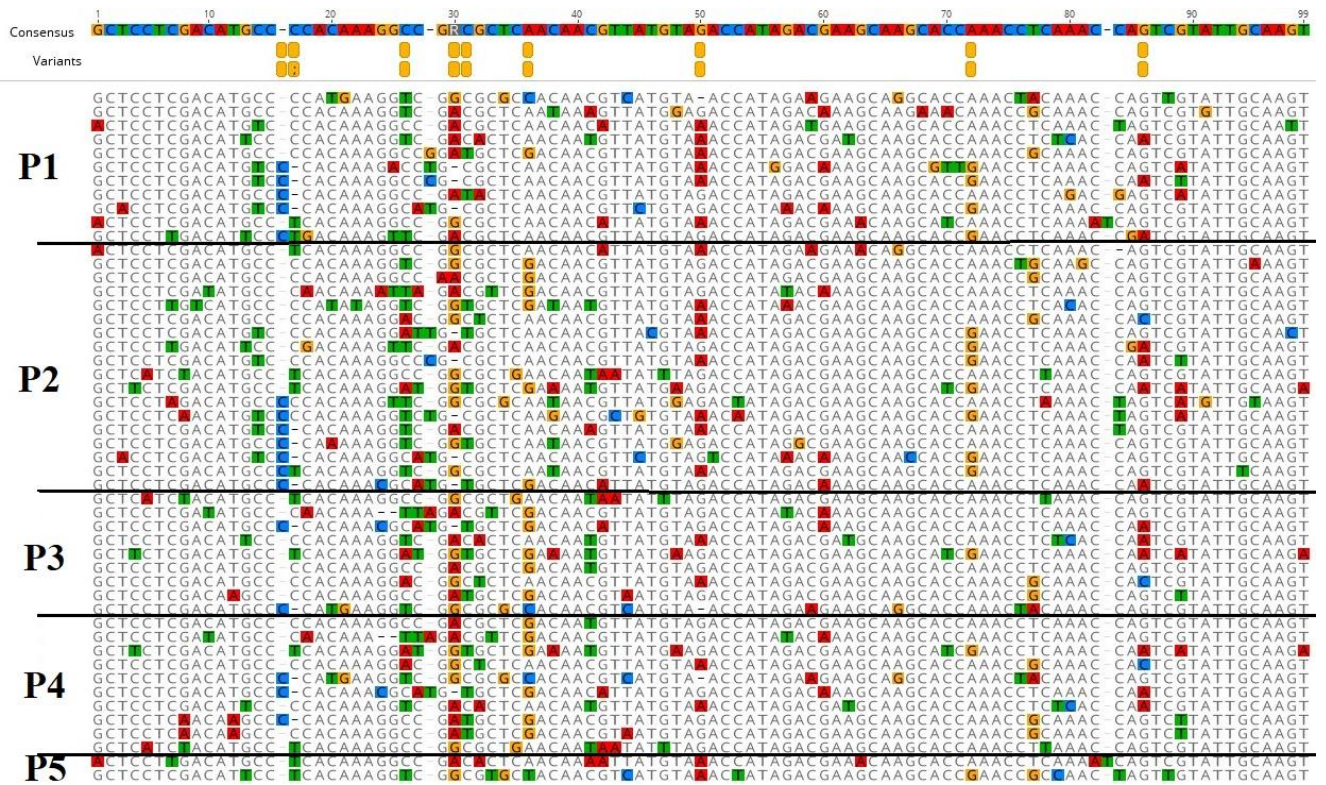


Рисунок 23 – Участок полиморфной последовательности ДНК, полученной с использованием NGS-секвенирования.

В данном случае для контрольной линии (P1) выявлено 48 случайных замен в 11 вариантах ДНК последовательностей, среди которых 9 охарактеризованы как однонуклеотидные полиморфизмы (SNP). У каллусной линии трех месяцев культивирования (P2) обнаружено 46 случайных мутаций и 12 SNP в 18 вариантах ДНК последовательностей. 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.

Завершающим этапом работы был анализ «синтении» у образцов со стадий P1 – P5. Для построения кладограммы на основе данных NGS-секвенирования фрагментов RAF-анализа, использовали программное обеспечение для полногеномного выравнивания и построения синтентных 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 полногеномные 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). 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 (рисунок 24).

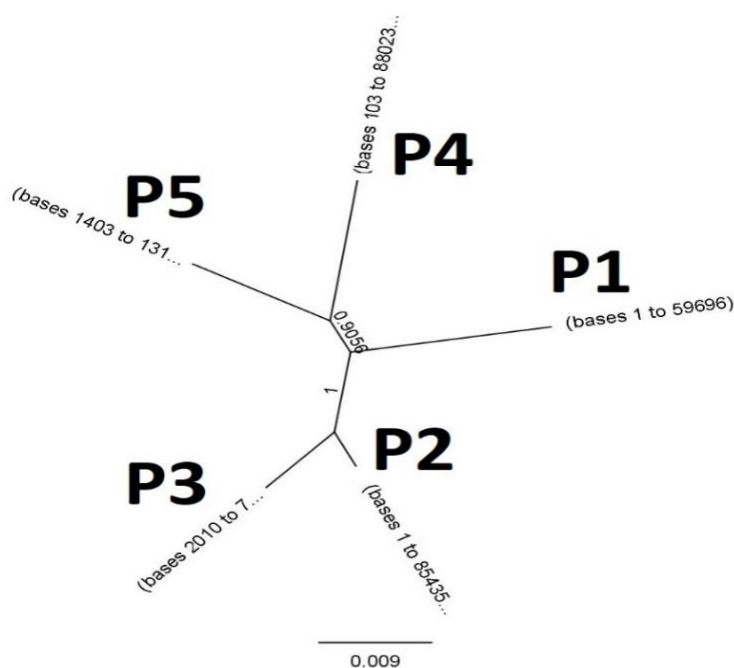


Рисунок 24 – Кладограмма на основе полногеномного выравнивания данных NGS-секвенирования фрагментов RAF-анализа образцов со стадий трех месяцев культивирования каллуса (P2), шести месяцев (P3), 12 месяцев (P4) и регенерантов (P5) относительно первоначальных эксплантов (P1).

Зачастую методы фрагментного анализа с короткими олигонуклеотидами не обладают достаточной повторяемостью между экспериментами, что приводит к сложности в интерпретации данных. Нами было показано в результате секвенирования фрагментов RAF, что данные маркеры с высокой долей специфичности для подобных ДНК маркеров разделяют случайные мутации и SNP. Данные выводы позволяют использовать RAF-маркеры для экспресс-диагностики генетических полиморфизмов в культуре *in vitro* и оценки влияния соматической изменчивости на генотипы исследуемых видов растений.

7.2. NGS-секвенирование фрагментов MAFLP-анализа

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 (таблица 10). Результаты BLAST показывают наличие гомологичных фрагментов вовлеченных во множество процессов, таких как дифференциацию, фотосинтез, процессы клеточного дыхания, транспорт, генов F- и U- боксов, генов, вовлеченных в реакцию растений на стресс, как аквапорины и олигопептидаз. Условия культивирования *in vitro* являются чрезвычайно стрессовыми для растительных клеток и могут инициировать высоко мутагенные процессы как в последовательностях ДНК, так и в системах контроля экспрессии генов (Kaeppler, Phillips, 1996).

Таблица 10 – Аннотации к последовательностям с максимальными уровнями гомологичности с депонированными в NCBI GenBank.

P1 (Экспланты)	P2 (Каллус 3 месяца культивирования)	P3 (Каллус 6 месяца культивирования)	P4 (Каллус 12 месяца культивирования)	P5 (Регенерант)
KC310866.1 <i>Rumex acetosa</i> clone CL11 retrotransposon Tat, complete sequence	XM_015314618. <i>Solanum tuberosum</i> cytochrome c biogenesis CcmF C-	KC310865.1 <i>Rumex acetosa</i> clone CL7 retrotransposon Maximus/SIRE	AB115755.1 <i>Rheum franzenbachii</i> gene for 18S rRNA	KU569493.1 <i>Maesa montana</i> 18S ribosomal RNA gene
AB115757.1 <i>Rheum kialense</i> gene for 18S rRNA	KU569493.1 <i>Maesa montana</i> 18S ribosomal RNA gene	KC310866.1 <i>Rumex acetosa</i> clone CL11 retrotransposon Tat	XM_017770870.1 <i>Gossypium arboreum</i> bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase 2	XM_015525586.1 <i>Citrus sinensis</i> RNA-directed DNA polymerase
AJ245480.1 <i>Brassica napus</i> subsp. <i>napus</i> AtPP-A14 gene	KC310864.1 <i>Rumex acetosa</i> clone CL5 retrotransposon Maximus/SIRE	KC310865.1 <i>Rumex acetosa</i> clone CL7 retrotransposon Maximus/SIRE	AB909378.1 <i>Fagopyrum esculentum</i> FeGT2 mRNA for UDP-glycose: glycosyltransferase	XM_020551330.1 <i>Zea mays</i> putative eukaryotic translation initiation factor 3E
KC310864.1 <i>Rumex acetosa</i> clone CL5 retrotransposon Maximus/SIRE	AJ634496.1 <i>Rumex acetosa</i> RAE180 satellite	KC310863.1 <i>Rumex acetosa</i> clone CL2 retrotransposon Maximus/SIRE	AY291320.1 <i>Rumex acetosa</i> Y chromosome-specific genomic sequence	gi 460768783 gb KC310866.1 <i>Rumex acetosa</i> clone CL11 retrotransposon Tat,
XR_002287630.1 <i>Sesamum indicum</i> probable serine/threonine-protein kinase abkC	XM_016101317.1 <i>Arachis duranensis</i> RNA-directed DNA polymerase	AB032561.1 <i>Rumex acetosa</i> DNA, male-enriched repetitive sequence RAE180	FJ402918.1 <i>Glycine tomentella</i> retrotransposon gtt1-7714-re-5	gi 8978314 dbj AB032560.1 <i>Rumex acetosa</i> DNA, male-enriched repetitive sequence RAE180-4
XM_019577213.1 <i>Lupinus angustifolius</i> protein LIGHT-DEPENDENT SHORT HYPOCOTYLS	GU109171.1 <i>Helianthus paradoxus</i> isolate 37cpaf4 retrotransposon Ty1/copia-like	XM_016027099.1 <i>Ziziphus jujuba</i> serine/threonine-protein kinase HT1-like	XM_018953230.1 <i>Juglans regia</i> uncharacterized LOC108981967	AJ634496.1 <i>Rumex acetosa</i> RAE180 satellite, clone RAE180-69b
AY520575.1 <i>Rumex acetosa</i> male-enriched Y-9 marker sequence	AY520575.1 <i>Rumex acetosa</i> male-enriched Y-9 marker	XM_015790713.1 <i>Oryza sativa</i> Japonica Group DELLA protein RGL1-like	EF429083.1 <i>Pinus radiata</i> xyloglucan endotransglycosylase 1	XM_017756262.1 <i>Gossypium arboreum</i> dicarboxylate transporter 1

XM_020391342.1 Asparagus officinalis lycopene beta cyclase	XM_010258593.2 Nelumbo nucifera scarecrow-like protein 9	XM_012212453.2 Jatropha curcas F-box protein	AJ639735.1 Rumex acetosa RAE730 satellite DNA, clone RAE730	KC310870.1 Rumex acetosa clone CL35 transposon Mutator
XM_019570884.1 Lupinus angustifolius U-box domain-containing protein 8-like	XM_011082127.2 Sesamum indicum dicarboxylate transporter 1	AM397924.1 Rumex suffruticosus RAE180 satellite DNA	XM_013812366.1 Brassica napus acyl-[acyl-carrier- protein] desaturase 3, chloroplastic-like	KC310866.1 Rumex acetosa clone CL11 retrotransposon Tat
JX455090.1 Beta vulgaris subsp. vulgaris clone Bingo4 retrotransposon Ty3-gypsy	KC310871.1 Rumex acetosa clone CL41 retrotransposon Athila	AY291320.1 Rumex acetosa Y chromosome- specific genomic sequence	XM_013812366.1 Brassica napus acyl-[acyl-carrier- protein] desaturase 3, chloroplastic-like	AB545981.1 Pyrus pyrifolia genes for F-box proteins, S ribonuclease, complete cds, haplotype: S4
XM_009136700.2 Brassica rapa BAG family molecular chaperone regulator 7-like	AB545981.1 Pyrus pyrifolia genes for F-box proteins, S ribonuclease	DQ003307.1 Rumex acetosa clone DOP-20 repetitive sequence	XM_017371320.1: Daucus carota subsp. sativus 8- hydroxygeraniol dehydrogenase-like	XM_010072152.2 Eucalyptus grandis probable galacturonosyltransferase- like 1

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 ВAG, 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. Однако их выявление позволяет косвенно предположить о участии данных генов в метаболических процессах, происходящих в культуре клеток и тканей *R. acetosa* L. Кроме того, 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.

Среди последовательностей ДНК значительное количество гомологично 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* L. 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, кроме гомологичной последовательности к *ggt1-7714-re-5* элемента *Glycine tomentella* Hayata, относящегося к семейству *Gypsy*. 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 некоторых работах предполагается, что последующее половое размножение регенерантов

стабилизирует активность ретротранспозонов (Orłowska et al., 2016). Тем не менее, частота транспозиции может быть различной у разных типов ретротранспозонов. Подобные явления установлены в различных работах для *Gypsy*, *Copia* и *LINE* транспозонов (Wessler, 1996; Evrensel et al., 2001; Temel, Gozukirmiz, 2013). Например, уровни транспозиции *BARE1* ретротранспозона (*Copia*) не различаются у соматклонов. Следовательно, вариации геномов клеток каллусов посредством движения ретротранспозонов могут способствовать диверсификации генотипа и фенотипа растений (Yilmaz, Gozukirmizi, 2017). Как известно, изменчивость в частоте транспозиции может внести значительный вклад в генотип растения и приводить к фенотипическим изменениям. Ранее выявлено, что цвет семян и цветков *Ipomoea purpurea* (L.) Roth., *Brassica rapa* L., изменения междоузлий *Oryza sativa* L. и цвета плодов *Vitis vinifera* L. опосредованы вставками ретроэлементов (Clegg, Durbin, 2000; Kobayashi et al., 2004; Park et al., 2007; Hong et al., 2012; Li et al., 2012). В нашем исследовании изменчивость в метилировании ретротранспозонов выявлена именно при длительном культивировании пролиферирующих каллусов, тогда как у каллусных линий трех месяцев культивирования и растениях донорах ретротранспозоны семейств *Gypsy* и *Copia* оставались метилированы или частично метилированы.

Для анализа «синтении» у образцов со стадий P1 – P5 использовалось программное обеспечение для полногеномного выравнивания LASTZ (Schwartz et al., 2003). Для выполнения данного анализа последовательности объединяли с использованием утилит Geneious 11.1.5. 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). Полногеномное выравнивание производили относительно контрольного образца (рисунок 25). В результате анализа установлено, что данные полногеномного выравнивания несколько отличаются от данных фрагментного анализа, так как в данном случае исследовался фактор метилирования, а не генетической изменчивости. На основе различий в составе последовательностей можно говорить о разнице в общем метилировании.

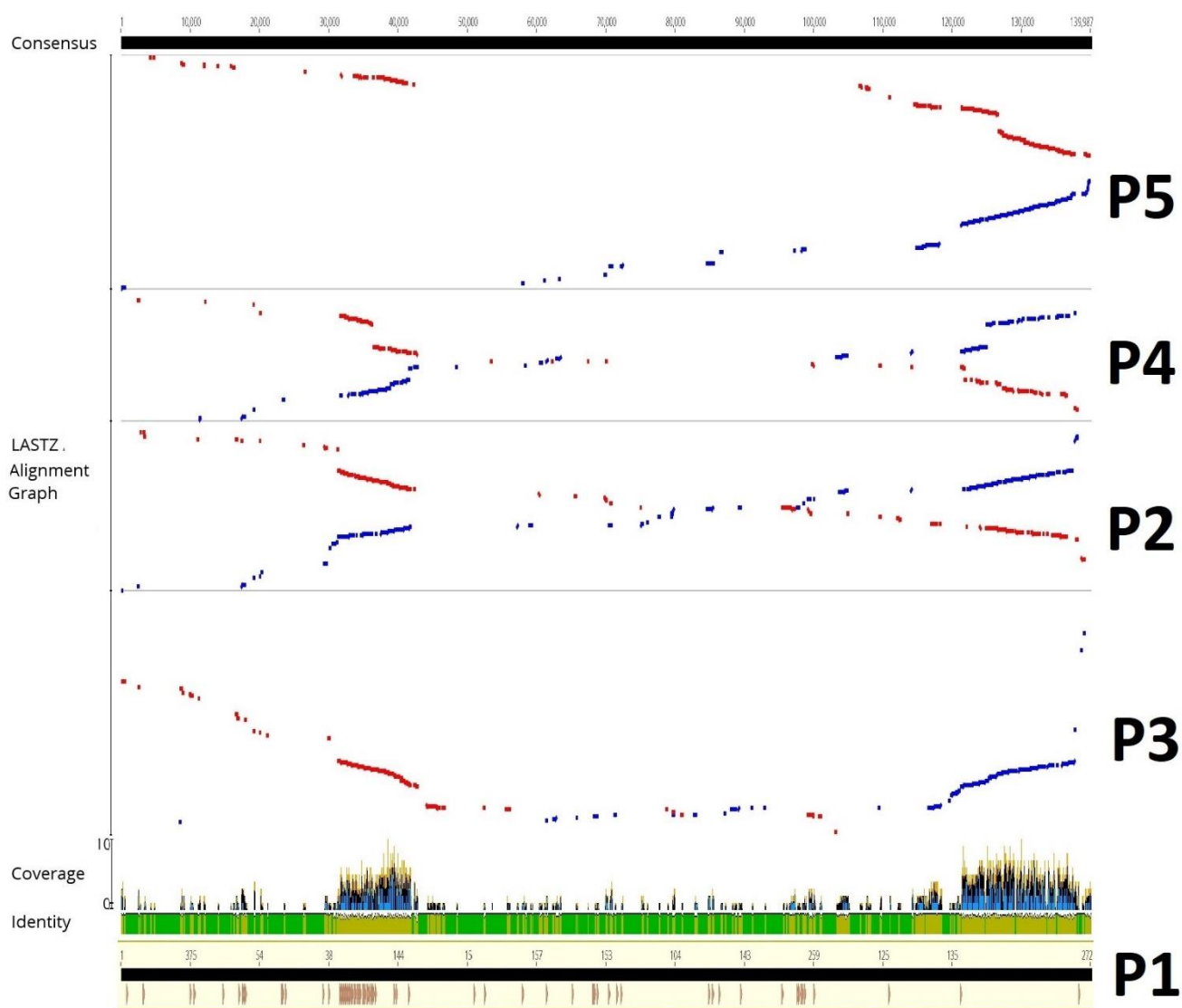


Рисунок 25 – График полногеномного выравнивания с использованием данных NGS-секвенирования фрагментов RAF-анализа образцов со стадий трех месяцев культивирования каллуса (P2), шести месяцев (P3), 12 месяцев (P4) и регенерантов полученных после 12 месяцев культивирования каллуса (P5) относительно первоначальных эксплантов (P1).

Максимальные различия по данным полногеномного выравнивания установлены между образцами со стадии P1 и P2, с показателем идентичности (Identical Sites) 25,527 сайтов на уровне 84,7 % при общем покрытии (Ref-Seq Coverage) 21,5 %. Образцы со стадий P3-P4 имели показатели идентичности в районе 87 % (таблица 11). Тогда как максимальная идентичность наблюдалась между стадиями P1 и P5. На основе полученных результатов возможно предположить о изменении общего метилирования после введения в культуру и

пролиферации каллуса и некотором восстановлении данного показателя на стадии регенерации, что отчасти соответствует данным об изменении метилирования ретротранспозонов.

Таблица 11 – Данные полногеномного выравнивания программы LASTZ относительно контрольных образцов со стадии P1.

	Identical Sites	Pairwise % Identity:	Ref-Seq Coverage
P2	25,527 (84,7%)	86,2%	21,5% (30,124 bp)
P3	25,032 (87,3%)	87,2%	20,5% (28,674 bp)
P4	19,836 (85,4%)	87,3%	16,6% (23,238 bp)
P5	22,788 (86,9%)	88,3%	18,7% (26,218 bp)

Для построения кладограммы на основе данных NGS-секвенирования фрагментов метил чувствительного AFLP-анализа, использовали программное обеспечение для полногеномного выравнивания и построения синтетных блоков Mauve с прогрессивным алгоритмом Mauve (Darling et al., 2004). Полученные полногеномные 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). 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 (рисунок 26).

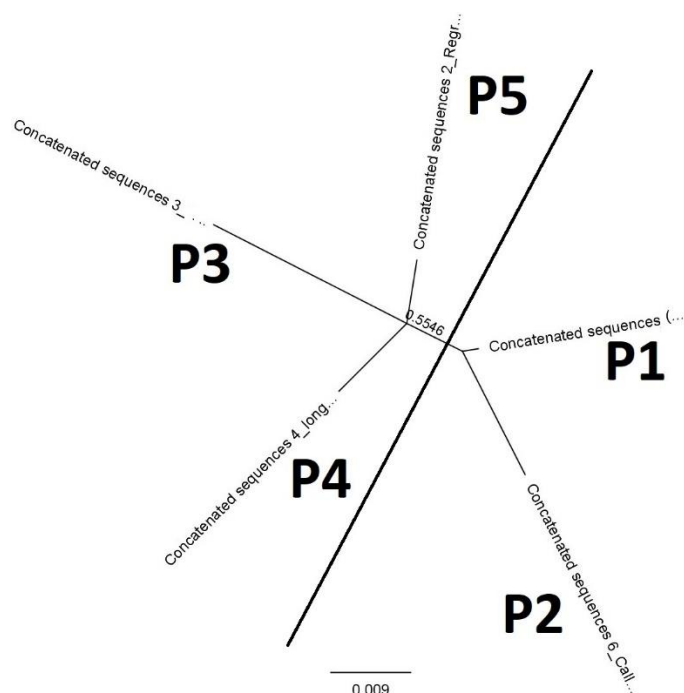


Рисунок 26 – Кладограмма на основе полногеномного выравнивания данных NGS-секвенирования фрагментов метил чувствительного AFLP-анализа образцов со стадий трех месяцев культивирования каллуса (P2), шести месяцев (P3), 12 месяцев (P4) и регенерантов полученных после 12 месяцев культивирования каллуса (P5) 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. Большинство метилированных остатков цитозина сконцентрировано в сателлитных повторах, транспозонах и эндогенных вирусах (Guseinov, Vanyushin, 1975).

В некоторых исследованиях, на основе данных двумерной флуоресцентной микроскопии предполагалось, что большая часть повторов половых хромосом также метилирована. Так, в работе Divashuk et al. (2014) у Y хромосомы *Cannabis sativa* L. отмечено уплотнение ДНК, где авторы предполагают метилирование ДНК и накопление последовательностей ретротранспозонов. Половые хромосомы *Humulus japonicus* Siebold & Zucc. также отчетливо проявляют более сильную

флуоресценцию ДАПИ (Grabowska-Joachimiak et al., 2011). Накопление повторяющихся последовательностей на Y-хромосомах было обнаружено в исследованиях Y-хромосом *R. acetosa* L. ранее, тогда как статус их метилирования описан не был (Navajas-Pérez et al., 2006).

Также нами были отмечены изменения в метилировании гена 18S рРНК. Гены рРНК собраны в Nог-области (Nucleolus organizer), состоят из нескольких сотен копий тандемно-выстроенных генов рРНК (18S, 5.8S и 25S-28S рРНК). Транскрипция рРНК – энергоемкий процесс, требующий строгой регуляции и обычно коррелирующий с общим уровнем биосинтеза белков (Grummt, Pikaard, 2003; Moss et al., 2003). Одним из механизмов, регулирующих транскрипцию рРНК, является контроль количества транскрибируемых копий рРНК на основе метилирования и модификации гистонов (Lawrence, Pikaard, 2004; Grummt, 2007). Достаточно высокий уровень контроля за экспрессией генов, кодирующих рДНК, был показан как в природных популяциях, так и культурах клеток. Так, на примере *Nicotiana tabacum* L. и *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh было показано, что количество копий генов и экспрессия положительно коррелируют с уровнем метилирования генов рДНК (Lim et al., 2000; Woo, Richards, 2008).

В нашем исследовании выявлено, что уровень метилирования гена 18S РНК выше на стадии 12-ти месяцев культивирования каллуса (Р4) и у контрольных образцов (Р1) *R. acetosa* L., тогда как на стадии трех месяцев пролиферации каллуса (Р2) и линии регенерантов (Р5) отмечено снижение метилирования участков ДНК. Данные выводы сделаны на основе метилированных участков; если для Р1, Р4 отмечено появление двух фрагментов с сайтами узнавания KroI, то для Р2 и Р5 выявлен только один подобный участок (рисунок 27).

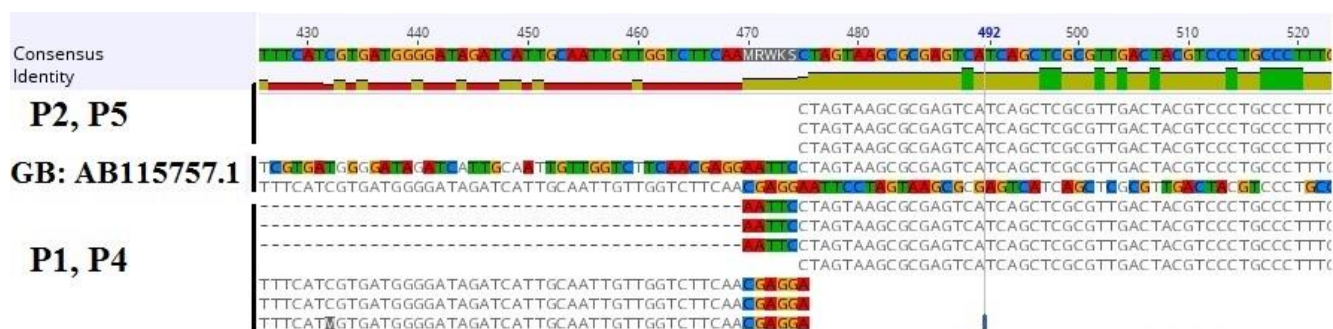


Рисунок 27 – Участок гомологии к гену 18S рРНК.

Схожие результаты были получены в работе Koukalova et al. (2005), в которой отмечено, что при дедифференцировке и пролиферации клеток *Nicotiana tabacum* процесс гипометилирования начинался через две недели после индукции каллуса и стабильно поддерживался в течение продолжительного культивирования. В данной работе образцы отбирали вплоть до стадии 4-5 месяцев культивирования, когда в нашем исследовании каллусы были отобраны с трех и 12-ти месяцев культивирования каллуса.

В различных исследованиях общего метилирования ДНК в культуре *in vitro* полученные закономерности могут противоречить друг другу. Так, в работе Valledor et al. (2007) культивирование *in vitro* характеризовалось сниженным уровнем метилирования тогда, как в исследовании Kitimu et al. (2015), отмечена обратная закономерность, что видимо связано с процессами метилирования и деметилирования различных генов, тогда как общий уровень может изменяться незначительно или варьировать в большую или меньшую сторону.

В некоторых других исследованиях показано, что уровни метилирования при культивировании *in vitro* связаны с типом экспланта (Fang et al., 2009; Wang et al., 2012), длительностью культивирования (Diaz-Sala et al., 1995; Rodríguez López et al., 2010) и компонентами среды (LoSchiavo et al., 1989; Arnholdt-Schmitt, 1993). Так, в работе Audin et al. (2016) высокий уровень ауксинов вызывал снижение стабильности генома, в то время, как самая высокая нестабильность наблюдалась в каллусах, поддерживаемых на МС-среде с дикамбой и пиклорамом. Гиперметилирование ДНК наблюдалось при высоких концентрациях 2,4-Д и

пиклорама, тогда как гипометилирование ДНК наблюдалось в присутствии дикамбы. Таким образом, состав сред и тип культивирования имеет определяющее значение в формировании спонтанных мутаций и изменчивости в уровне метилирования.

7.3. NGS-секвенирование транскриптома

В результате работы была подготовлена библиотека кДНК каллуса 12-ти месяцев культивирования, полученной после обогащения мРНК с олиго-dT олигонуклеотидом в результате обратной транскрипции тотальной РНК *R. acetosa L.* Всего было получено 74067 прочтений с общим содержанием нуклеотидов 25110194 п.н. Средняя длина прочтений составила 339 п.н.

После *de novo* сборки было получено 3039 контиги с минимальной длиной 40 п.н., максимальной 1194 п.н. Для сравнения использовали массив данных секвенирования кДНК листьев *R. acetosa L.*, депонированной в базе данных NCBI SRA № ERX190909. После *de novo* сборки было получено 7803 контиги с минимальной длиной 252 п.н., максимальной – 7063 п.н. Всего получено более 7000 аннотаций. Большая часть аннотаций были получена в базе данных UniProtDB, оставшуюся часть составили TAIR, GR Protein и PDB. GO аннотация – международная система классификации для стандартизации функций генов, которая включает три GO категории: биологические процессы, молекулярные функции и клеточный компонент.

На основе гомологии последовательностей из общего количества контиг в категории биологические процессы доминировали для транскриптома каллуса: «процессы клеточного метаболизма», «процессы метаболизма азота», «биосинтетические процессы» и «процессы метаболизма органических веществ». В категории молекулярные функции доминировали: «трансферазная активность», «активность связывания гетероциклических соединений» и «связывания ионов». В категории клеточный компонент доминировали:

«макромолекулярный комплекс», «органеллы», «клетка», «мембрана» (рисунок 28).

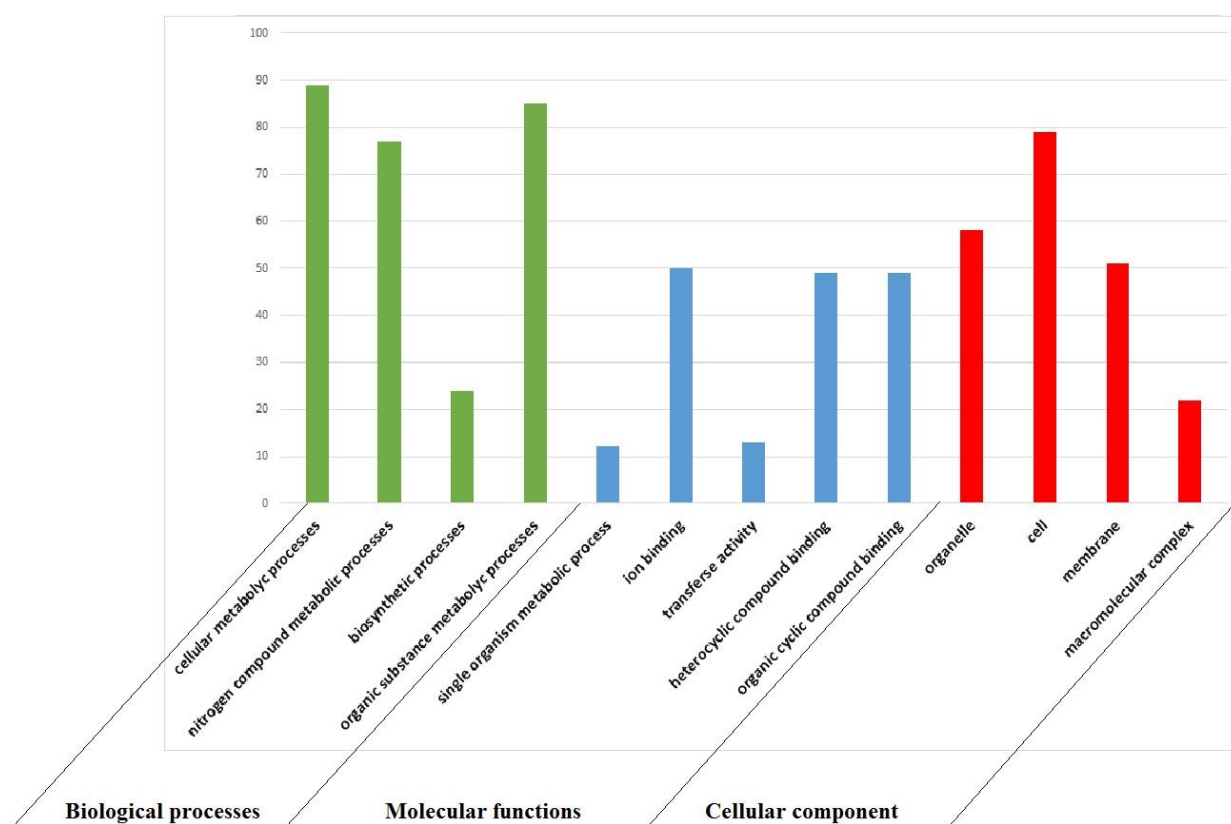


Рисунок 28 – GO аннотация основных групп генов для каллуса *Rumex acetosa L.*, полученного в данном исследовании.

Для транскриптома листьев *R. acetosa L.* в категории «биологические процессы» доминировали: «процессы клеточного метаболизма», «регулирующие биологических процессов», «организации клеточного компонента», «биосинтетические процессы» и «процессы метаболизма органических субстанций». В категории молекулярные функции доминировали: «трансферазная активность», «гидролазная активность», «оксиредуктазная активность», «активность связывания гетероциклических соединений» и «связывания ионов». В категории клеточный компонент доминировали: «макромолекулярный комплекс», «органеллы», «клетка», «мембрана» (рисунок 29). Еще одним доказательством эпигенетической изменчивости является вариации в экспрессии групп генов, выявленных нами в результате анализа транскриптома и GO аннотации. Пул

мРНК менее разнообразен в каллусных линиях, что, видимо, связано со снижением специализации и дедифференцировкой клеток.

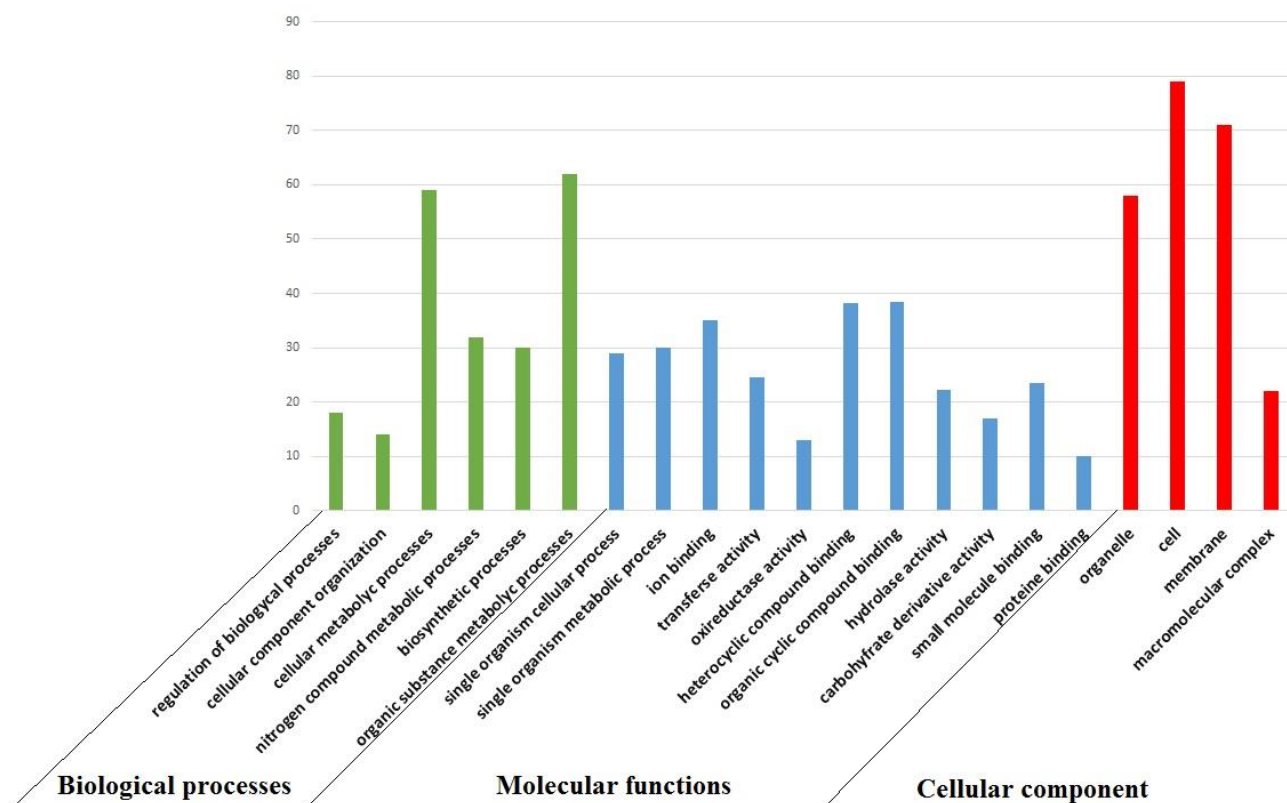


Рисунок 29 – GO аннотация основных групп генов для листьев *Rumex acetosa L.*, на основе данных NCBI SRA № ERX190909.

Что касается исследования других авторов, то в некоторых работах отмечено резкое увеличение транскрипционной активности стрессовых ответов на стадии соматического эмбриогенеза или генов, участвующих в передаче сигнала растительных гормонов и метаболизма сахарозы в эмбрионных каллусах (Jin et al., 2014; Li et al., 2014). Анализ цитогенетической и молекулярно-генетической изменчивости показал видоспецифичность ответа культур клеток и тканей растений *in vitro*. Если для *I. britannica L.* методы анализа полиморфизмов ДНК выявили незначительную разнородность в линиях, то для *R. acetosa L.* 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 соматклональной изменчивости и генетического разнообразия каллусных линий и микроклонов. Проведена оценка соматклональной 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 соматклональной изменчивости является схожим у исследованных объектов. На начальных стадиях пролиферации 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* наблюдали полиплоидию 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, что согласуется с данными о влиянии ретроэлементов на характер соматклональной изменчивости и хромосомные перестройки (Tanurdzic et al., 2008; Smulders, de Klerk, 2011). В процессе длительного поддержания пролиферации клеток каллуса наблюдается отбор по уровню устойчивости к условиям культуры *in vitro*, что приводит к изменению исходного генотипа, сформированного в процессе естественной эволюции вида. Увеличение генетического полиморфизма и его восстановление в процессе культивирования, по аналогии с эффектом «бутылочного горлышка», дает почву

для размышлений о природе соматклональной изменчивости в культуре *in vitro* и ее функциональной значимости для клетки (Wang, Wang, 2012). На примере *R. acetosa* нами была показана такая природная закономерность в видообразовании, как «даунсайзинга» генома – уменьшение размера моноплоидного генома в полиплоидных рядах и видах полиплоидного происхождения (Leitch, Bennett, 2004). Такое явление, как эндополиплоидия, предположительно являющееся механизмом компенсации, путем увеличения генома и, соответственно, количества копий генов, их экспрессии и комбинации, отмечались и ранее для природных популяций (Scholes, 2013; Skaptsov et al., 2017). Тем самым в течение короткого промежутка времени были показаны многие процессы, характерные для видообразования в естественных условиях.

Таким образом, в результате проведенной работы с использованием техники длительного поддержания пролиферации каллусных клеток получены важные данные о влиянии соматклональной изменчивости на сохранение генотипов растений в культуре *in vitro*. Полученные данные и разработанные методы исследования соматклональной изменчивости могут быть использованы в коллекциях гермоплазмы, селекционных работах, а также в изучении механизмов соматклональной изменчивости. Выявленные закономерности указывают на параллели с изменчивостью видов в живой природе, которые возможно описать следующей цитатой В.Л. Комарова: «Большое искушение – предположить, что процесс возникновения новых видов, приспособленных к новым условиям, идет по пути известной гегелевской триады – от исходного единообразия через максимально возможное разнообразие к конечному единообразию» (Комаров, 1940).

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 изменчивость 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 соматической изменчивости различий в экспрессии и изменений в копийности *gusA* не наблюдалось.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барыкина, Р.П. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы / Р.П. Барыкина. – М.: Изд-во МГУ, 2004. – 312 с.
2. Батыгина, Т.Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей / Т.Б. Батыгина // Физиология растений. – 1999. – Т. 6. – № 6. – С. 884–898.
3. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
4. Бутенко, Р.Г. Клеточная инженерия / Р.Г. Бутенко. – М.: Высшая школа, 1987. – 127 с.
5. Викторэк-Смагур, А. Сравнение двух методов трансформации *Arabidopsis thaliana*: погружение цветочных почек и вакуумная инфильтрация / А. Викторэк-Смагур, К. Хнатушко-Конка, А.К. Кононович // Физиология растений. – 2009. – Т.56. – № 4. – С. 619–628.
6. Гиренко, М.М. Щавель – *Rumex L.* / М.М. Гиренко, К.В. Иванова, Р.А. Комарова, Н.Ф. Корень, К.И. Цытович, С.Н. Шилова // Культурная флора СССР. – Л.: Агропромиздат, 1988. – Т. 12. – С. 304.
7. Горшкова, С.Г. Девясил – *Inula L.* / С.Г. Горшкова // Флора СССР. – М., Л.: Изд-во Академии Наук СССР, 1959. – Т. 25. – С. 440–476.
8. Дунаева, С. Е. Коллекции плодовых и ягодных культур *in vitro* (стратегия создания и хранение) / С.Е. Дунаева, Т.А. Гавриленко // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2007. – Т. – 161. – С. 10–19.
9. Дунаева, С. Е. Сохранение генетического разнообразия вегетативно размножаемых культур растений в контролируемых условиях среды в ВИРе / С.Е. Дунаева, О.Ю. Антонова, Г.И. Пендинен, Н.А. Швачко, Т.А. Гавриленко // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2012. – Т. 169. – С. 245–256.
10. Комаров, В.Л. Учение о виде у растений. Страница из истории биологии / В.Л. Комаров. – М.–Л.: Издательство Академии наук СССР, 1940. – 212 с.
11. Куанг, В.Д. Получение клонов из культивируемых клеток и протопластов

- кукурузы и их цитогенетическая характеристика / В.Д. Куанг // 4 Всесоюзная конференция «Культура клеток растений и биотехнология». Кишинев, 1983 г. – С. 177.
12. Куцев, М.Г. Фрагментный анализ ДНК растений: RAPD, DAF, ISSR / М.Г. Куцев. – Барнаул: Арктика, 2009. – 163 с.
13. Лозина-Лозинская, А.Г. Щавель – *Rumex* L. / А. Г. Лозина-Лозинская// Флора СССР. – М., Л.: Изд-во Академии Наук СССР, 1936. – Т. 5. – С. 449–481.
14. Муратова, С.А. Совершенствование метода клонального микроразмножения актинидии и лимонника китайского / С.А. Муратова, Д.Г. Шорников, М.Б. Янковская, Р.В. Папихин // Современное садоводство. – 2010. – № 1. – С. 96–100.
15. Пробатова, Н.С. Числа хромосом некоторых представителей семейств *Asclepiadaceae*, *Asteraceae*, *Boraginaceae*, *Chenopodiaceae*, *Lamiaceae*, *Oleaceae*, *Onagraceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*, *Urticaceae* с Дальнего Востока СССР / Н.С. Пробатова, А.П. Соколовская // Бот. журн. – 1990. – Т. 75. – № 11. – С. 1619–1622.
16. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 5. Ч. 2. / Отв. ред. А. Л. Буданцев. – СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2013. – 312 с.
17. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейство *Asteraceae* (*Compositae*) / Отв. ред. П. Д. – СПб.: Наука, 1993. – 352 с.
18. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 1 / Отв. ред. А. Л. Буданцев. – СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 424 с.
19. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. Руководство. Р 4.1.1672-03: Утв. главным государственным санитарным врачом РФ 30 июня 2003 г. // МЗ России. – 2004.
20. 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.

21. 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.
22. 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. – № 3. – С. 120–122.
23. 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. – № 3. – С. 72–78.
24. 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.
25. Смекалова, Т.Н. Дикие родичи культурных растений европейской России в связи с проблемой их сохранения *in situ* / Т.Н. Смекалова, И.Г. Чухина // Научные ведомости. Серия Естественные науки. – 2011. – № 9. – Вып. 15/1. – С. 38–43.
26. Соловьева, А.И. Влияние продолжительности дегидратации апексов на характеристики *in vitro* растений *Fragaria vesca* после криосохранения / А.И. Соловьева, О.Н. Высоцкая, Ю.И. Долгих // Физиология растений. – 2016. – Т. 63. – № 2. – С. 258–266.
27. Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro* и криоколлекциях: методические указания / под ред. Т. А. Гавриленко. – СПб.: Копи-Р Групп, 2011. – 72 с.
28. Уайт, Ф.Р. Культура растительных тканей / Ф.Р. Уайт. – М.: Иностранная литература, 1949. – 159 с.
29. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ. пособие. / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: «Сибирское университетское издательство», 2004. –

496 с.

30. Эрст, А.А. Клональное микроразмножение редкого вида *Hedysarum theinum* Krasnob. (*Fabaceae*) и оценка генетической стабильности регенерируемых растений с помощью ISSR-маркеров / А.А. Эрст, Н.С. Звягина, Т.И. Новикова, О.В. Дорогина // Генетика. – 2015. – Т. 51. – № 2. – С. 188–193.
31. Adamczuk, A. Morphogenesis of plants *in vitro* under stress conditions / A. Adamczuk, I. Siegień, I. Ciereszko // Biological diversity - from cell to ecosystem (Eds. G. Łaska). – Białystok: Polish Botanical Society, 2012. – P. 25–40.
32. Ahuja, M.R. Micropropagation a la carte / M.R. Ahuja // Micropropagation of woody plants, forestry series (Eds. M.R. Ahuja). – Dordrecht: Springer, 1993. – P. 3–9.
33. Ahuja, M.R. Transgenes and genetic instability / M.R. Ahuja // Micropropagation, Genetic Engineering and Molecular Biology of Populus (Eds. N.B. Klopfenstein, Y.W. Chun, M.-S. Kim, M.R. Ahuja). – Fort Collins: USDA, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, 1997 – P. 90–100.
34. Alberts, B. Molecular Biology of the Cell, 6h edition / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter // New York: Garland Science, 2014. – 1464 p.
35. Alfonso, D. *In vitro* propagation of *Leucocroton havanensis* Borhidi (*Euphorbiaceae*): A rare serpentine-endemic species of Cuba / D. Alfonso, A. Cicutelli, F. Guarino, D. Rodríguez, S. Castiglione // Plant Biosystems. – 2017. Vol. 152. – P. 649–656.
36. Ali, M. Plant regeneration through somatic embryogenesis and genome size analysis of *Coriandrum sativum* L. / M. Ali, A. Mujib, D. Tonk, N. Zafar // Protoplasma. – 2017. – Vol. 254. – P. 343–352.
37. Aly, M.A.M. Somatic embryogenesis in perennial statice *Limonium bellidifolium*, plumbaginaceae / M.A.M. Aly, B. Rathinasabapathi, K. Kelley // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2002. – Vol. 68. – P. 127–135.
38. Al-Zahim, M.A. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis / M.A. Al-Zahim, B.V. Ford-Lloyd, H.J. Newbury // Plant Cell Rep. – 1999. – Vol. 18. – P. 473–477.
39. Anderberg, A.A. Inuleae / A.A. Anderberg // Systematics, evolution, and

- biogeography of Compositae (Eds. V.A. Funk, A. Susanna, T.F. Stuessy, R.J. Bayer). – Vienna: International Association, 2009 – P. 667–680.
40. Aoshima, Y. Efficient embryogenesis in the callus of tea (*Camellia sinensis*) enhanced by the osmotic stress or antibiotics treatment / Y. Aoshima // Plant Biotechnol. – 2005. – Vol. 22. – P. 277–280.
41. Arnholdt-Schmitt, B. Rapid changes in amplification and methylation pattern of genomic DNA in cultured carrot root explants (*Daucus carota* L.) / B. Arnholdt-Schmitt // Theor. Appl. Genet. – 1993. – Vol. 85. – P. 793–800.
42. Aydin, M. Analyses of somaclonal variation in endosperm – supported mature embryo culture of rye (*Secale cereale* L.) / M. Aydina, E. Arslanb, M.S. Taspinarc, G. Karadayib, G. Agarb // Biotech. Biotechnol. Equip. – 2016. – Vol. 30. – No. 6. – P. 1082–1089.
43. Bainard, J. D. 2011. Patterns and biological implications of dna content variation in land plants: PhD diss. / J.D. Bainard. – Guelph., 2011. – 221 p.
44. Bairu, M.W. Somaclonal variation in plants: Causes and detection methods / M.W. Bairu, A.O. Aremu, J.V. Staden // Plant Growth Regul. – 2011. – Vol. 63. – P. 147–173.
45. Barow, M. Endopolyploidy in seed plants / M. Barow // BioEssays. – 2006. – Vol. 28. – P. 271–281.
46. Barow, M. Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size / M. Barow, A. Meister // Plant Cell Environ. – 2003. – Vol. 26. – P. 571–584.
47. Beker, M.P. Development of a construct – based risk assessment framework for genetic engineered crops / M.P. Beker, P.Boari, M. Burachik, V. Cuadrado, M. Junco, S. Lede, M. A. Lema, D. Lewi, A. Maggi, I. Meoniz, G. Noé, C. Roca, C. Robredo, C. Rubinstein, C. Vicien, A. Whelan // Transgenic Res. – 2016. – Vol. 25. P. 597–607.
48. Bennetzen, J.L. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants / J.L. Bennetzen, M.A. Jianxin, K.M. Devos // Ann. Bot. – 2005. – Vol. 95. – P. 127–132.
49. Bennici, A. Callus formation from the suspensor of *Phaseolus coccineus* in

- hormone-free medium: a cytological and DNA cyto-photometric study / A. Bennici, P.G. Cionini, F. D'Amato // *Protoplasma*. – 1976. – Vol. 89. – P. 251–261.
50. Benson, E. An Introduction to plant conservation biotechnology / Benson, E. // *Plant conservation biotechnology* (Eds. E. Benson). – London: CRC Press, 2014. – P. 3–10.
51. Benzion, G. Cytogenetic stability of maize tissue culture: a cell line pedigree analysis / G. Benzion, R.L. Phillips // *Genome*. – 1988. – Vol. 30. – P. 318–325.
52. Błocka-Wandas, M. Male gametophyte development and two different DNA classes of pollen grains in *Rumex acetosa* L., a plant with an XX/XY1Y2 sex chromosome system and female-biased sex ratio / M. Błocka-Wandas, E. Sliwinska, A. Grabowska-Joachimiak, K. Musiał, A.J. Joachimiak // *Sex Plant Reprod.* – 2007. – Vol. 20. – P. 171–180.
53. Bogdanova, E.D. Epigenetic variation induced in *Triticum aestivum* L. by nicotinic acid / E.D. Bogdanova // *Russ. J. Genet.* – 2003. – Vol. 39. – P. 1029–1034.
54. Bolduc, N. The maize transcription factor KNOTTED1 directly regulates the gibberellin catabolism gene GA2ox1 / N. Bolduc, S. Hake // *Plant Cell*. – 2009. – Vol. 21. – P. 1647–1658.
55. Bustin, S.A. A-Z of Quantitative PCR / S.A. Bustin. – La Jolla: Internat. UniVol. Line, 2004. – 882 p.
56. Cavara, F. Eziologia di alcune malattie di piante coltivate / F. Cavara // *Le Stazioni Sper. Agraric Itliana*. – 1897. – Vol. 30. – P. 482–509.
57. Cervera, M. A broad exploration of a transgenic population of citrus: stability of gene expression and phenotype / M. Cervera, J.A. Pina, J. Juarez, L. Navarro, L. Pena // *Theor. Appl. Genet.* – 2000. – Vol. 100. – P. 670–677.
58. Chan, M.T. *Agrobacterium* mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric a – amylase promoter/fl – glucuronidase gene / M.T. Chan, H.H. Chang, S.L. Ho, W.F. Tong, S.M Yu // *Plant Mol. Biol.* – 1993. – No. 22. – P. 491–506.
59. Charrier, B. Co-silencing of homologous transgenes in tobacco / B. Charrier, C. Scollan, S. Ross, E. Zubko, P. Meyer // *Mol. Breed.* – 2000. – Vol. 6. – P. 407–419.
60. Chen, W.H. Ploidy doubling by *in vitro* culture of excised protocorms or

- protocorm – like bodies in *Phalaenopsis* species / W.H. Chen, C.Y. Tang, Y.L. Kao // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2009. – Vol. 98. – P. 229–238.
61. Chilton, M.D. A vector for introducing new genes into plants / M.D. Chilton // Sci. Am. – 1983. – No. 248. – P. 36–45.
62. Chung, C. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution / C. Chung, S. Niemela, R. Miller // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – Vol. 86. – P. 2172–2175.
63. Clark, D. DNA replication and the division cycle in *Escherichia coli* / D. Clark, O. Maaloe // J. Mol. Biol. – 1967. – Vol. 23. – P. 99–112.
64. Clegg, M.T. Flower color variation: a model for the experimental study of evolution / M.T. Clegg, M.L. Durbin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 7016–7023.
65. Cody, C.W. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* greenfluorescent protein / C.W. Cody, D.C. Prasher, W.M. Westler, F.G. Prendergast, W.W. Ward // Biochemistry. – 1993. – Vol. 32. – P. 1212–1218.
66. Conesa, A. Blast2GO: A Comprehensive suite for functional analysis in plant genomics [электронный ресурс] / A. Conesa, S. Götz // Int. J. Plant Genomics. – 2008. – Vol. 2008. – No. 619832. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2008/619832>
67. Cookson, S.J. Cell and leaf size plasticity in arabidopsis: what is the role of endoreduplication? / S.J. Cookson, A. Radziejwoski, C. Granier // Plant, Cell Enviro. – 2006. – Vol. 29. – P. 1273–1283.
68. Crossway, A. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll Protoplasts / A. Crossway, J. Oakes, J.M. Irvine, B. Ward, C. Knauf, C. Shewmaker // Mol. Gen. Genet. – 1986. – No.202. – P. 179–185.
69. Cyr, D.R. Cryopreservation: roles in clonal propagation and germplasm conservation of conifers / D.R. Cyr // Cryopreservation of tropical plant germplasm - current research progress and applications. Proceedings of an international workshop (Eds. F. Engelmann, H. Takagi). – Rome: International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), 2000. – P. 261–268.
70. D'Amato, F. Nuclear changes in cultured plant cells / F. D'Amato // Caryologia.

– 1990. – Vol. 44. – P. 217–224.

71. D'Amato F. Somatic Nuclear mutations *in vivo* and *in vitro* in higher plants / F. D'Amato // *Caryologia*. – 1990. – Vol. 43. – P. 191–204.

72. Darling, A.C.E. Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements / A.C.E. Darling, B. Mau, F.R. Blattner, N.T. Perna // *Genome Research*. – 2004. – Vol. 14. – I. 7. – P. 1394–1403.

73. Daub, M.E. Field and greenhouse analysis of variation for disease resistance in tobacco somaclones / M.E. Daub, A.E. Jenks // *Phytopathology*. – 1989. – Vol. 79. – P. 600–605.

74. Daveya, M.R. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives / M.R. Daveya, P. Anthony, J.B. Power, K.C. Loweb // *Biotechnol. Adv.* – 2005. – Vol. 23. – P. 131–171.

75. Diaz-Sala, C. Variations in the DNA methylation and polypeptide patterns of adult hazel (*Corylus avellana* L.) associated with sequential *in vitro* subcultures / C. Diaz-Sala, M. Rey, A. Boronat, R. Besford, R. Rodriguez // *Plant Cell Rep.* – 1995. – Vol. 15. – P. 218–221.

76. Divashuk, M.G. Molecular cytogenetic characterization of the dioecious *Cannabis sativa* with an XY chromosome sex determination system [Электронный ресурс] / M.G. Divashuk, O.S. Alexandrov, O.V. Razumova, I.V. Kirov, G.I. Karlov // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – No. e85118. – Режим доступа: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0085118>

77. Doležel J. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter – laboratory comparison / J. Doležel, J. Greilhuber, S. Lucretti, A. Meister, A. Lysak M., L. Nardi, R. Obermayer // *Annals of Botany*. – 1998. – Vol. 82. – P. 17–26.

78. Doležel, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes / J. Doležel // *J. Appl. Genet.* – 1997. – Vol. 38. – P. 285–302.

79. Doležel, J. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants / J. Doležel, S. Sgorbati, S. Lucretti // *Physiol. Plant.* – 1992. – Vol. 85. – P. 625–631.

80. Doležel, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry / J.

- Doležel, J. Greilhuber, J. Suda // *Nat. Protoc.* – 2007. – Vol. 2. – P. 2233–2244.
81. Doležel, J. Molecular cytogenetics and cytometry of bananas (*Musa* sp.) / J. Doležel, M. Valárik, J. Vrána; M. Lysák, E. Hříbová, J. Bartoš, N. Gasmanová, M. Kubaláková, J. Šafář, H. Šimková // *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations* (Eds. S.M. Jain, R. Swennen). – Enfield: Science Publishers, 2004. – P. 229–244.
82. Doležel, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size / Doležel J., J. Bartoš // *Ann. Bot.* – 2005. – Vol. 95. – P. 99–110.
83. Dolman, P.M. Ark or park: the need to predict relative effectiveness of ex situ and in situ conservation before attempting captive breeding / P.M. Dolman, N.J. Collar, K.M. Scotland, R. Burnside // *Journal of Applied Ecology.* – 2015. – Vol. 52. – No 4. – P. 841–850.
84. Douglas, C.J. Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region / C.J. Douglas, R.J. Staneloni, R.A. Rubin, E.W. Nester // *J. Bacteriol.* – 1985. – Vol. 161. – P. 850–860.
85. Draper, J. Gene transfer to plants / J. Draper, R. Scott. – Glasgow: Plant Genetic Engineering, 1991. – P. 38–81.
86. Du, J. The Populus homeobox gene ARBORKNOX2 regulates cell differentiation during secondary growth / J. Du, S.D. Mansfield, A.T. Groover // *Plant J.* – 2009. – Vol. 60. – P. 1000–1014.
87. Earl, D. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method / D. Earl, B. vonHoldt // *Conserv. Genet. Resour.* – 2012. – Vol. 4. – P. 359–361.
88. Ehsanpour, A.A. Detection of somaclonal variation in potato callus induced by UV-C radiation using RAPD-PCR / A.A. Ehsanpour, S. Madani, M.B. Hoseini // *Gen. Appl. Plant Physiol.* – 2007. – Vol. 33. – P. 3–11.
89. Ellis, D.E. Transgenic expression in spruce and poplar: From the lab to the field / D.E. Ellis, J. Rintamaki-Strait, K. Francis, K. Kleiner, K. Raffa, B. McCown // *Somatic cell genetics and molecular genetics of trees* (Eds. M.R. Ahuja, W. Boerjan, D.B. Neale). – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. – P. 159–163.

90. Engelmann F. Cryopreservation of embryos: An Overview / F. Engelmann // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 710. – P. 155–184.
91. Evanno, G. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study / G. Evanno, S. Regnaut, J. Goudet // *Mol. Ecol.* – 2005. – Vol. 14. – P. 2611–2620.
92. Evrensel, C. Variations in BARE – 1 insertion patterns in barley callus cultures / C. Evrensel, S. Yilmaz, A. Temel, N. Gozukirmizi // *Genet. Mol. Res.* – 2011. – Vol. 10. – No. 2. – P. 980–987.
93. Fagard, M. (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms? / M. Fagard, H. Vaucheret // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 51. – P. 167–194.
94. Fang, J.Y. Use of secondary somatic embryos promotes genetic fidelity in cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) / J.Y. Fang, A. Wetten, R. Adu-Gyamfi, M. Wilkinson, C. Rodríguez-López // *Agric. Food Sci.* – 2009. – Vol. 18. – P. 152–159.
95. Fang, S-C. Protocorms and protocorm-like bodies are molecularly distinct from zygotic embryonic tissues in *Phalaenopsis aphrodite* / S-C. Fang, J-C. Chen, M-J. Wei // *Plant Physiology.* – 2016. – Vol. 171. – No. 4. – P. 2682-2700
96. Feher, A. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state / A. Feher, T.P. Pasternak, D. Dudits // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2003. – Vol. 74. – P. 201–228.
97. Fiuk, A. Flow cytometry, HPLC – RP, and metAFLP analyses to assess genetic variability in somatic embryo – derived plantlets of *Gentiana pannonica* Scop. / A. Fiuk, P. Bednarek, J. Rybczynski // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2010. – Vol. 28. – P. 413–420.
98. Flavell, R.B. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication / R.B. Flavell // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – Vol. 91. – P. 3490–3496.
99. Forsbach, A. A comprehensive characterization of single – copy T – DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome / A. Forsbach, D. Schubert, B.

- Lechtenberg, M. Gils, R. Schmidt // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 52. – P. 161–176.
100. Fraley, R.T. Expression of bacterial genes in plant cells / R.T. Fraley, S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffmann, S.C. Woo // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1983. – No. 80. – P. 4803–4807.
101. Fraley, R.T. Gene transfer in plants: a tool for studying gene expression and plant development / R.T. Fraley, S.G. Rogers, R.B. Horsch, G.F. Barry // *Mol. Dev. Biol.* – 1986. – P. 15–26.
102. Fromm, M. Electroporation of DNA and RNA into plant protoplasts / M.F. Fromm, J. Callis, L. Taylor, P.V. Walbot // *Methods Enzymol.* – 1987. – No. 153. – P. 351–366.
103. Fuentes, S.R.L. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora* / S.R.L. Fuentes, M.B.P. Calheiros, J. Manetti-Filho, L.G.E. Vieira // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2000. Vol. 60. – P. 5–3.
104. Gaj, M.D. Hormone – response mutants of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. impaired in somatic embryogenesis / M.D. Gaj, A. Trojanowska, A. Ujczak, M. Medrek, A. Koziol, B. Garbaciak // *Plant Growth Regul.* – 2006. – Vol. 49. – P. 183–197.
105. Gashi, B., Abdullai, K., Sota, V., E. Kongjika. Micropropagation and *in vitro* conservation of the rare and threatened plants *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae* / B. Gashi, K. Abdullai, V. Sota, E. Kongjika // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* – 2015. – Vol. 21. – P. 123–136.
106. Gegas, V.C. Endopolyploidy as a potential alternative adaptive strategy for *Arabidopsis* leaf size variation in response to UV-B / V.C. Gegas, J.J. Wargent, E. Pesquet, E. Granqvist, N.D. Paul, J.H. Doonan // *J. Exp. Bot.* – 2014. – Vol. 65. – P. 2757–2766.
107. Gelvin, S.B. Agrobacterium and plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool / S.B. Gelvin // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2003. – No. 67. – P. 16–37.
108. Gelvin, S.B. Plant proteins involved in Agrobacterium – mediated genetic

- transformation / S.B. Gelvin // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2010. – Vol. 48. – P. 45–68.
109. Gendreau, E. Phytochrome controls the number of endoreduplication cycles in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyl / E. Gendreau, H. Höfte, O. Grandjean, S. Brown, J. Traas // *Plant J.* – 1998. – Vol. 13. – P. 221–230.
110. Ghorbanpoura, M. Somaclonal variation in callus samples of *Plantago major* using inter – simple sequence repeat marker / M. Ghorbanpoura, A. Khadivi-Khubb // *Caryologia.* – 2015. – Vol. 68. – P. 19–24.
111. Gimenez, C. Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant / C. Gimenez, E. de Garcia, N.X. de Enrech, I. Blanca // *In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant.* – 2001. – Vol. 37. – P. 217–222.
112. Giorgettia, L. Oil palm *in vitro* regeneration: microdensitometric analysis during reproduction and development / L. Giorgettia, M. R. Castiglione // *Caryologia.* – 2016. – Vol. 69. – No. 1. P. 5–11.
113. Godwin, I.D. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics / I.D. Godwin, E.A. Aitken, L.W. Smith // *Electrophoresis.* – 1997. – Vol. 18. – P. 1524–1528.
114. Gomes, S.S.L. Karyotype, genome size, and *in vitro* chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen / S.S.L. Gomes, C.W. Saldanha, C.S. Neves, M. Trevizani, N.R.B. Raposo, M.M. Notini, L.F. Viccini // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2014. – Vol. 118. – P. 45–56.
115. Gonzalez, A. Protein markers and seed size variation in common bean segregating populations / A. Gonzalez, M. De la Fuente, A. De Ron, M. Santalla // *Mol. Breed.* – 2010. – Vol. 25. – P. 723–740
116. Goodman, R.M. Gene transfer in crop improvement / R.M. Goodman, H. Hauptli, A. Crossway, V.C. Knauf // *Science.* – 1987. – No. 236. – P. 48–54.
117. Grabowska-Joachimiak, A. C – banding/DAPI and *in situ* hybridization reflect karyotype structure and sex chromosome differentiation in *Humulus japonicus* Siebold&Zucc / A. Grabowska-Joachimiak, M. Mosiolek, A. Lech, G. Goralski // *Cytogenet. Genome Res.* – 2011. – Vol. 132. – P. 203–211.

118. Grabowska-Joachimiak, A. Fluorescent banding pattern and species-specific DNA marker in *Rumex thyrsiflorus* Fingerh / A. Grabowska-Joachimiak, D. Kwolek, A. Kula, P. Marciniuk // Cytogenet. Genome Res. – 2012. – Vol. 137. – P. 70–77.
119. Graebe, J.E. Gibberellin biosynthesis and control / J.E. Graebe // Annu. Rev. Plant Physiol. – 2003. – Vol. 38. – P. 419–465.
120. Gray, D.J. Development and operation of five particle guns for introduction of DNA in plant cells / D.J. Gray, J.J. Finan // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1993. – No. 33. – P. 219.
121. Grummt, I. Different epigenetic layers engage in complex crosstalk to define the epigenetic state of mammalian rRNA genes / I. Grummt // Hum. Mol. Genet. – 2007. – Vol. 16. – P. 21–27.
122. Grummt, I. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription / I. Grummt, C.S. Pikaard // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2003. – Vol. 4 – P. 641–649.
123. Gupta, M. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats / M. Gupta, Y-S. Chyi, J. Romero-Severson, J.L. Owen // Theor. Appl. Genet. – 1994. – Vol. 89. – P. 998–1006.
124. Guseinov, V.A. Content and localisation of 5 – methylcytosine in DNA of healthy and wilt – infected cotton plants / V.A. Guseinov, B.F. Vanyushin // Biochim. Biophys. Acta. – 1975. – Vol. 395. – No. 3. – P. 229–238.
125. Gutiérrez-Larruscain, D. Phylogeny of the *Inula* group (*Asteraceae: Inuleae*): Evidence from nuclear and plastid genomes and a recircumscription of *Pentanema* / D. Gutiérrez-Larruscain, M. Santos-Vicente, A. Anderberg, E. Rico, M.M. Martínez-Ortega // TAXON. – 2018. – Vol. 67. – No. 1. – P. 149–164.
126. Hanold, D. *In vitro* transformation of protoplast-derived *Hyoscyamus* cells by *Agrobacterium tumefaciens* / D. Hanold // Plant Sci. Lett. – 1983. – No. 30. – P. 177–183.
127. Hay, A. The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans / A. Hay, H. Kaur, A. Phillips, P. Hedden, S. Hake M. Tsiantis // Curr. Biol. – 2002. – Vol. 12. – P. 1557–1565.
128. Herrera-Estrella L. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells /

- L. Herrera-Estrella, M. De Block, E. Messens, J.P. Hernalsteens, M. Van Montagu, J. Schell // EMBO J. – 1983. – No. 2. – P. 987–995.
129. Hiei, Y. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T – DNA / Y. Hiei, S. Ohta, T. Komari, T. Kumashiro // Plant J. – 1994. – No. 6. – P. 271–282.
130. Hofmann, N.E. Mutagenesis of embryogenic cultures of soybean and detecting polymorphisms using RAPD markers / N.E. Hofmann, R. Raja, R.L. Nelson, S.S. Korban // Biol. Plant. – 2004. – Vol. 48. – No. 2. – P. 173–177.
131. Horsch, R. Inheritance of functional foreign genes in plants / R. Horsch, R. Fraley, S. Rogers, P. Sanders, A. Lloyd, W. Hoffmann // Science. – 1984. – No. 223. – P. 496–498.
132. Horsch, R.B. A simple and general method for transferring genes into plants / R.B. Horsch, J.E. Fry, N.L. Hoffmann, M. Wallroth, D. Eichholtz, S.G. Rogers, R.T. Fraley // Science. – 1985. – No. 227. – P. 1229–1231.
133. Hosp, J. Transcriptional and metabolic profiles of stress – induced, embryogenic tobacco microspores / J. Hosp, A. Tashpulatov, U. Roessner, E. Barsova, H. Katholnigg, R. Steinborn, B. Melikant, S. Lukyanov, E. Heberle–Bors, A. Touraev // Plant Mol. Biol. – 2006. – Vol. 63. – P. 137–149.
134. Hossain, Z. NaCl stress -its chromotoxic effects and antioxidant behavior in roots of *Chrysanthemum morifolium* Ramat / Z. Hossain, A. Kalam, A. Mandal, R. Shukla, S.K. Datta // Plant Sci. – 2004. – Vol. 166. – P. 215–220.
135. Hu, H. Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection / H. Hu, L. Xiong, Y. Yang // Planta. – 2005. – Vol. 222. – P. 107–117.
136. Huelsenbeck, J.P. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees / J.P. Huelsenbeck, F. Ronquist // Bioinformatics. – 2001. – Vol. 17. – I. 8. – P. 754–755.
137. Hussein, S. Somatic embryogenesis: an alternative method for *in vitro* micropropagation / S. Hussein, R. Ibrahim, A.L.P. Kiong // Iranian J. Biotech. – 2006. – Vol. 4. – P. 156–161.
138. Imai, T. High frequency of tetraploidy in *Agrobacterium* – mediated

- transformants regenerated from tuber discs of diploid potato lines / T. Imai, R. Aida, T. Ishige // *Plant Cell Rep.* – 1993. – Vol. 12. – P. 299–302.
139. Israeli, Y. *In vitro* culture of bananas / Y. Israeli, E. Lahav, O. Reuveni // *Bananas and plantians* (Eds. S. Gowen). – London: Chapman and Hall, 1995. – P. 147–178.
140. Israeli, Y. Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques / Y. Israeli, O. Reuveni, E. Lahav // *Sci. Hortic.* – 1991. – Vol. 48. – P. 71–88
141. Iuliana, C. The effect of the ultraviolet radiation on the somaclonal variability for *Solanum tuberosum* / C. Iuliana, P. Cerasela // *Romanian Biotechnol. Letters.* – 2014. – Vol. 19. – P. 9339–9344.
142. Jackson, D. Expression of maize KNOTTED1 related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot / D. Jackson, B. Veit, S. Hake // *Development.* – 1994. – Vol. 120. – P. 405–413.
143. Jayasankar, S. Direct seeding of grapevine somatic embryos and regeneration of plants / S. Jayasankar, M. van Aman, Z. Li, D.J. Gray // *In Vitro Cell Dev. Biol.* – 2001. – Vol. 37. – P. 476–479.
144. Jefferson, R.A. α -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene fusion marker / R.A. Jefferson, S.M. Burgess, D. Hirsh // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1986. – Vol. 83. – P. 8447–8451.
145. Jefferson, R.A. Gus fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants / R.A. Jefferson, T.A. Kavanagh, M.W. Bevan // *EMBO J.* – 1987. – No. 6. – P. 3901–3907.
146. Jiang, C. Regenerant *Arabidopsis* lineages display a distinct genome – wide spectrum of mutations conferring variant phenotypes / C. Jiang, A. Mithani, X. Gan, E.J. Belfield, J.P. Klingler, J.K. Zhu, J. Ragoussis, R. Mott, N.P. Harberd. // *Curr. Biol.* – 2011. – Vol. 21. – P. 1385–1390.
147. Jin, F. Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development / F. Jin, L. Hu, D. Yuan, J. Xu, W. Gao, L. He, X. Yang, X. Zhang // *Plant Biotechnol. J.* – 2014. – Vol. 12. – P. 161–173.

148. Jin, S. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers / S. Jin, R. Mushke, H. Zhu, L. Tu, Z. Lin, Y. Zhang, X. Zhang // *Plant Cell Rep.* – 2008. – Vol. 27. – No. 8. – P. 1303–1316.
149. Jovtchev, G. Impact of environmental and endogenous factors on endopolyploidization in angiosperms / G. Jovtchev, M. Barow, A. Meister, I. Schubert. // *Environ. Exp. Bot.* – 2007. – Vol. 60. – P. 404–411.
150. Kaeppler, S. DNA methylation and tissue culture induced variation in plants / S. Kaeppler, R. Phillips // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* – 1993. Vol. 29. – P. 125–130.
151. Kaeppler, S.M. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants / S.M. Kaeppler, H.F. Kaeppler, Y. Rhee // *Plant. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 43. – P. 179–188.
152. Kamada, H. Heat stresses induction of carrot embryogenesis / H. Kamada, Y. Tachikawa, T. Saitou, H. Harada // *Plant Tissue Cult. Lett.* – 1994. – Vol. 11. – P. 229–232.
153. Kartsonas, E. Mother plant age and seasonal influence on *in vitro* propagation of *Quercus euboica* Pap., an endemic, rare and endangered oak species of Greece / E. Kartsonas, M. Papafotiou // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2007. – Vol. 90. – P. 111–116.
154. Kawakatsu, T. A whole – genome analysis of a transgenic rice seed – based edible vaccine against cedar pollen allergy / T. Kawakatsu, Y. Kawahara, T. Itoh, F. Takaiwa // *DNA Res.* – 2013. – Vol. 20. – P. 623–631.
155. Kessler, D. The safety of foods developed by biotechnology / D. Kessler, M. Taylor, J. Maryanski, E. Flamm, L. Kahl // *Science.* – 1992. – Vol. 256. – P. 1747–1749.
156. Khan, I.A. Genetic variability in plantlets derived from callus culture in sugarcane / I.A. Khan, M.U. Dahot, N.S.S. Bibi, A. Khatri // *Pak. J. Bot.* – 2008. – Vol. 40. – P. 54–564
157. Kikuchi, A. Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells / A. Kikuchi, N. Sanuki, K. Higashi, T. Koshihara, H. Kamada // *Planta.* – 2006. – Vol. 223. – P. 637–645.
158. Kim, S. Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants / S. Kim, J. Lee, S.

- Jun, S. Park, H. Kang, S. Kwon, G. An // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 52. – P. 761–773.
159. Kitimu, S.R. Meristem micropropagation of cassava (*Manihot esculenta*) evokes genome-wide changes in DNA methylation / S.R. Kitimu, J. Taylor, T.J. March, F. Tairo, M.J. Wilkinson, C.M. Rodríguez López // *Front. Plant Sci.* – 2015. – Vol. – 6. – No. 590.
160. Kiyosue, T. Induction of somatic embryogenesis by salt stress in carrot / T. Kiyosue, H. Kamada, H. Harada // *Plant Tissue Cult. Lett.* – 1989. – Vol. 6. – P. 162–164.
161. Kiyosue, T. Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions / T. Kiyosue, K. Takano, H. Kamada, H. Harada // *Can. J. Bot.* – 1990. – Vol. 68. – P. 2301–2303.
162. Kobayashi, S. Retrotransposon – induced mutations in grape skin color / S. Kobayashi, N. Goto-Yamamoto, H. Hirochika // *Science.* – 2004. – Vol. 304. – P. 982.
163. Kodym, A. Ploidy stability of somatic embryo – derived plants in two ecological keystone sedge species (*Lepidosperma laterale* and *L. concavum*, *Cyperaceae* / A. Kodym, E.M. Temsch, E. Bunn, J. Delprat // *Austral. J. Bot.* – 2012. – Vol. 60. – P. 396–404.
164. Kohli, A. Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination / A. Kohli, S. Griffiths, N. Palacios, R.M. Twyman, P. Vain, D.A. Laurie, P. Christou // *Plant J.* – 1999. – Vol. 17. – P. 591–601.
165. Kole, P. Variation of *Helminthosporium* resistance and biochemical and cytological characteristics in somaclonal generations of barley / P. Kole, H. Chawla // *Biol. Plant.* – 1993. – Vol. 35. – P. 81–86.
166. König, A. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops / A. König, A. Cockburn, R.W. Crevel, E. Debruyne, R. Grafstroem, U. Hammerling, I. Kimber, I. Knudsen, H.A. Kuiper, A.A. Peijnenburg, A.H. Penninks, M. Poulsen, M. Schauzu, J.M. Wal // *Food Chem. Toxicol.* – 2004. – Vol. 42. – P. 1047–

1088.

167. Koukalova, B. Dedifferentiation of tobacco cells is associated with ribosomal RNA gene hypomethylation, increased transcription, and chromatin alterations / B. Koukalova, M. Fojtova, K.Y. Lim, J. Fulneck, A.R. Leitch, A. Kovarik // *Plant Physiol.* – 2005. – Vol. 139. – P. 275–286.

168. Krysan, P.J. Characterization of T – DNA insertion sites in *Arabidopsis thaliana* and the implications for saturation mutagenesis / P.J. Krysan, J.C. Young, P.J. Jester, S. Monson, G. Copenhaver, D. Preuss, M.R Sussman. // *OMICS.* – 2002. – Vol. 6. – P. 163–174.

169. Kumar, A. Plant retrotransposons / A. Kumar, J.L. Bennetzen // *Annu. Rev. Genet.* – 1999. – Vol. 33. – P. 479–532.

170. Kumar, S. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). II. Molecular characterization of variable expression of transgene in wild and hybrid aspen / S. Kumar, M. Fladung // *Planta.* – 2001. – Vol. 213. – P. 731–740.

171. Kunitake, H. Morphological and cytological characteristics of protoplast – derived plants of statice (*Limonium perezii* Hubbard) / H. Kunitake, K. Koreeda, M. Mii // *Sci. Hortic.* – 1995. – Vol. 60. – P. 305–312.

172. Labra, M. Genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced by infecting calli with *Agrobacterium tumefaciens* / M. Labra, C. Savini, M. Bracale, N. Pelucchi, L. Colombo, M. Bardini, F. Sala // *Plant Cell Rep.* – 2001. – Vol. 20. – P. 325–330.

173. Labra, M. Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip / M. Labra, C. Vannini, F. Grassi, F. M. Bracale, M. Balsemin, B. Basso, F. Sala // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – Vol. 109. – P. 1512–1518.

174. Ładyżyński, M. Relationship between somaclonal variation and type of culture in cucumber / M. Ładyżyński, W. Burza, S. Malepszy // *Euphytica.* – 2002. – Vol. 125. – P. 349–356.

175. Langridge, W.H.R. Electric field mediated stable transformation of carrot protoplasts with naked DNA / W.H.R. Langridge, B.J. Li, A.A. Szalay // *Plant Cell Rep.* – 1985. – No. 4. – P. 355–359.

176. Larkin, P. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement / P. Larkin, W. Scowcroft // *Theor. Appl. Genet.* – 1981. – Vol. 60. – P. 197–214.
177. Lawrence, R.J. Chromatin turn ons and turn offs of ribosomal RNA genes / R.J. Lawrence, C.S. Pikaard // *Cell Cycle.* – 2004. – Vol. 3. – P. 880–883.
178. Lee, M. The Chromosomal basis of somaclonal variation / M. Lee, R.L. Phillips // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1988. – Vol. 39. – P. 413–437.
179. Lee, H.O. Endoreplication: polyploidy with purpose / H.O. Lee, J.M. Davidson, R.J. Duronio // *Genes Dev.* – 2009. – Vol. 23. – P. 2461–2477.
180. Leitch, I. J. Genome downsizing in polyploid plants / I.J. Leitch, M.D. Bennett // *Biological Journal of the Linnean Society.* – 2004. – Vol. 82. – P. 651–663.
181. Li, Q. Transcriptome analysis of callus from *Picea balfouriana* [Электронный ресурс] / Q. Li, S. Zhang, J. Wang // *BMC Genomics.* – 2014. – Vol. 15. – No. 553. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-553>
182. Li, R. Tissue culture – induced morphological somaclonal variation in St. Augustinegrass [*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze] / R. Li, A.H. Bruneau, R. Qu // *Plant Breed.* – 2010. – Vol. 129. – P. 96–99.
183. Li, X. A large insertion in bHLH transcription factor BrTT8 resulting in yellow seed coat in *Brassica rapa* [Электронный ресурс] / X. Li, L. Chen, M. Hong, Y. Zhang, F. Zu, J. Wen, B. Yi, C. Ma, J. Shen, J. Tu, T. Fu // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – No. e44145. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044145>
184. Lim, K.Y. Gene conversion of ribosomal DNA in *Nicotiana tabacum* is associated with undermethylated, decondensed and probably active gene units / K.Y. Lim, A. Kovarik, R. Matyasek, M. Bezdek, C.P. Lichtenstein, A.R. Leitch // *Chromosoma.* – 2000. – Vol. 109. – P. 161–172.
185. Lim, W.L. Endopolyploidy in *Vanda Miss Joaquim* (*Orchidaceae*) / W.L. Lim, C.S. Loh // *New Phytol.* – 2003. – Vol. 159. – P. 279–287.
186. Lincoln, C. A knotted1 – like homeobox gene in Arabidopsis is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants / C. Lincoln, J. Long, J. Yamaguchi, K. Serikawa, S. Hake // *Plant*

Cell. – 1994. – Vol. 6. – P. 1859–1876.

187. LoSchiavo, F. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs / F. LoSchiavo, L. Pitto, G. Giuliano, G. Torti, V. Nuti-Ronchi, D. Marazziti, R. Vergara, S. Orselli, M. Terzi // *Theor. Appl. Genet.* – 1989. – Vol. 77. – P. 325–331.

188. Loureiro, J. Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry / J. Loureiro, G. Pinto, T. Lopes, J. Doležel, C. Santos // *Planta.* – 2005. – Vol. 221. – P. 815–822.

189. Loureiro, J. Micropropagation of *Juniperus phoenicea* from adult plant explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry / J. Loureiro, A. Capelo, G. Brito, E. Rodriguez, S. Silva, G. Pinto, C. Santos // *Biol. Plant.* – 2007. – Vol. 51. – P. 7–14.

190. Lynch, P.T. The phenotypic characterisation of R2 generation transgenic rice plants under field and glasshouse conditions / P.T. Lynch, J. Jones, N.W. Blackhall, M.R. Davey, J.B. Power, E.C. Cocking, M.R. Nelson, D.M. Bigelow, T.V. Orum, C.E. Orth, W. Schuh // *Euphytica.* – 1995. – Vol. 85. – P. 395–401.

191. Machczyńska, J. Tissue culture – induced genetic and epigenetic variation in triticale (\times *Triticosecale* sP. Wittmack ex A. Camus 1927) regenerants / J. Machczyńska, J. Zimny, P.T. Bednarek // *Plant Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 89. – No. 3. – P. 279–292.

192. Magori, S. Epigenetic control of *Agrobacterium* T-DNA integration / S. Magori, V. Citovsky // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1809. – P. 388–394.

193. Makarevitch, I. Complete sequence analysis of transgene loci from plants transformed via microprojectile bombardment / I. Makarevitch, S.K. Svtashev, D.A. Somers // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 52. – P. 421–432.

194. Mandal, A. Isoenzyme markers in varietal identification of banana / A. Mandal, A. Maiti, B. Chowdhury, R. Elanchezhian // *In Vitro Cell Dev. Biol. - Plant.* – 2001. – Vol. 37. – P. 599–604.

195. Maraschin, S.F. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective / S.F. Maraschin, W. de Priester, H.P. Spaink, M. Wang // *J. Exp. Bot.* – 2005. – Vol. 56. – P. 1711–1726.

196. Marconi, G. Use of MSAP markers to analyse the effects of salt stress on DNA methylation in rapeseed (*Brassica napus* var. *oleifera*) [Электронный ресурс] / G. Marconi, R. Pace, A. Traini, L. Raggi, S. Lutts, M. Chiusano, M. Guiducci, M. Falcinelli, P. Benincasa, E. Albertini // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8. – No. e75597. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075597>
197. Marie, D. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species / D. Marie, S.C. Brown // Biol. Cell. – 1993. – Vol. 78. – P. 41–51.
198. Martin, K.P. Plant regeneration through somatic embryogenesis on *Holostemma adakodien*, a rare medicinal plant / K.P. Martin // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2003. – Vol. 72. – P. 79–82.
199. Martins, M. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers / M. Martins, D. Sarmento, M.M. Oliveira // Plant Cell Rep. – 2004. – Vol. 23. – P. 492–496.
200. Masoud, S. Cytogenetic analysis of somaclonal variation in regenerated plants of Berseem clover (*Trifolium alexandrinum* L.) / S. Masoud, A. Hamta // Caryologia. – 2008. – Vol. 61. – No. 4. – P. 392–396.
201. Mersereau, M. Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation / M. Mersereau, G. Pazour, A. Das // Gene. – 1990. – Vol. 90. – No. 1. – P. 149–151.
202. Miler, N. Somaclonal variation of *Chrysanthemum* propagated *in vitro* from different explants types / N. Miler, M. Zalewska // Acta Scien. Polon. Hort. Cult. – 2014. – Vol. 13. – No. 2. – P. 69–82.
203. Miyao, A. Molecular spectrum of somaclonal variation in regenerated rice revealed by whole – genome sequencing / A. Miyao, M. Nakagome, T. Ohnuma, H. Yamagata, H. Kanamori, Y. Katayose, A. Takahashi, T. Matsumoto, H. Hirochika // Plant Cell Physiol. – 2012. – Vol. 53. – P. 256–264.
204. Mori, S. Somaclonal variation and stability of GUS gene expression in transgenic agapanthus (*Agapanthus praecox* ssp. *orientalis*) plants at the flowering stage / S. Mori, E. Oka, H. Umehara, S. Suzuki, H. Kobayashi, Y. Hoshi, M. Kondo, Y. Koike, M. Nakano // In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. – 2007. – Vol. 43. – P. 79–87.

205. Moss, T. A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis / T. Moss, F. Langlois, T. Gagnon-Kugler, V. Stefanovsky // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2007. – Vol. 64. – P. 29–49.
206. Mugnier, J. Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes* / J. Mugnier // *Plant Cell Rep.* – 1988. – No. 7. – P. 9–12.
207. Mujib, A. Callus induction, somatic embryogenesis and chromosomal instability in tissue cultureraised hippeastrum (*Hippeastrum hybridum* cv. United Nations) / A. Mujib, S. Banerjee, P. Dev Ghosh // *Propag. Ornament. Plants.* – 2007. – Vol. 7. – P. 169–174.
208. Müller, E. DNA variation in tissue – culture – derived rice plants / E. Müller, P.T.H. Brown, S. Hartke, H. Lörz // *Theor. Appl. Genet.* – 1990. – Vol. 80. – P. 673–679.
209. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – No. 13. – P. 473–497.
210. Muthusamy, A. Radiation and chemical mutagen induced somaclonal variations through *in vitro* organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) / A. Muthusamy, N. Jayabalan // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2014. – Vol. 90. – P. 1229–1239.
211. Nacry, P. Major chromosomal rearrangements induced by T – DNA transformation in *Arabidopsis* / P. Nacry, C. Camilleri, B. Courtial, M. Caboche, D. Bouchez // *Genetics.* – 1998. – Vol. 149. – P. 641–650.
212. Nakano, M. Somaclonal variation in *Tricyrtis hirta* plants regenerated from 1 – year-old embryogenic callus cultures / M. Nakano, T. Nomizu, K. Mizunashi, M. Suzuki, S. Mori, S. Kuwayama, M. Hayashi, H. Umehara, E. Oka, H. Kobayashi, M. Asano, S. Sugawara, H. Takagi, H. Saito, M. Nakata, T. Godo, Y. Hara, J. Amano // *Sci. Hortic.* – 2006. – Vol. 110. – P. 366–371.
213. Navajas-Pérez, R. The origin and evolution of the variability in a Y-specific satellite-DNA of *Rumex acetosa* and its relatives / R. Navajas-Pérez, T. Schwarzacher, R. de la Herrán, C. Ruiz Rejón, M. Ruiz Rejón, M.A. Garrido-Ramos // *Gene.* – 2006. – Vol. 368. – P. 61–71.

214. Neelakandan, A.K. Recent progress in the understanding of tissue culture – induced genome level changes in plants and potential applications / A.K. Neelakandan, K. Wang // *Plant Cell Rep.* – 2012. – Vol. 31. – P. 597–620.
215. Negrutiu, I. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions / I. Negrutiu, R. Shillito, I. Potrykus, G. Biasini, F. Sala // *Plant Mol. Biol.* – 1987. – No. 8. – P. 363–373.
216. Nehra, N.S. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry / N.S. Nehra, K.K. Kartha, C. Stushnott, K.L. Giles // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 1992. – Vol. 29. – P. 257–268.
217. Nocarova, E. Successive silencing of tandem reporter genes in potato (*Solanum tuberosum*) over 5 years of vegetative propagation / E. Nocarova, Z. Opatrny, L. Fischer // *Ann. Bot.* – 2010. – Vol. 106. – P. 565–572.
218. Novak, F.J. The changes of karyotypes in callus cultures of *Allium sativum* L. / F.J. Novak // *Caryologia.* – 1976. – Vol. 27. – P. 45–54.
219. Nybom, H. DNA fingerprinting in botany: past, present, future / Nybom H, K. Weising, B. Rotter // *Invest. Genet.* – 2014. – Vol. 5. – P. 1–35.
220. Ochatt, S.J. Ploidy level determination within the context of *in vitro* breeding / S.J. Ochatt, E.M. Patat-Ochatt, A. Moessner // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2011. – Vol. 104. – P. 329–341.
221. Orbović, V. Analysis of genetic variability in various tissue culture – derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry / V. Orbović, M. Čalović, Z. Vilorija, B. Nielsen, F.G. Gmitter, W.S. Castle, J.W. Grosser // *Euphytica.* – 2008. – Vol. 161. – P. 329–335.
222. Orłowska, R. DNA methylation changes and TE activity induced in tissue cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) / R. Orłowska, J. Machczyńska, S. Oleszczuk, J. Zimny, P.T. Bednarek // *J. Biol. Res. (Thessalon).* – 2016. – Vol. 23. – No. 19.
223. Ossowski, S. The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana* / S. Ossowski, K. Schneeberger, J.I. Lucas-Lledo, N. Warthmann, R.M. Clark, R.G. Shaw, D. Weigel, M. Lynch // *Science.* – 2010. – Vol. 327. – P. 92–

94.

224. Otto, F. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA / F. Otto // *Methods in Cell Biology*. – 1990. – Vol. 33. – P. 105–110.

225. Pace, L.G. 2009. *In vitro* plant regeneration and clonal micropropagation of *Leontopodium nivale* (Ten.) Heut ex Hand-Mazz.(Asteraceae) / L.G. Pace, A.A. Bruno, L. Spano // *Plant Biosystems*. – 2009. – Vol. 143. – P. 12–16.

226. Palomino, G. Nuclear genome stability of *Mammillaria san – angelensis* (Cactaceae) regenerants induced by auxins in long – term *in vitro* culture / G. Palomino, J. Doležel, R. Cid, I. Brunner, I. Mendez, A. Rubluo // *Plant Sci*. – 1999. – Vol. 141. – P. 191–200.

227. Park, K.I. A bHLH regulatory gene in the common morning glory, *Ipomoea purpurea*, controls anthocyanin biosynthesis in flowers, proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in seeds, and seed trichome formation / K.I. Park, N. Ishikawa, Y. Morita, J.D. Choi, A. Hoshino, S. Iida // *Plant J*. – 2007. – Vol. 49. – No. 4. – P. 641–654.

228. Paszkowski, J. Plant gene vectors and genetic transformation: DNA-mediated direct gene transfer to plants / J. Paszkowski, M.W. Saul, I. Potrykus // *Molecular Biology of Plant Nuclear Genes*. – 1989. – Vol. – P. 51–68.

229. Peakall, R. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update / R. Peakall, P.E. Smouse // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28. – P. 2537–2539.

230. Peyvandi, M. Molecular analysis of genetic stability in long – term micropropagated shoots of *Olea europaea* L. (cv. Dezful) / M. Peyvandi, Z. Noormohammadi, O. Banihashemi, F. Farahani, A. Majd, M. Hosseini-Mazinani, M. Sheidai // *Asian J. Plant Sci*. – 2009. – Vol. 8. – P. 146–152.

231. Pfosser, M. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat – rye addition lines / M. Pfosser, A. Amon, T. Lelley, E. Heberle-Bors // *Cytometry*. – 1999. – Vol. 21. – No. 4. – P. 387–393.

232. Phinney, B. Gibberellin A1 dwarfism and shoot elongation in higher plants / B. Phinney // *Biol. Plant*. – 1985. – Vol. 27. – P. 172–179.

233. Prasher, D.C. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein / D.C. Prasher, V.K. Eckenrode, W.W. Ward, F.G. Prendergast, M.J. Cormier // *Gene*. – 1992. – Vol. 111. – P. 229–233.
234. Pritchard, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J.K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // *Genetics*. – 2000. – Vol. 155. – P. 945–959.
235. Quiroz-Figueroa, F.R. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants / F.R. Quiroz-Figueroa, R. Rojas-Herrera, R.M. Galaz-Avalos, V.M. Loyola-Vargas // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2006. – Vol. 86. – P. 285–301.
236. Raimondi, J.P. Assessment of somaclonal variation in asparagus by RAPD fingerprinting and cytogenetic analyses / J.P. Raimondi, R.W. Masuelli, E.L. Camadro // *Sci. Hortic.* – 2001. – Vol. 90. – P. 19–29.
237. Rakosy-Tican, E. *In vitro* culture and medium-term conservation of the rare wild species *Gladiolus imbricatus* / E. Rakosy-Tican, B. Bors, A.M. Szatmari // *African J. Biotech.* – 2012. – Vol. 11. – P. 14703–14712.
238. Ramakrishnan, R. *In vitro* propagation and conservation of useful endangered medicinal plants with anticancer activity / R. Ramakrishnan, R. Periyasamy, S. Lakkakula, P. Subramani, S.R. Arockiam // *J. Mol. Biol. Biotech.* – 2017. – Vol. 2. – No. 3. – P. 8.
239. Rameshkumar, R. *In vitro* mass propagation and conservation of *Nilgirianthus ciliatus* through nodal explants: A globally endangered, high trade medicinal plant of Western Ghats / R. Rameshkumar, M.J.V. Largia, L. Satish, J. Shilpha, M. Ramesh // *Plant Biosystems*. – 2016. – Vol. 151. – P. 204–211.
240. Reed, B.M. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools / B.M. Reed, V. Sarasan, M. Kane, E. Bunn, V. Pence // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* – P. – 2011. – Vol. 47. – P. 1–4.
241. Rewers, M. *In vitro* regenerated wetland sedge *Eriophorum vaginatum* L. is genetically stable / Rewers M, Drouin J, Kisiala A, Sliwinska E, Cholewa E // *Acta Physi. Plant.* – 2012. – Vol. 34. – P. 2197–2206.
242. Rivera, F.N. Protein and isoenzyme banding patterns among Philippine cooking

- bananas and their wild parents (*Musa species*) / F.N. Rivera // *Paradisiaca*. – 1983. – Vol. 6. – P. 7–12.
243. Rodrigues, P.H.V. Influence of the number of subcultures on somoclonal variation in micropropagated Nanico (*Musa* sP., AAA group) / P.H.V. Rodrigues, A. T. Neto, P.C. Neto, B.M.J. Mendes // *Acta Hortic.* – 1998. – Vol. 490. – P. 469–473.
244. Rodriguez-Enriquez, J. MicroRNA misregulation: an overlooked factor generating somaclonal variation? / J. Rodriguez-Enriquez, H.G. Dickinson, R.T. Grant-Downton // *Trend Plant Sci.* – 2011. – Vol. 16. – P. 242–248.
245. Rodríguez-López, C.M. Progressive erosion of genetic and epigenetic variation in callus-derived cocoa (*Theobroma cacao*) plants / C.M. Rodríguez-López, A.C. Wetten, M. J. Wilkinson // *New Phytol.* – 2010. – Vol. 186. – P. 856–868
246. Ronchi, V.N. Ploidy reduction and genome segregation in cultured carrot cell lines. II. Somatic meiosis / V.N. Ronchi, L. Giorgetti, M. Tonelli, G. Martini // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 1992. – Vol. 30. – P. 115-119.
247. Sabot, F. Transpositional landscape of the rice genome revealed by paired-end mapping of high-throughput re-sequencing data / F. Sabot, N. Picault, M. El-Baidouri, C. Liauro, C. Chaparro, B. Piegu, A. Roulin, E. Guiderdoni, M. Delabastide, R. McCombie, O. Panaud // *The Plant J.* – 2011. – Vol. 66. – P. 241–246.
248. Sala, F. Somaclonal variation in transgenic plants / F. Sala, A. Arencibia, S. Castiglione, H. Yifan, M. Labra, C. Savini, M. Bracale, N. Pelucchi // *Acta Hortic.* – 2000. – Vol. 530. – P. 411–419.
249. Sallaud, C. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics / C. Sallaud, D. Meynard, J. van Boxtel, C. Gay, M. Bès, J.P. Brizard, P. Larmande, D. Ortega, M. Raynal, M. Portefaix, P.B.F. Ouwerkerk, S. Rueb, M. Delseny, E. Guiderdoni // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – Vol. 106. – P. 1396–1408.
250. Sandoval, J. Distribution of endogenous gibberellins in dwarf and giant off – types banana (*Musa* AAA cv. ‘Grand nain’) plants from *in vitro* propagation / J. Sandoval, F. Kerbellec, F. Cote, P. Dumas // *Plant Growth Regul.* – 1995. – Vol. 17. – P. 219–224.

251. Sarasan, V. Conservation *in vitro* of threatened plants - Progress in the past decade / V. Sarasan, R. Cripps, M. Ramsay, C. Atherton, M. McMichen, G. Prendergast, J.K. Rowntree // *In Vitro Cell. Dev.*—P. — 2006. — Vol. 42. — P. 206–214.
252. Schnell, J. A comparative analysis of insertional effects in genetically engineered plants: considerations for pre – market assessments / J. Schnell, M. Steele, J. Bean, M. Neuspiel, C. Girard, N. Dormann, C. Pearson, A. Savoie, L. Bourbonnière, P. Macdonald // *Transgenic Res.* — 2015. — Vol. 24. — P. 1–17.
253. Scholes, D.R. Plasticity in ploidy: a generalized response to stress / D.R. Scholes, K.N. Paige // *Trends Plant Sci.* — 2015. — Vol. 20. — P. 165–175.
254. Scholes, D.R. The genetic basis of overcompensation in plants: A synthesis. / D.R. Scholes, M.H. Siddappaji, K.N Paige // *Int. J. Modern Bot.* — 2013. — Vol. 3. — P. 34–42.
255. Schwartz, S. Human-mouse alignments with BLASTZ / W.J. Kent, A. Smit, Z. Zhang, R. Baertsch, R.C. Hardison, D. Haussler, W. Miller // *Genome Research.* — 2003. — Vol. 13. — P. 103–107.
256. Senapati, S.K. Improved *in vitro* clonal propagation of *Rauwolfia serpentina* L. Benth - An endangered medicinal plant / S.K. Senapati, N. Lahere, B.N. Tiwary // *Plant Biosystems.* — 2014. — Vol. 148. — P. 885–888.
257. Sharma, S. Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment / S. Sharma, G. Bryan, M. Winfield, S. Millam // *Planta.* — 2007. — Vol. 226. — P. 1449–1458.
258. Shillito, R.D. Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast – derived colonies in a number of plant species / R.D. Shillito, J. Paszkowski, I. Potrykus // *Plant Cell Rep.* — 1983. — No. 2. — P. 244–247.
259. Shinoyama, H. Insect resistance in transgenic chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] by the introduction of a modified δ – endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* / H. Shinoyama, A. Mochizuki, M. Komano, Y. Nomura, T. Nagai // *Breed. Sci.* — 2003. — No. 52. — P. 43–50.

260. Shrawat, A.K. Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) / A.K. Shrawat, D. Becker, H. Lorz // Plant Sci. – 2007. – Vol. 172. – P. 281–290.
261. Singh, R.B. A dioecious polyploid in *Rumex acetosella* / R.B. Singh // J. Hered. – 1968. – Vol. 59. – No. 3. – P. 168–170.
262. Singh, S.R. Evaluation of genetic fidelity of *in vitro* raised plants of *Dendrocalamus asper* (Shult. & Shult. F.) Backer ex K. Heyne using DNA – based markers / S.R. Singh, S. Dalal, R. Singh, A.K. Dhawan, R.K. Kalia // Acta Physiol. Plant. – 2013. – Vol. 35. – P. 419–430.
263. Sinha, N.R. Overexpression of the maize homeobox gene, KNOTTED-1, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates / N.R. Sinha, R.E. Williams, S. Hake // Genes Dev. – 1993. – Vol. 7. – P. 787–795.
264. 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.
265. 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.
266. 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 Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University. – 2016. – Vol. 6. – P. 319–323.
267. Škof, S. Detection of the reporter and selection genes in transformed hop (*Humulus lupulus* L.) / S. Škof, Z. Luthar // Acta agriculturae Slovenica. – 2005. – Vol. 85. – P. 351–358.
268. Skoog, F. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* / F. Skoog, C. Miller // Symp. Soc. Exp. Biol. – 1957. – Vol. 11. – P. 118–131.

269. Slazak, B. Micropropagation of *Viola uliginosa* (Violaceae) for endangered species conservation and for somaclonal variation – enhanced cyclotide biosynthesis / B. Slazak, E. Sliwinska, M. Saługa, M. Ronikier, J.B. Słomka, U. Kuta // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2015. – Vol. 120. – P. 179–190.
270. Ślesak, H. Female versus male: *Rumex thyrsiflorus* Fingerh. under *in vitro* conditions. Does sex influence *in vitro* morphogenesis? / H. Ślesak, K. Dziedzic, D. Kwolek, M. Cygan, P. Mizia, P. Olejniczak, A.J. Joachimiak // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2017. – Vol. 129. – I. 3. – P. 521 – 532.
271. Sliwinska, E. Polysomaty in growing *in vitro* sugar – beet (*Beta vulgaris* L.) seedlings of different ploidy level / E. Sliwinska, E. Lukaszewska // Plant Sci. – 2005. – Vol. 168. – P. 1067–1074.
272. Smirnov, S. Spontaneous hybridization among *Allium tulipifolium* and *A. robustum* (*Allium* subg. *Melanocrommyum*, *Amaryllidaceae*) under cultivation / S. Smirnov, M. Skaptsov, A. Shmakov, R.M. Fritsch, N. Friesen // Phytotaxa. – 2017. – Vol. 301. – No. 2. – P. 155–164.
273. Smith, E.F. A plant – tumor of bacterial origin / E.F. Smith, C.O. Townsend // Science. – 1907. – Vol. 25. – P. 671–673.
274. Smulders, M. Epigenetics in plant tissue culture / M. Smulders, G. de Klerk // Plant Growth Regul. – 2011. – Vol. 63. – P. 137–146.
275. Spencer, M. The challenges of developing cryopreservation strategies to suit the requirements of a large industrial *in vitro* plant cell collection / M. Spencer // Cryobiology. – 1999. – Vol. 39. – P. 325.
276. Spiridonova, E.V. Dynamics of changes in the genome of callus tissues of *Rauwolfia serpentina* upon a switch to conditions of submerged cultivation / E.V. Spiridonova, D.M. Adnofi, O. Andreev, V.A. Kunakh // Cytology and genetics. – 2007. – Vol. 42. – No. 2. – P. 101–106.
277. Srivastava, S. Genetic relationship and clustering of some sugarcane genotypes based on esterase, peroxidase and amylase isozyme polymorphism / S. Srivastava, P.S. Gupta, B.L. Srivastava // Cytologia. – 2005. – Vol. 70. – P. 355–363.
278. Stachel, S.E. Identification of the signal molecules produced by wounded plant

- cells that activate T – DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens* / S.E. Stachel, E. Messens, M.V. Montagu, P.C. Zambryski // *Nature*. – 1985. – Vol. 318. – P. 624–629.
279. Stapley, J. Transposable elements as agents of rapid adaptation may explain the genetic paradox of invasive species / J. Stapley, A.W. Santure, S.R. Dennis // *Mol. Ecol.* – 2015. – Vol. 24. – P. 2241–2252.
280. Stewart, C.N.J. *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques and Applications* / C.N.J. Stewart. – New Jersey: John Wiley & Sons, 2008. – 352 p.
281. Stroud, H. Plants regenerated from tissue culture contain stable epigenome changes in rice [Электронный ресурс] / H. Stroud, B. Ding, S.A. Simon, S. Feng, M. Bellizzi, M. Pellegrini // *Elife*. – 2013. – Vol. 2. – No. e00354. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.00354>
282. Sugiyama, M. Organogenesis *in vitro* / M. Sugiyama // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 1999. – Vol. 2. – P. 61–64.
283. Sun, S. Tissue culture – induced somaclonal variation of decreased pollen viability in *Torenia fournieri* Lind. [Электронный ресурс] / S. Sun, J. Zhong, S. Li, X. Wang // *Bot. Stud.* – 2013. Vol. 54. No. 36. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1186/1999-3110-54-36>
284. Tanurdzic, M. Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture / M. Tanurdzic, M.W. Vaughn, H. Jiang, T.J. Lee, R.K. Slotkin, B. Sosinski, W.F. Thompson, R.W. Doerge, R.A. Martienssen // *PLoS Biol.* – 2008. – Vol. 6. – No. 12. – P. 2880–2895.
285. Temel, A. Analysis of retrotransposition and DNA methylation in barley callus culture / A. Temel, N. Gozukirmizi // *Acta Biol. Hung.* – 2013. – Vol. 64. – No. 1. – P. 86–95.
286. Tenea, G.N. Host chromatin proteins towards increasing susceptibility to *Agrobacterium* – mediated genetic transformation / G.N. Tenea // *Rom. Biotech. Lett.* – 2012. – Vol. 17. – P. 7373–7378.
287. Thiem, B. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) *in vitro* cultures / B. Thiem, E. Sliwinska // *Plant Sci.* – 2003. – Vol. 164. – P. 129–134.

288. Thiem, B. Phenolic acid and DNA contents of micropropagated *Eryngium planum* L. / B. Thiem, M. Kikowska, A. Krawczyk, B. Więckowska, E. Sliwiska // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2013. – Vol. 114. – P. 197–206.
289. Thomas, J. Metabolite profiling and characterization of somaclonal variants in tea (*Camellia* sp.) for identifying productive and quality accession / J. Thomas, R. Kumar, A.K.A. Mandal // *Phytochemistry.* – 2006. – Vol. 67. – P. 1136–1142.
290. Thomashow, M.F. Identification of a new virulence locus in *Agrobacterium tumefaciens* that affects polysaccharide composition and plant cell attachment / M.F. Thomashow, J.E. Karlinsey, J.R. Marks, R.E. Hurlbert // *J. Bacteriol.* – 1987. – Vol. 169. – P. 3209–3216.
291. Todd, J. The role of auxin in plant embryogenesis / J. Todd, R. Cooke, H. Racusen, J.D. Cohen // *The Plant Cell.* – 1993. – Vol. 5. – P. 1494–1495.
292. Townsley, B.T. KNOX1 genes regulate lignin deposition and composition in monocots and dicots [Электронный ресурс] / B.T. Townsley, N.R. Sinha, J. Kang // *Front. Plant Sci.* – 2013. – Vol. 4. – No. 121. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00121>
293. Trader, B.W. Somaclonal variation of *Coreopsis* regenerated from leaf explants / B.W. Trader, H.H. Gruszewski, H.L. Scoggins, R.E. Veilleux // *Hort. Sci.* – 2006. – Vol. 41. – No. 3. – P. 749–752.
294. Tsuda K. KNOTTED1 Cofactors, BLH12 and BLH14, regulate internode patterning and vein anastomosis in maize / K. Tsuda, M-J. Abraham-Juarez, A. Maeno, Z. Dong, D. Aromdee, R. Meeley, T. Shiroishi, K. Nonomura, S. Hake // *The Plant Cell.* – 2017. – Vol. 29. – P. 1105–1118.
295. Tzfira, T. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium* / T. Tzfira, V. Citovsky // *Trends Mol. Biol.* – 2002. – Vol. 12. – P. 121–129.
296. Valledor, L. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation / L. Valledor, R. Hasbún, M. Meijón, J. Rodríguez, E. Santamaría, M. Viejo, M. Berdasco, I. Feito, M. Fraga, M. Cañal, R. Rodríguez // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2007. – Vol. 91. – P. 75–86

297. Vasic, D. Protocols for efficient repetitive and secondary somatic embryogenesis in *Helianthus maximiliani* / D. Vasic, G. Alibert, D. Skoric // *Plant Cell Rep.* – 2001. – Vol. 20. – P. 121–125.
298. Vazquez, A.M. Insight into somaclonal variation / A.M. Vazquez // *Plant. Bios.* – 2001. – Vol. 135. – P. 57–62.
299. Vázquez, R. Stress and Somaclonal Variation / R. Vázquez, A.M. Linacero // *Plant Dev. Biol.* – 2010. – Vol. 2. – P. 45–64.
300. Venkatesh, T.V. Compositional differences between near – isogenic GM and conventional maize hybrids are associated with backcrossing practices in conventional breeding / T.V. Venkatesh, K. Cook, B. Liu, T. Perez, A. Willse, R. Tichich, P. Feng, G.G. Harrigan // *Plant Biotechnol. J.* – 2014. – Vol. 13. – P. 200–210.
301. Viehmannova, I. Assessment of somaclonal variation in somatic embryo – derived plants of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (PoeP. and Endl.) H. Robinson] using inter simple sequence repeat analysis and flow cytometry / I. Viehmannova, Z. Bortlova, B. Vitamvas, P.H. Cepkova, K. Eliasova, E. Svobodova, M. Travnickova // *El. J. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 17. – P. 102–106.
302. Vollbrecht, E. The developmental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family / E. Vollbrecht, B. Veit, N. Sinha, S. Hake // *Nature.* – 1991. – Vol. 350. – P. 241–243.
303. von Arnold, S. Developmental pathways of somatic embryogenesis / S. von Arnold, I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok, L. Filonova // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2002. – Vol. 69. – P. 233–249.
304. Vos, P. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting / P. Vos, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – Vol. 23. – P. 4407–4414.
305. Waldron, J. Randomly amplified DNA fingerprinting: a culmination of DNA marker technologies based on arbitrarily – primed PCR amplification / J. Waldron, C.P. Peace, I.R. Searle, A. Furtado, N. Wade, I. Findlay, M.W. Graham, B.J. Carroll // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 3. – P. 141–150.
306. Wang, Q. An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection / Q. Wang, L. Wang // *Plant Cell Rep.* – 2012. – Vol. 31. – P. 1535–1547.

307. Wang, Q.M. Direct and indirect organogenesis of *Clivia miniata* and assessment of DNA methylation changes in various regenerated plantlets / Q.M. Wang, Y.Z. Wang, L.L. Sun, F.Z. Gao, W. Sun, J. He, X. Gao, L. Wang // *Plant Cell Rep.* – 2012. – Vol. 31. – P.1283–1296.
308. Wang, X. Somatic embryo induction and plant regeneration in American Ginseng (*Panax quinquefolium* L.): M. Sc. Thesis / Xiaolan Wang. – Guelph., 1997. – 193 p.
309. Wegiera, M. Antimicrobial activity of the extracts from fruits of *Rumex* L. species / M. Wegiera, U. Kosikowska, A. Malm, H. Smolarz // *Open Life Sciences.* – 2011. – Vol. 6. – I. 6. – P. 1036–1043.
310. Wei, F. Somaclonal variation does not preclude the use of rice transformants for genetic screening / F. Wei, L. Kuang, H. Oung, S. Cheng, H. Wu, L. Huang, Y. Tseng, W. Chiou, V. Hsieh-Feng, C. Chung, S. Yu, L. Lee, S.B. Gelvin, Y.C. Hsing // *Plant J.* – 2016. – Vol. 85. – P. 648–659.
311. Weinhold, A. Progressive 35S promoter methylation increases rapidly during vegetative development in transgenic *Nicotiana attenuata* plants [электронный ресурс] / A. Weinhold, M. Kallenbach, I. Thomas, T.I. Baldwin // *BMC Plant Biol.* – 2013. – Vol. 13. – No. 99. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-13-99>
312. Weising, K. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications / K. Weising, H. Nybom, K. Wolff, G. Kahl. – New York: CRC Press, 2005. – 472 p.
313. Wessler, S.R. Turned on by stress. Plant retrotransposons / S.R. Wessler // *Curr. Biol.* – 1996. – Vol. 6. – No. 8. – P. 959–961.
314. Wetherell, D.F. Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells / D.F. Wetherell // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 1994. – Vol. 5. – P. 221–227.
315. Williams, J.G. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers / J.G. Williams, A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, S.V. Tingey // *Nucleic Acid Res.* – 1990. – Vol. 18. – P. 6531–6535.
316. Wilson, G.B.V. Segregation and reduction in somatic tissues. II. The separation of homologous chromosomes in *Trillium* species / G.B.V. Wilson, K. Cheng // *J. Hered.* – 1949. – Vol. 40. – P. 3–6.

317. Wise, A.A. Culture and maintenance of agrobacterium strains / A.A. Wise, Z. Liu, A.N. Binns // *Methods in molecular biology*. – 2006. – No. 343. – P. 3–13.
318. Woo, H.R. Natural variation in DNA methylation in ribosomal RNA genes of *Arabidopsis thaliana* [Электронный ресурс] / H. R. Woo, E. J. Richards // *BMC Plant Biol.* – 2008. – Vol. 8. – No. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/92.10.1186/1471-2229-8-92>
319. Wuddineh, W.A. Identification and overexpression of a knotted1-like transcription factor in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) for lignocellulosic feedstock improvement [Электронный ресурс] / W.A. Wuddineh, M. Mazarei, J-Y. Zhang, G.B. Turner, R.W. Sykes, S.R. Decker, M.F. Davis, M.K. Udvardi, C.N. Stewart // *Front. Plant Sci.* – 2016. – Vol. 7. – No. 520. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00520>
320. Yang, M. Systemic endopolyploidy in *Spathoglottis plicata* (*Orchidaceae*) development [Электронный ресурс] / M. Yang, C.S. Loh // *BMC Cell Biol.* – 2004. – Vol. 5. – No. 33. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2121-5-33>
321. Ye, J. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction [Электронный ресурс] / Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T // *BMC Bioinformatics.* – 2012. – Vol. 13. – No. 134. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
322. Yilmaz, S. Variation of retrotransposon movement in callus culture and regenerated shoots of barley / S. Yilmaz, N. Gozukirmizi // *Biotechnology and Biotechnological Equipment.* – 2013. – Vol. 27. – No. 6. – P. 4227–4230.
323. Zaid, A. Plant – off types in tissue culture – derived date palm (*Phoenix dactylifera* L.) / A. Zaid, H. Al Kaabi // *Emirates J. Agric. Sci.* – 2003. – Vol. 15. – P. 17–35.
324. Zhang, J. Spontaneous interspecific hybridization and patterns of pollen dispersal in ex situ populations of a tree species (*Sinojackia xylocarpa*) that is extinct in the wild / J.J. Zhang, Q.G. Ye, X.H. Yao, H.W. Huang // *Conserv. Biol.* – 2010. – Vol. 24. – N. 1. – P. 246–255.
325. Zhang, S. Expression of CDC2Zm and KNOTTED1 during *in vitro* axillary shoot

meristem proliferation and adventitious shoot meristem formation in maize (*Zea mays* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) / S. Zhang, R. Williams-Carrier, D. Jackson, P.G. Lemaux // *Planta*. – 1998. – Vol. 204. – P. 542–549.

326. Ziemienowicz, A. Agrobacterium – mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances / A. Ziemienowicz // *Biocatal. Agricult. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 3. – P. 95–102.

327. Ziemienowicz, A. Plant selectable markers and reporter genes / A. Ziemienowicz // *Acta Phisiol. Plant.* – 2001. – Vol. 23. – P. 363–374.