

На правах рукописи



СОЛОВЬЕВА

Александра Ивановна

**Оценка variability ДНК-маркеров
в каллусной ткани пшеницы
(*Triticum aestivum* L.) после криосохранения**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в лаборатории генетики культивируемых клеток и группе криосохранения Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Долгих Юлия Ивановна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,

профессор

Лось Дмитрий Анатольевич

доктор биологических наук

Веселова Татьяна Владимировна

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, г. Москва

Защита состоится «24» мая 2011 г. в 11 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (495) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «22» апреля 2011г.

Ученый секретарь

совета по защите докторских

и кандидатских диссертаций

кандидат биологических наук

М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время хранение культивируемых *in vitro* тканей растений при температуре жидкого азота (-196°C) рассматривается как самый надежный способ долговременного сохранения генетических ресурсов. Криогенное хранение позволяет снизить до минимума потерю ценных образцов и сократить материальные затраты на поддержание коллекций (Engelmann, 2004; Panis, Lambardi, 2005). Вместе с тем, криосохранение – сложная, многостадийная процедура, включающая подготовку клеток, дегидратацию, замораживание в жидком азоте и восстановление тканей, в ходе которых клетки испытывают стресс и в результате могут возникать генетические изменения. Существующие данные о влиянии замораживания в жидком азоте на геном культивируемых тканей растений довольно противоречивы. Во многих работах показана генетическая стабильность объектов после криосохранения (Harding, 2004; Panis, Lambardi, 2005), однако в ряде исследований были выявлены изменения последовательностей ДНК. Результаты этих работ позволяют говорить о возможности появления модификаций генома в ходе процедуры криогенного хранения, но до сих пор не ясно какие именно этапы криосохранения могут оказывать дестабилизирующее влияние на генотип.

При криосохранении растительного материала весьма перспективно применение метода дегидратации, поскольку он позволяет исключить использование дорогостоящих программных замораживателей, а также криопротекторов, обладающих токсичностью и способных оказывать дестабилизирующее воздействие на геном растений (Aronen *et al.*, 1999; Kaity *et al.*, 2008). Было целесообразно оценить возможность использования данного метода для сохранения в жидком азоте каллусных тканей яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.).

Воздействие отдельных этапов криосохранения с помощью метода дегидратации на генетическую стабильность тканей и органов растений, культивируемых *in vitro*, не было изучено. Между тем это имеет огромное значение при выборе способа сохранения растительных тканей. Все это явилось основанием для проведения нами работы в данной области.

Цель и задачи работы. Целью диссертационной работы было изучение влияния отдельных стадий процедуры криосохранения каллусов мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), выполненного методом дегидратации, на

стабильность ДНК восстановленного растительного материала.

В связи с этим был поставлен ряд задач:

1. Выбрать ДНК-маркеры для оценки генетического полиморфизма и осуществить подбор условий для проведения ПЦР.
2. Получить исходный растительный материал, однородный по ряду ДНК-маркеров.
3. Оценить влияние отдельных этапов процедуры криосохранения на жизнеспособность и морфогенетический потенциал каллусов яровой пшеницы.
4. Определить уровень изменчивости ДНК-маркеров каллусов и полученных из них растений-регенерантов после каждого из этапов криосохранения.

Научная новизна и практическая значимость. Впервые показано, что каллусы яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) способны восстанавливать свой рост после криосохранения по протоколу дегидратации. Проанализировано влияние отдельных этапов криосохранения с помощью метода дегидратации на генетическую стабильность, жизнеспособность и морфогенетический потенциал культивируемых тканей.

Единичные изменения генома, частота которых была менее 1%, обнаружены после этапа дегидратации. Остальные стадии криосохранения не вызывали изменения ДНК-маркеров. У растений, регенерированных из каллусов после каждого из этапов криосохранения, не выявлено вариаций генома.

Показана высокая степень выживаемости каллусов яровой пшеницы после криосохранения использованным методом. Уменьшение морфогенетической способности культивируемых тканей наблюдали после этапа дегидратации, однако восстановленные как после всей процедуры, так и после отдельных этапов криосохранения каллусы сохраняли способность к регенерации растений.

Низкая вероятность появления вариаций генома при криосохранении растительного материала по исследованному протоколу дегидратации указывает на перспективность этого метода для сохранения ценных клеточных линий.

Апробация результатов работы. Материалы диссертации были представлены на X Международной конференции “Биология культивируемых клеток растений и биотехнология” (Звенигород, 2008), Всероссийской школе-конференции

молодых ученых “Методы культивирования клеток” (Санкт-Петербург, 2008), VII Международной конференции “Молекулярная генетика соматических клеток” (Звенигород, Москва, 2009), III Всероссийской научно-практической конференции “Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира” (Волгоград, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из которых 3 в журналах, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 106 страницах машинописного текста, включает 15 таблиц, 4 схемы и 21 рисунок. Список литературы содержит 235 источников, из которых 217 на иностранном языке.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – растения и культивируемые ткани яровой пшеницы трех сортов: Энита, Новосибирская 22 и Кинельская 59.

Каллус получали из оснований листьев недельных проростков, незрелых зародышей, собранных на 14 день после опыления, и зрелых зародышей, разрезанных на несколько частей. Для индукции и культивирования каллусных тканей использовали среду Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962), дополненную 2 мг/л 2,4-Д, 3% сахарозы, 7% агара (среда МС-И). Индукцию каллусообразования проводили в течение трех недель в темноте при температуре $26\pm 2^\circ\text{C}$, Дальнейшее культивирование тканей проходило в стандартных условиях: $26\pm 2^\circ\text{C}$ и освещении (16 ч/сут, 2–3 клк).

Растения-регенеранты образовывались на среде МС-И, их пересаживали на среду МС без гормонов, культивировали в стандартных условиях.

При определении способности к образованию морфогенных каллусов анализировали по 20–90 эксплантов на вариант опыта, опыт проводили в двух повторностях.

Криосохранение каллусов проводили с помощью метода дегидратации, по протоколу, разработанному в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева

РАН для криосохранения *Fragaria × ananassa* (Высоцкая и др., 2007а) и модифицированному нами (Соловьева и др., 2010). Схема криосохранения каллусов представлена на Рис. 1.



Рис. 1. Схема криосохранения каллусов. *Среда Д - среда МС, дополненная 0.8 М сахарозы, 0.7% агара и регуляторами роста (Высоцкая и др., 2007а).

Оценка восстановления каллусных тканей после отдельных стадий криосохранения. Для определения влияния предварительного культивирования, высушивания и замораживания-оттаивания на жизнеспособность и морфогенетический потенциал растительного материала по окончании каждого этапа часть каллусов отсаживали и продолжали культивировать на среде МС-И. После 21 дня культивирования тканей на свету жизнеспособность образцов определяли визуально по числу каллусов, возобновлявших свой рост на питательной среде МС-И.

Определение содержания воды. Содержание воды в образцах определяли после их высушивания при температуре 104°С до постоянного веса и выражали в процентах от исходной массы каллусов.

Оценка способности каллусных тканей к морфогенезу. Частоту морфогенеза (отношение числа морфогенных каллусов к числу выживших каллусов) определяли

через 21 сут культивирования образцов из разных вариантов на свету.

Молекулярный анализ ДНК. Из проб растительного материала весом 50 мг выделяли ДНК по СТАВ методике (Moller *et al.*, 1992). Полиморфизм ДНК оценивали двумя ПЦР-методами – ISSR и REMAP, с помощью праймеров, комплементарных микросателлитным последовательностям и именуемых M1 – M7, а также их комбинаций с праймерами, комплементарными различным LTR-последовательностям ретротранспозонов пшеницы, именуемых Wis, Tar, Tager и Thv 19 (Queen *et al.*, 2004). Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 2%-м агарозном геле в TBE-буфере.

Анализ ДНК фрагмента. Полиморфные ПЦР-фрагменты препаративно выделяли из агарозного геля и очищали с использованием набора “Выделение ДНК из агарозных гелей на GlassMilk” (Силекс, Россия). Далее фрагмент клонировали в “Т-векторе” с использованием набора “pGEM-T Vector System” (Promega, USA). Выделение плазмиды из *E.coli* JM109 осуществляли с помощью набора реактивов “Wizard Plus Minipreps DNA Purification System” (Promega, USA). Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования “ГЕНОМ” ИМБ РАН. Для полиморфного фрагмента был осуществлен поиск сходных ДНК последовательностей с помощью программы (BLAST) по базам данных GenBank TIGR (Wheat Home) и Rice Genome Annotation Project на период сентябрь 2010 года.

Статистическая обработка данных. Достоверность отличий оценивали по *t*-критерию *F*-критерию Фишера при $P=0.95$. Для результатов опытов, включавших в себя повторности, рассчитано среднее квадратичное отклонение (Плохинский, 1978).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования влияния криосохранения на генетическую стабильность растительного материала нужно было провести ряд предварительных опытов с целью выбора праймеров, обеспечивающих регистрацию полиморфизма, проверки генетической однородности исходного материала, пригодности выбранного метода криосохранения для каллусов яровой пшеницы.

Выбор и характеристика праймеров

Учитывая низкую вероятность возникновения изменений в геноме в ходе процедуры криосохранения, в качестве маркеров для оценки изменчивости ДНК

восстановленного растительного материала были выбраны широко распространенные в геноме повторяющиеся последовательности, обладающие высокой изменчивостью: микросателлиты и ретротранспозоны.

На основании этих последовательностей были выбраны два ПЦР-метода: ISSR и REMAP. Первый метод позволяет находить изменения геномных последовательностей между микросателлитными повторами (Zietkiewicz *et al.*, 1994). REMAP-метод основан на амплификации участков ДНК между внутренней частью последовательности концевой повтора ретротранспозона (LTR) и микросателлитом (Kalendar *et al.*, 1999).

Для оценки полиморфизма ДНК-маркеров нужно было выбрать наиболее информативные пары праймеров и подобрать условия проведения полимеразной цепной реакции.

Чтобы подобрать температуру отжига и выбрать праймеры для исследования проводили ПЦР с каждым праймером/комбинацией праймеров и двумя образцами ДНК пшеницы, которые были выделены из случайно отобранных проб каллусов. Ориентировочную температуру отжига для каждого праймера определяли по формуле:

$$t^{\circ}_{\text{отжига}} = 4(G+C)+2(A+T),$$

где G-число оснований гуанина; C-число оснований цитозина; A-число оснований аденина; T-число оснований тимина в последовательности праймера.

Помимо расчетной температуры отжига использовали еще два-три значения для каждого из семи микросателлитных праймеров и их комбинаций с четырьмя LTR-праймерами. В результате были подобраны температуры отжига, при которых в ходе амплификации происходил синтез наибольшего числа хорошо различимых фрагментов. Значения этих температур сильно варьировали между праймерами и их комбинациями (Табл. 1).

На основании проведенного анализа отобрали шесть наиболее информативных вариантов, т.е. праймеров, в результате ПЦР с которыми амплифицировалось максимальное количество хорошо различимых фрагментов. К ним относятся две микросателлитные последовательности – M4 и M6, а также комбинации праймеров Wis+M4, Wis+M6, Tar+M1 и Tar+M6.

Таблица 1. Температуры отжига и число ампликонов, полученные с праймерами и их комбинациями, выбранными для ISSR- и REMAP-анализа образцов пшеницы

Праймер	Температура отжига, °С	Число ампликонов
ISSR-анализ		
M4	55	7
M6	64	8
REMAP-анализ		
Wis+M4	56	15
Wis+M6	60	9
Tar+M1	58	10
Tar+M6	59	9

Оценка генетической однородности растений трех сортов яровой пшеницы

Для выявления возможных изменений генома, возникающих именно в результате криосохранения, необходим генетически однородный материал. ПЦР-анализ ДНК, выделенной из 9–10 растений каждого сорта, с выбранными праймерами показал генетическую гетерогенность использованных сортов (Рис.2). При этом полиморфизм ряда маркеров был обнаружен не только у сорта Кинельская 59, отдельные растения которого имели признаки, отклоняющиеся от сортового описания, но и у внешне однородных сортов Энита и Новосибирская 22.

Следовательно, перед проведением исследования влияния отдельных этапов криосохранения на стабильность растительного материала, необходимо было получить линии растений, однородных по всем выбранным ISSR- и REMAP-маркерам.

Помимо генетической неоднородности исходного материала данный анализ показал возможность выявления молекулярно-генетического полиморфизма у мягкой пшеницы с помощью использованных праймеров.

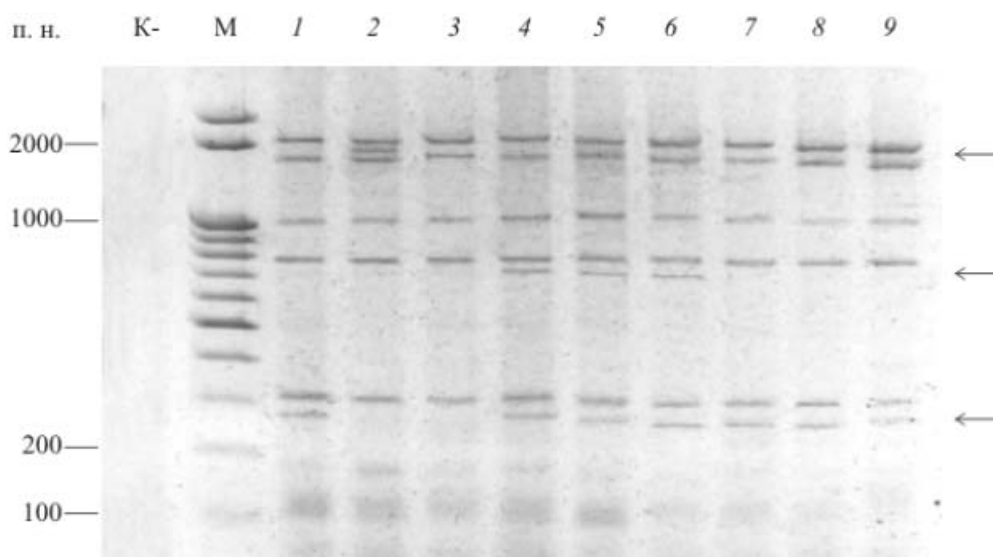


Рис. 2. REMAP-профили растений яровой пшеницы сорта Новосибирская 22 (1-9), полученные с комбинацией праймеров Tag+M1. К- - отрицательный контроль, М - маркер молекулярного веса. Стрелками указаны полиморфные маркеры.

Выбор объекта исследования

Для выбора объекта нашего исследования была проанализирована способность к образованию морфогенных каллусов тремя видами эксплантов, взятых от растений пшеницы сортов Энита, Новосибирская 22 и Кинельская 59 (Рис. 3).

Из оснований листьев семидневных проростков у сортов Энита и Кинельская 59 образование морфогенного каллуса происходило с высокими частотами, однако на данном типе эксплантов у сорта Новосибирская 22 каллусная ткань, способная к морфогенезу, не образовывалась.

Самая высокая частота образования способных к морфогенезу каллусов из фрагментов зрелых зародышей была отмечена у сорта Новосибирская 22. Для других двух сортов она оказалась невысокой.

Доля незрелых зародышей, из которых образовывались каллусы, способные к морфогенезу, у сорта Кинельская 59 была максимальной, у сорта Новосибирская 22 данный показатель был несколько меньше. Для сорта Энита доля эксплантов, формирующих морфогенные каллусы, была одной из самых низких.

Таким образом, проанализированные сорта пшеницы различались по способности к формированию морфогенных каллусов из различных эксплантов.

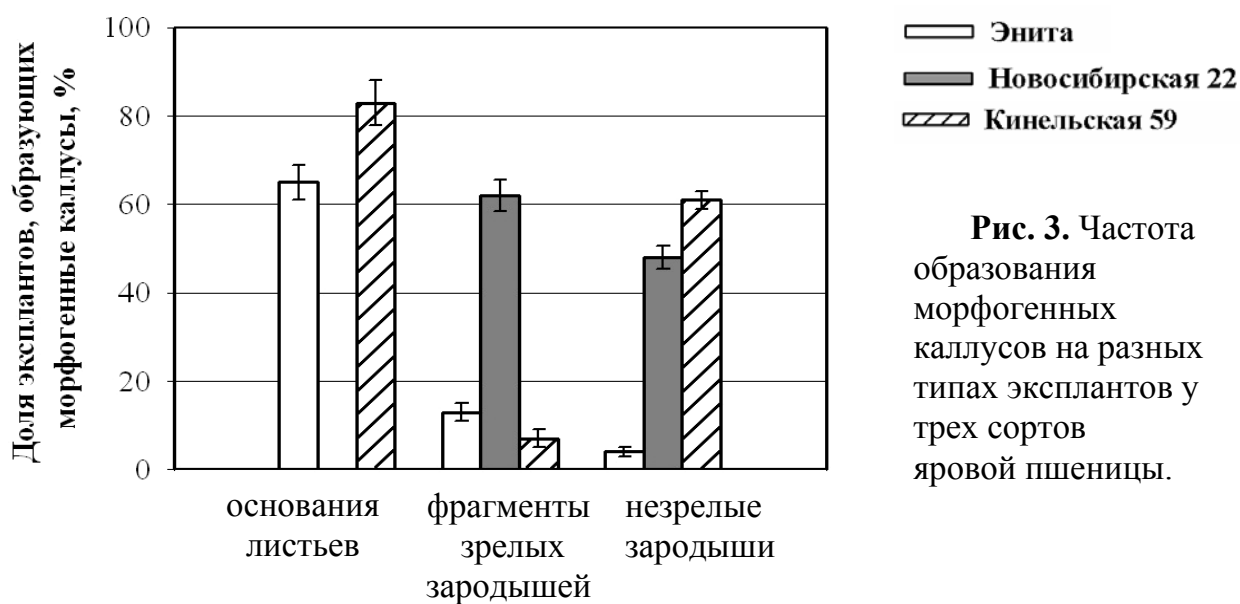


Рис. 3. Частота образования морфогенных каллусов на разных типах эксплантов у трех сортов яровой пшеницы.

Для получения каллусов пшеницы чаще других видов эксплантов используют незрелые зародыши, однако работа с ними ограничена весенне-летним периодом. Кроме того, их применение связано с рядом трудностей: сложностью получения материала одного возраста и нежелательным прорастанием зародышей. Основания листьев и фрагменты зрелых зародышей более удобны, поскольку их использование возможно в течение круглого года и частота прорастания значительно ниже. При ограниченном количестве семян применение в качестве источника получения каллусных тканей фрагментов зрелых зародышей более обосновано, чем оснований листьев, потому что в первом случае из одной зерновки можно получить три–четыре экспланта, а во втором только один–два.

Из соображений удобства и доступности в течение круглого года в качестве эксплантов для получения каллусной ткани, обладающей способностью к морфогенезу, для нашего исследования были выбраны фрагменты зрелых зародышей. Поскольку с наибольшей частотой такие каллусы образовались у сорта Новосибирская 22 он и был выбран в качестве объекта исследования.

Исследование стабильности растительного материала после криосохранения методом дегидратации

Ввиду того, что анализ исследуемых сортов показал их неоднородность, перед проведением исследования влияния криосохранения на генетическую стабильность растительного материала на базе сорта Новосибирская 22 был получен

ряд самоопыленных линий, каждая из которых являлась потомством одного растения.

Из фрагментов зрелых зародышей нескольких самоопыленных линий были инициированы каллусы, которые подвергли криосохранению. Анализ влияния стадий криосохранения на генетическую стабильность растительного материала включал две серии опытов.

Первая серия опытов

В рамках первой серии опытов каллусы яровой пшеницы линий Нв8, Нв9, Нв14 и Нв16 подвергали последовательным этапам криосохранения. По окончании каждого этапа часть каллусов продолжали культивировать на среде МС-И для анализа восстановления роста тканей и их способности к морфогенезу. Генетическую стабильность каллусов оценивала после 7, 14 и 28 дней культивирования. Оставшаяся после отсаживания часть каллусной ткани переходила на следующий этап криосохранения. Схема криосохранения и отбора проб первой серии опытов представлена на Рис. 3.

Оценка генетической однородности исходного материала. ПЦР-анализ показал, что пробы ДНК каллусных тканей были идентичны по всем ISSR- и REMAP-маркерам внутри каждой линии. На Рис. 4 приведены REMAP-профили проб исходных каллусов линии Нв16.

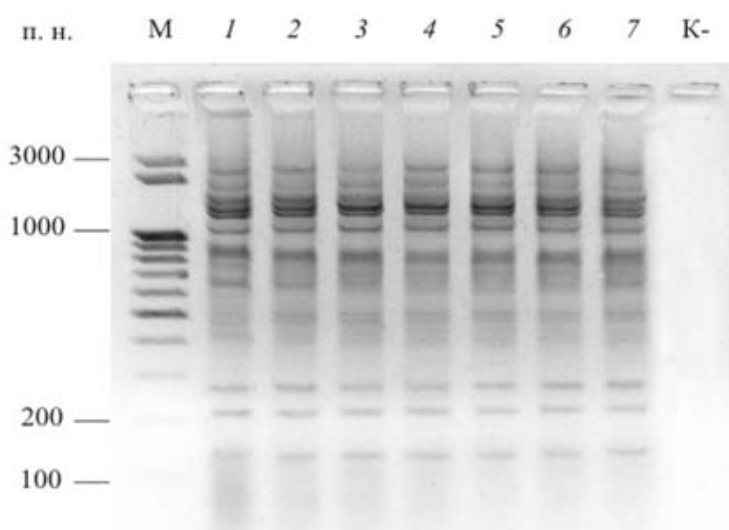


Рис. 4. REMAP-профили контрольных проб каллусов (1-8) самоопыленной линии Нв16 с праймерами Wis+M4. М - маркер молекулярного веса; К- - отрицательный контроль.

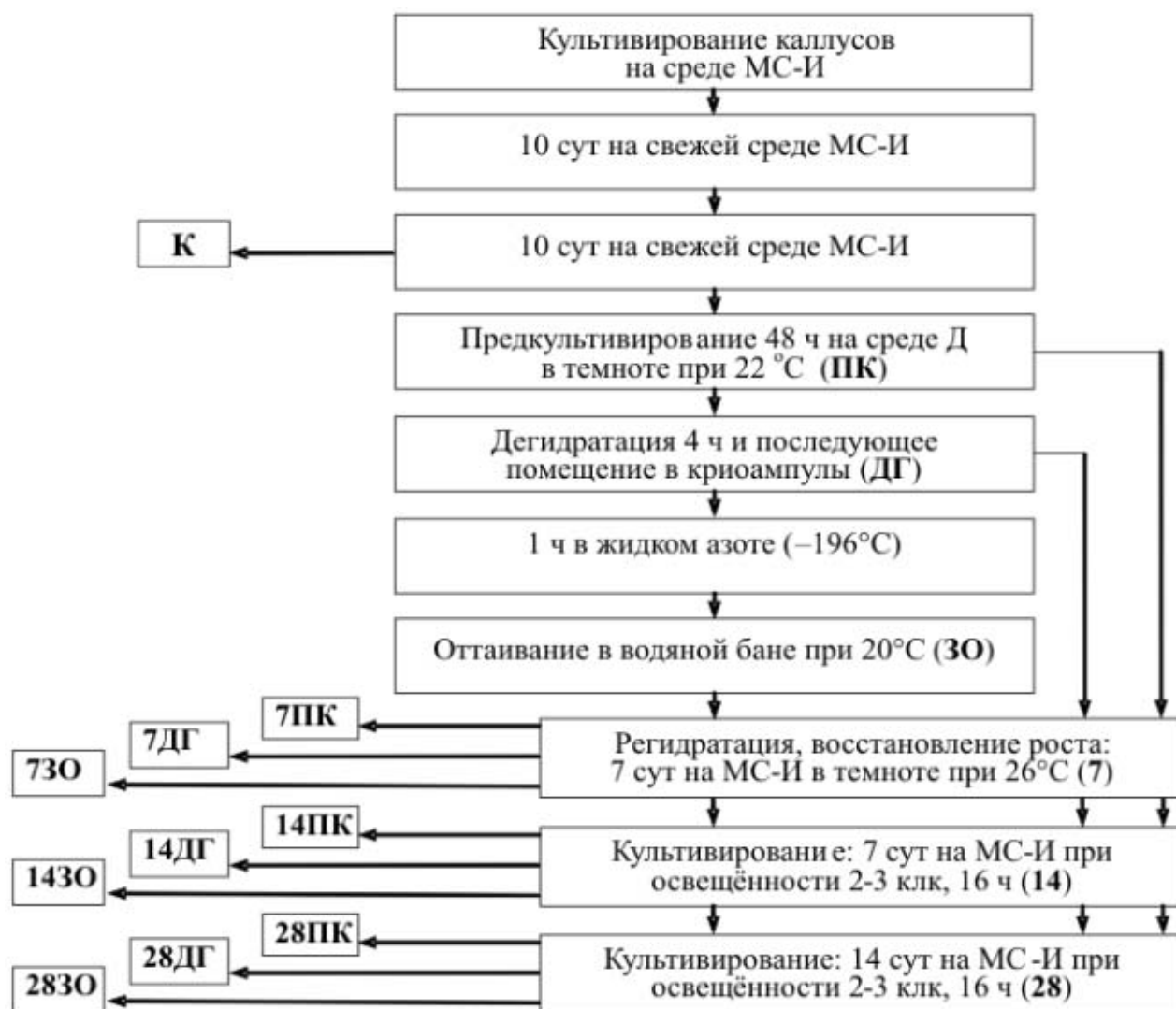


Рис. 3. Схема криосохранения каллусов пшеницы и отбора проб ДНК в первой серии опытов.

К - контрольные пробы каллусов, которые не подвергали обработкам; пробы каллусов инкубированные на среде МС-И в течение недели в темноте при 26°С: 7ПК - после предкультивирования на среде Д; 7ДГ - после предкультивирования, высушивания, и регидратации; 7ЗО - после полной процедуры криосохранения. 14ПК, 14ДГ, 14ЗО - пробы растительного материала через 7 дней после соответствующего воздействия и переноса тканей на свет; 28ПК, 28ДГ, 28ЗО – через 21 день после соответствующего воздействия и переноса тканей на свет.

Содержание воды в тканях перед замораживанием в жидком азоте. Оводненность растительного материала перед замораживанием является крайне важным показателем, от него в значительной степени зависит восстановление тканей после криосохранения. Поэтому перед погружением в жидкий азот в части каллусов было определено содержание воды. Каллусы самопыленных линий достоверно не отличались друг от друга по содержанию воды. Перед замораживанием в жидком азоте оно составляло 13.5–18%.

Восстановление каллусов четырех самоопыленных линий после криосохранения. Отдельные воздействия протокола дегидратации не оказывали существенного влияния на возобновление роста образцов. Оно происходило с высокой частотой (Табл. 2).

Таблица 2. Восстановление роста и морфогенетическая способность каллусов четырех самоопыленных линий после этапов криосохранения

Вариант	Линия	Число каллусов	Доля каллусов, %	
			Растущих*	Способных к морфогенезу **
Культивирование <i>in vitro</i> (контроль)	Нв8	110	100	1.7
	Нв9	80	100	20.3
	Нв14	98	100	54.1
	Нв16	75	100	68.0
Предкультивирование	Нв8	120	87.4	0
	Нв9	132	92.8	15.2
	Нв14	124	95.7	49.2
	Нв16	78	92.0	62.8
Дегидратация	Нв8	137	86.7	0.7
	Нв9	70	83.8	0
	Нв14	74	95.2	28.4
	Нв16	36	92.0	16.7
Замораживание-оттаивание	Нв8	140	81.1	0
	Нв9	70	88.9	1.4
	Нв14	76	91.8	26.3
	Нв16	38	88.6	10.5

* Нет достоверных отличий доли растущих каллусов после каждого из этапов криосохранения при $P=0.95$.

** Снижение доли способных к морфогенезу каллусов линий Нв9, Нв14 и Нв16 после этапа дегидратации достоверно при $P=0.95$.

Слабое снижение жизнеспособности, которое составило 4–13%, было отмечено после предкультивирования каллусов на среде с 0.8 М сахарозы, однако с вероятностью 0.95 оно является недостоверным. Дегидратация и замораживание-оттаивание каллусов также не вызывали заметного снижения доли активно растущих

каллусов. Результаты данного опыта подтвердили отсутствие существенного влияния стадий криосохранения по протоколу дегидратации на жизнеспособность каллусных тканей яровой пшеницы. Доля каллусов, восстановивших свой рост после полной процедуры криогенного хранения, в данном опыте составила 88%. Этот показатель превысил максимальную из ранее достигнутых частоту выживания образцов, полученной Chen с соавт. на каллусах озимой пшеницы – 82% (Chen *et al.*, 1985).

Влияние стадий криосохранения на морфогенетическую способность тканей. Каллусы, принадлежащие к линиям, выделенным из одного сорта пшеницы, исходно отличались друг от друга по морфогенетической способности (Табл. 2). Это еще раз свидетельствует о неоднородности семенного материала сорта Новосибирская 22.

Из всех исследованных воздействий только после этапа дегидратации происходило существенное снижение морфогенетической способности каллусов трех из четырех линий: у линии Нв9 – до нуля, у линий Нв14 и Нв16 – в 1.7 и 1.5 раз соответственно. Вероятно, различия в степени снижения способности к морфогенезу тканей исследованных линий, связаны с неодинаковой устойчивостью генотипов к высушиванию.

Влияние отдельных этапов замораживания в жидком азоте на стабильность ДНК-маркеров в каллусных тканях. У трех из четырех исследованных линий ни один из этапов процедуры криосохранения не индуцировал полиморфизма фрагментов, амплифицированных с ISSR- и LTR-праймерами.

С помощью метода REMAP с комбинацией праймеров Wis+M4 только для каллусов линии Нв16 в двух пробах ДНК было отмечено появление новых маркеров размером около 90 п. н.: после этапа дегидратации (Рис. 5 - 7ДГ2) и после всей процедуры криосохранения (Рис. 5 - 7ЗО1). Поскольку для экспериментов использовали образцы каллусов, полученные из разных эксплантов одной линии, нельзя полностью исключить возможности присутствия в исходном материале фрагмента ДНК, обнаруженного у каллусов линии Нв16 после дегидратации и замораживания-оттаивания. Вместе с тем, происхождение каждой использованной линии пшеницы от одного самоопыленного растения и проверка генетической однородности каллусов перед процедурой криосохранения должны существенно

уменьшать вероятность этого события. Поэтому мы предполагаем, что, данное изменение ДНК могло быть результатом стресса, испытываемого клетками в ходе этапов криосохранения. Причем, поскольку не представляется возможным успешно выполнить процедуру криосохранения каллусных тканей без их дегидратации, трудно сказать, может ли вызывать вариабельность генома сам процесс замораживания-оттаивания. Однако ввиду того, что после дегидратации, и после замораживания-оттаивания было зарегистрировано появление ампликонов сходного размера с одной и той же парой праймеров, вероятно, данное изменение ДНК возникло на стадии дегидратации.

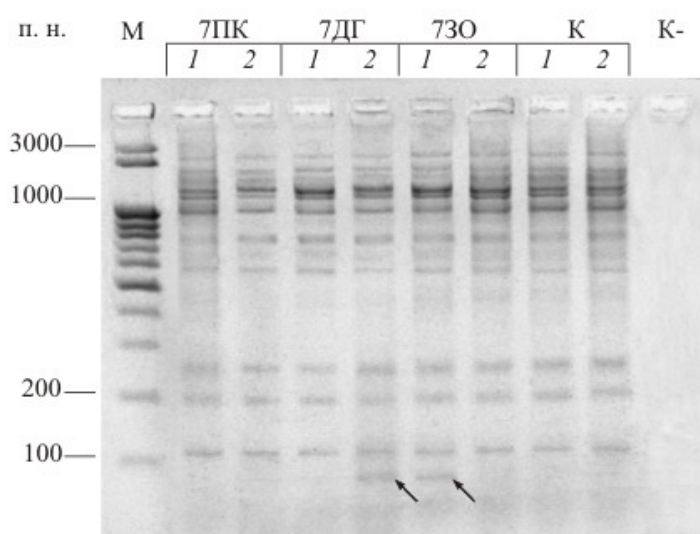


Рис. 5. Профили ДНК каллусов самоопыленной линии Нв16 с праймерами Wis+M4. 7ПК - каллусы, восстановленные в течение недели в темноте после предкультивирования; 7ДГ - после предкультивирования, высушивания, и регидратации; 7ЗО - после полной процедуры криосохранения; К - каллусы, не подвергавшиеся обработке; М - маркер молекулярного веса; К- - отрицательный контроль.

1, 2 - случайные пробы, отобранные из соответствующего варианта и состоящие из двух-трех каллусов. Стрелками указаны полиморфные фрагменты.

Среди тканей, которые продолжали культивировать на свету после отдельных стадий криосохранения, ни через 7 (14ПК, 14ДГ, 14ЗО), ни через 21 (28ПК, 28ДГ, 28ЗО) день не было обнаружено отличий спектров ампликонов от контроля (Рис. 6). То, что на более поздних этапах предположительно полиморфные фрагменты не были выявлены, можно объяснить тем, что в ходе эксперимента на каждый следующий этап процедуры криосохранения переносили не все каллусы, прошедшие предыдущий этап, и та часть клеток, которые имели вариации в геноме, вероятно, не попала в пробы.

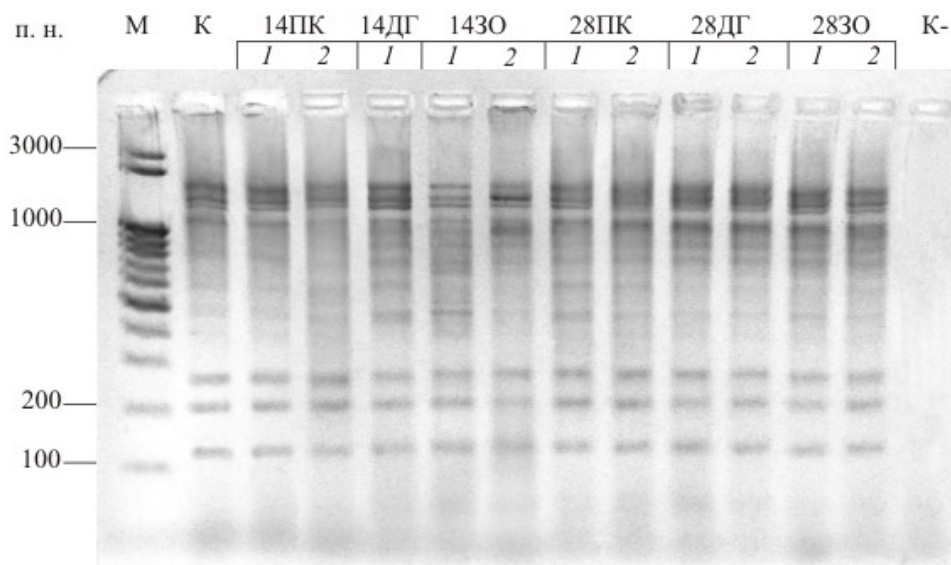


Рис. 6. REMAP-профили каллусов линии Нв16 с праймерами Wis+M4.

К - каллусы, не подвергавшиеся обработкам; каллусы через 7 дней (14ПК, 14ДГ, 1430) и через 21 день (28ПК, 28ДГ, 2830) после переноса тканей на свет. М - маркер молекулярного веса; К- - отрицательный контроль; 1, 2 - случайные пробы, отобранные из соответствующего варианта и состоящие из двух-трех каллусов.

Анализ природы полиморфных ДНК-фрагментов. Для того чтобы выяснить природу полиморфных фрагментов, выявленных в пробах каллусов после этапа дегидратации и полной процедуры криосохранения (Рис. 5 - 7ДГ2, 7301), эти фрагменты были клонированы и секвенированы. Затем их нуклеотидные последовательности сравнили с последовательностями, имеющимися в базах данных.

Согласно полученным данным последовательности полиморфных фрагментов, обнаруженных в пробах 7ДГ2 и 7301, полностью совпадают. Это подтверждает предположение о том, что появление нового фрагмента в пробе 7301 связано с дегидратацией, а не с замораживанием тканей в жидком азоте. С одного конца они фланкированы микросателлитным повтором, с другого – LTR ретротранспозона *Wis-2-1A* или *BARE-1*. В данном случае возможны оба варианта, поскольку на 5'-конце имеют одинаковые последовательности длиной 19 п.н. (Queen *et al.*, 2004), которые были взяты в качестве LTR-праймера Wis. Длина последовательности между праймерами у полиморфного фрагмента составила 24 нуклеотида.

Поиск в базах данных позволил обнаружить сходство фрагмента с

неидентифицированной последовательностью ДНК, принадлежащей геному мягкой пшеницы (*T. aestivum*) - ВН759170 (клон из ВАС библиотеки).

Однако ввиду того, что обнаруженный фрагмент имеет очень малую протяженность, он может совпадать с большим числом последовательностей ДНК генома мягкой пшеницы, в том числе несеквенированных на настоящий момент. Таким образом, на основании поиска в базах данных сложно говорить о природе обнаруженных отклонений. Несмотря на это, маловероятно, что появление ранее незарегистрированных фрагментов в REMAP-профилях связано с мутацией, приведшей к возникновению новой микросателлитной последовательности, комплементарной последовательности праймера М4, поскольку в ISSR-профилях ампликонов проб 7ДГ2 и 7ЗО1, полученных с праймером М4, не было отмечено отклонений от контрольных профилей, а появление фрагментов регистрировали только при сочетании данного праймера с LTR-праймером Wis. Из этого следует, что наиболее вероятной причиной отмеченных изменений является спровоцированное стрессом, испытываемым клетками во время дегидратации, встраивание новой копии ретротранспозона рядом с микросателлитной последовательностью, комплементарной М4.

Таким образом, по результатам данной серии опытов можно заключить, что из всех этапов криосохранения только дегидратация оказывает негативное действие на способность каллусов к морфогенезу. Из воздействий, которым подвергаются каллусные ткани яровой пшеницы в ходе криосохранения с помощью исследованного протокола, только дегидратация может вызывать единичные изменения последовательностей исследованных ДНК-маркеров.

Вторая серия опытов

В рамках второй серии исследования из одной части семян двух линий: Нв4 и Нв6, получали каллусы, а из другой части семян этих линий были выращены растения, листья которых использовали в качестве контроля при анализе ДНК (и каллусов, и регенерантов). В данной серии опытов анализировали ДНК каллусов, прошедших отдельные стадии криосохранения (аналогично первой серии опытов) и культивированных в течение 28 дней, и растений, которые были регенерированы из таких каллусов. Для того чтобы исключить возможное влияние культивирования *in vitro*, опыт включал дополнительные контроли – каллусную ткань, не

подвергавшуюся никаким обработкам и культивируемую в течение того же периода времени, что и опытные каллусы, а также полученные из таких каллусов регенеранты.

Оценка однородности растений двух линий. Анализ ДНК контрольных растений, выращенных из части семян линий Нв4 и Нв6, показал их идентичность внутри линий по всем исследуемым маркерам.

Содержание воды в каллусах после каждого из этапов криосохранения. Учитывая негативное влияние дегидратации на морфогенетическую способность каллусов яровой пшеницы, содержание воды контролировали на всех этапах, степень высушивания была снижена по сравнению с первой серией опытов. После двух суток предкультивирования на среде Д (0.8 М сахарозы), этот показатель у тканей линии Нв4 снижался на 9%, а у Нв6 в два раза сильнее – на 18%. Перед замораживанием в жидком азоте, образцы каллусов достоверно отличались между собой по степени оводненности: ткани линии Нв4 содержали 26.7% воды, а линии Нв6 – 21.4%.

Восстановление роста растительного материала после стадий криосохранения. Частота восстановления роста после полной процедуры криосохранения, отмеченная в данной серии опытов была такой же высокой, как и в предыдущей части исследования (Табл. 3). Полученные результаты подтверждают, что этапы замораживания в жидком азоте с помощью метода дегидратации не влияют на жизнеспособность каллусных тканей яровой пшеницы.

Влияние этапов криосохранения на способность к морфогенезу. После этапа предкультивирования у тканей линии Нв4 достоверного изменения доли морфогенных каллусов и числа растений-регенерантов не было зарегистрировано (Табл. 3). Однако у другой линии – Нв6, после данного этапа происходило снижение способности к морфогенезу. Возможно, это связано со значительной потерей воды тканями линии Нв6, отмеченной после предкультивирования на среде с повышенным содержанием сахарозы. Стадия дегидратации оказывала существенное негативное влияние на морфогенетическую способность тканей линии Нв4, несмотря на меньшую степень обезвоживания каллусов по сравнению с первой серией опытов.

Из результатов обеих серий опытов видно, что степень обезвоживания оказывала существенное влияние на способность тканей яровой пшеницы к образованию морфогенных участков. Так наибольшие значения этого показателя

после этапа дегидратации были отмечены у каллусов линий Нв8, Нв4 и Нв6, которые были высушены до 18.3%, 26.7% и 21.4% содержания воды, соответственно. В свою очередь, у наиболее дегидратированных в опыте тканей линии Нв9, содержавших перед замораживанием 13.5% воды, морфогенетическая способность падала до нуля без погружения каллусов в жидкий азот.

Таблица 3. Восстановление роста, доля способных к морфогенезу каллусов и частота регенерации растений линий Нв4 и Нв6 после отдельных этапов криосохранения

Вариант	Линия	Общее число каллусов	Доля каллусов, %		
			Растущих*	Способных к морфогенезу **	Образующих регенеранты ***
Культивирование <i>in vitro</i> (контроль)	Нв4	50	100	60.0	12.0
	Нв6	63	90.5	58.7	11.1
Предкультивирование	Нв4	54	100	64.8	13.0
	Нв6	33	90.9	33.3	1.8
Дегидратация	Нв4	53	98.1	28.3	5.7
	Нв6	35	82.7	31.4	2.9
Замораживание-оттаивание	Нв4	53	90.6	20.8	9.4
	Нв6	64	81.3	21.9	4.7

*Нет достоверных отличий доли растущих каллусов каждой из линий в результате последовательных этапов криосохранения при $P=0.95$

**Снижение доли способных к морфогенезу каллусов линии Нв6 после предкультивирования, линии Нв4 после этапа дегидратации достоверно при $P=0.95$

***Частота регенерации тканей линии Нв6 достоверно снизилась после предкультивирования, линии Нв4 – после дегидратации ($P=0.95$).

Оценка стабильности ДНК-маркеров в восстановленных после отдельных стадий замораживания в жидком азоте каллусных тканях и регенерированных растениях. ПЦР-анализ показал отсутствие каких-либо отклонений профилей образцов всех вариантов от профилей контрольных растений и культивированных каллусов, не подвергавшихся обработкам, как в случае каллусов линии Нв4, так и в случае Нв6 (Рис. 7).

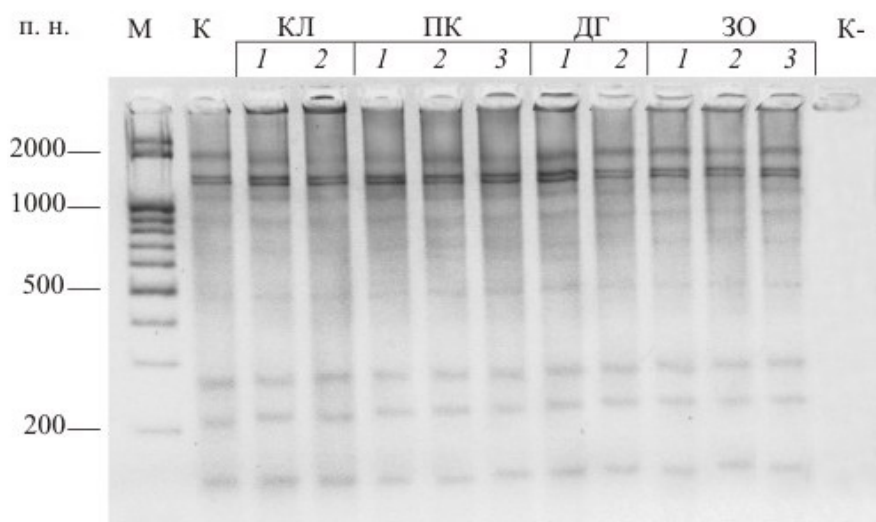


Рис. 7. REMAP-профили растений-регенерантов из каллусов линии Нв6 с праймерами Wis+M4.

М - маркер молекулярного веса; К - контроль; КЛ (1, 2) - контроль культивирования; ПК (1-3) - предкультивирование; ДГ (1, 2) - дегидратация; ЗО (1-3) - замораживание-оттаивание.; К- - отрицательный контроль.

Уровень изменчивости растительного материала пшеницы после отдельных этапов криосохранения методом дегидратации

Для того чтобы определить частоту появления изменений ДНК-маркеров после каждого из этапов криосохранения, число полиморфных локусов выразили в процентах от числа локусов, зарегистрированных для каллусов каждой линии.

У растительного материала пяти из шести линий, взятых в опыты, после каждого из последовательных воздействий криосохранения число локусов оставалось неизменным. Как было отмечено ранее, только в случае тканей линии Нв16, после дегидратации и после замораживания-оттаивания было отмечено появление вариабельности. Доля полиморфных локусов в этих вариантах составила по 1.7%. В первой серии опытов частота появления изменений после этапов дегидратации и после замораживания-оттаивания составила по 0.85%, а в целом по опытам - 0.58%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы показана возможность применения протокола дегидратации для успешного криогенного хранения каллусов яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и получения из них растений. Результаты работы подтвердили возможность использования ISSR- и REMAP-методов для оценки стабильности растительного материала пшеницы, восстановленного после криосохранения.

В ходе экспериментов установлено, что дегидратация является критическим моментом исследованного протокола. Она приводит к существенному снижению способности каллусных тканей пшеницы к морфогенезу и регенерации растений, а также может вызывать вариации в геноме восстановленных каллусов. Отмеченная частота вариаций в ДНК каллусов в целом по опыту составила 0.58%. У регенерантов, восстановленных из каллусных тканей, которые подвергали как отдельным стадиям криосохранения, так и полной процедуре подготовки и замораживания в жидком азоте, изменения не были выявлены. Вероятно, такой результат связан с низкой частотой появления вариаций.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что каллусы яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) способны восстанавливать свой рост после криосохранения по протоколу дегидратации. Ни один из этапов криосохранения не вызывал снижения жизнеспособности тканей.

2. Обнаружено, что восстановленные после криосохранения каллусы не утратили способности к регенерации растений, хотя частота формирования морфогенных структур достоверно снижалась на этапе дегидратации, дальнейшее замораживание в жидком азоте и оттаивание существенно не влияли на этот показатель.

3. Впервые проведена оценка влияния этапов криосохранения по протоколу дегидратации на генетическую стабильность восстановленного растительного материала. После этапа дегидратации были обнаружены единичные изменения генома, частота которых составила 0.58%. Остальные стадии криосохранения не вызывали изменений ДНК-маркеров.

4. Регенеранты, восстановленные из каллусов, подвергавшихся отдельным этапам криосохранения, полностью сохраняли стабильность по ряду проанализированных ДНК-маркеров.

СПИСОК РАБОТ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Соловьева А.И.** (2008) Влияние многократного криогенного замораживания-оттаивания на прорастание сухих семян мягкой пшеницы. *Тезисы докладов и сообщений, представленные на школу-конференцию молодых ученых “Методы культивирования клеток”*. Цитология, 50 (9), с. 822–823.
2. **Соловьева А.И., Высоцкая О.Н.** (2008) Влияние повреждений на прорастание растительного материала *Triticum aestivum* без и после замораживания в жидком азоте. *Тезисы докладов IX Международной конференции “Биология культивируемых клеток растений и биотехнология”*. Звенигород, с. 360–361.
3. **Соловьева А.И., Высоцкая О.Н., Долгих Ю.И.** (2009) Стадии криосохранения каллусной ткани пшеницы и стабильность ДНК-маркеров. *Программа и тезисы VII Международной конференции “Молекулярная генетика соматических клеток”*. Звенигород, Москва, с. 61–62.
4. **Мухаммед С., Соловьева А.И., Долгих Ю.И.** (2009) Оценка биотехнологического потенциала различных сортов пшеницы. *Вестник РУДН, сер. Агронимия и животноводство*, 4, 78–83.
5. **Соловьева А.И., Высоцкая О.Н., Попов А.С., Долгих Ю.И.** (2010) Замораживание в жидком азоте дегидратированных каллусов яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и их морфогенетическая способность. *Изв. РАН. Сер. биол.*, 5, 1–7.
6. **Соловьева А.И., Высоцкая О.Н.** (2010) Способ криосохранения каллусов яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), полученных из двух типов эксплантов. *Сборник статей по материалам III Всероссийской научно-практической конференции “Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира”*. Волгоград, с. 110–113.
7. **Соловьева А.И., Высоцкая О.Н., Долгих Ю.И., Попов А.С.** (2011) Спектры ISSR- и REMAP-маркеров ДНК после этапов криосохранения по методу дегидратации каллусов яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). *Физиология растений*, 58 (3), 359–366.