

На правах рукописи

ФАЙЗИЕВА САДАФ АБДУЛХАКОВНА

**РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ
РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ ПШЕНИЦЫ И
ЭГИЛОПСА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

(03.00.12 - физиология и биохимия растений)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ДУШАНБЕ- 2009

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биологии и геномной инженерии Института физиологии растений и генетики АН Республики Таджикистан

Научные руководители: член-корреспондент АН
Республики Таджикистан,
доктор биологических наук,
профессор **Алиев Курбон Алиевич**,

кандидат биологических наук
Наимов Сафарали.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Ниязмухамедова
Мукадам Бабаджановна,
Институт физиологии растений и
генетики АН Республики
Таджикистан,

кандидат биологических наук
Кадырова Дильбардон Халиковна.

Ведущая организация: Таджикский национальный
университет.

Защита состоится " _____ " _____ 2009 г. в _____ ч на заседании диссертационного совета Д 047.001.01 при Институте физиологии растений и генетики Академии наук Республики Таджикистан (734063, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2, E-mail: asrtkarimov@mail.ru, lab.gen@mail.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Индиры Ганди АН Республики Таджикистан.

Автореферат разослан " _____ " _____ 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, доцент **Б.Б. Джумаев**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Генофонд дикорастущих зерновых злаков Таджикистана, местных сортов зерновых культур, прежде всего пшеницы, богат и многообразен. Генофонд пшеницы ежегодно пополняется интродуцированными сортами этой культуры. Поэтому использование злаковых растений в молекулярно-биологических исследованиях имеет как фундаментальное, так и прикладное значение для создания высокоадаптивных сортов пшеницы.

Метод культивирования изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях (*in vitro*) получил название культуры изолированных тканей и приобрел особое значение в связи с возможностями использования его в биотехнологии (Кулаева, 2000). Биотехнология известна с давних времен, но как самостоятельная прикладная наука сформировалась в середине 70-х годов XX столетия, когда человечество осознало необходимость первоочередного решения на принципиально новых основах главнейших проблем современности - продовольственной, энергетической, ресурсной, загрязнения окружающей среды (Просад, 2003; Каримов, 2005; Алиев и др., 2005; Алиева, Умаров, 2005).

Развитие традиционной селекции злаковых растений способствовало значительному увеличению урожайности многих злаковых и бобовых культур и было ознаменовано эрой Зеленой революции, по сути, - предшественницы биотехнологической революции, основанной на молекулярной биологии и молекулярной генетике (Кулаева, 2000; Шумный, 2005). Первым важнейшим этапом развития биотехнологии растений явилась реализация методов культивирования клеток, тканей, органов и установление принципа тотипотентности, т.е. возможности получения полноценного организма из любой клетки или органа растения в системе *in vitro*. В специальных искусственных условиях любая дифференцированная клетка может повторить весь путь онтогенеза. Возможности применения метода культуры изолированных клеток и тканей в биотехнологии с практической точки зрения очень велики (Глеба, 1998). Этот принцип можно использовать в случае, когда исчерпана внутривидовая изменчивость и не удается усилить до желаемого уровня селекционируемые признаки, такие как устойчивость к биотическим факторам (заболевания, вредители), абиотическим факторам среды (засоленность, температура), устойчивость к полеганию, урожайность и т.д., для получения гибридных растений от скрещиваний, обычно не дающих жизнеспособного потомства, а также для ускорения

селекционного процесса (культура изолированных зародышей) и оздоровления посадочного материала.

На молекулярном уровне морфогенез сопряжен с активностью пролиферации, роста и дифференциации клеток в очагах органогенеза. Направленность морфогенеза, характерная для интактного растения, может нарушаться в условиях культивирования *in vitro* и во многом зависит от генотипа донорного растения и взятого от него экспланта. Соотношение активности пролиферации каллусных клеток и частоты морфогенеза мало изучено. В частности, для каллусных клеток пшеницы такие данные редки и противоречивы, что и побудило нас заняться данными исследованиями.

Цель и задачи работы. Цель работы состояла в изучении процессов пролиферации и морфогенеза в каллусных культурах разных генотипов пшеницы и дикорастущих видов рода Эгилопс *in vitro* в зависимости от гормонального статуса культуральной среды, а также изучение поли(А)-содержащих РНК в процессе каллусогенеза и органогенеза.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- подбор культуральной среды для незрелых зародышей пшеницы и зрелых зародышей эгилопса и выявление оптимальных соотношений ауксинов и цитокининов для каллусогенеза, эмбриогенеза и регенерации в культуре *in vitro*;
- выявление генотипов зерновых злаков, обладающих высоким эмбрионным потенциалом и получение из них растений-регенерантов;
- анализ соотношения пролиферации и морфогенеза каллусных культур пшеницы и эгилопса;
- изучение накопления поли(А)-содержащих РНК на стадии каллусогенеза и органогенеза злаковых растений при различных сочетаниях фитогормонов;
- сравнительный ПЦР-анализ пшеницы и эгилопса, выращенных в обычных условиях и их каллусных культур, для выявления внутривидового генетического полиморфизма в связи с соматональной изменчивостью, возникающей в процессе культивирования клеток и тканей растений в условиях *in vitro*.

Научная новизна. Показано, что морфогенетическая способность в культуре *in vitro* и реализация потенции клетки в ходе регенерации определяются не только генетической особенностью объекта, но и составом питательной среды, в частности, соотношением ауксинов и цитокининов.

Подобран оптимальный состав питательных сред, способствующих интенсивному формированию морфогенных структур каллусных культур у различных генотипов злаковых растений (пшеницы и эгилопса).

Установлено различие в действии ауксинов и цитокининов на экспрессию разных фракций РНК в процессе каллусогенеза и органогенеза, что может свидетельствовать о независимом влиянии этих двух типов гормонов на экспрессию поли(А)-содержащих РНК (мРНК) у представителей разных групп злаковых растений. С помощью ДНК-маркеров показана эффективность (SSR-праймер 513) выявления генетического различия между исходными растениями и их каллусными культурами.

Практическая ценность. Разработаны составы питательных сред, оптимальные для каллусогенеза, эмбриогенеза и длительного поддержания каллусов в среде *in vitro*, а также для регенерации растений (пшеницы и эгилопса) из каллусов. Изменение синтеза поли(А)-содержащих фракций РНК в зависимости от содержания в среде цитокининов и ауксинов может служить маркером эмбриогенеза в культуре *in vitro*. Показано, что ДНК-маркеры (SSR) могут служить надежным способом выявления генетического полиморфизма пшеницы и эгилопса *in vitro* и *in vivo* и отбора перспективных генотипов в селекции.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены (или представлены) на: республиканском симпозиуме "Экономика и наука Горно-Бадахшанской автономной области: прошлое, настоящее, будущее" (Хорог, 2005); научно-теоретической конференции профессорско-преподавательского состава и студентов, посвященной 60-летию Победы в Великой отечественной войне "Во имя мира и счастья на земле" (Душанбе, 2005); республиканской конференции "Адаптационные аспекты функционирования живых систем" (Душанбе, 2007); симпозиуме "Клеточная биология и биотехнология" (Сыктывкар, 2007); конференции "Чавонон ва илми муосир" (Душанбе, 2007); научной конференции, посвященной 120-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова (Душанбе, 2007); научной конференции, посвященной памяти академика Академии наук Республики Таджикистан Ю.С. Насырова "Достижения современной физиологии растений: теоретические и прикладные аспекты" (Душанбе, 2008).

Структура и объем работы. Работа состоит из введения, трех глав (обзор литературы; экспериментальная часть; результаты исследования), заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 120 стр., содержит 2 рисунка, 24 фотографии, 10 таблиц. Количество цитированных источников 164, из них 67 - иностранных авторов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 работ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. УСЛОВИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследования служили сорта мягкой пшеницы (Саратовская-29, Стекловидная-24, Джагер, Алекс (СИММИТ), Сете-Церрос-66, Норманн, Алмалы, ЭСИ-24 (Na160/HEINEVII/Vuc/3/F59.71/GHK) (СИММИТ), NAZ, Навруз и стародавние местные сорта: Сурхак (Шурабад), Лалмикилак (Бартанг), Сурхак (Кумсангир), сорт твердой пшеницы Истравшан, дикорастущие виды рода Эгилопс: *Aegilops taushii* Coss (32 образца), *Aegilops cylindrica* Host (11 образцов), *Aegilops triuncialis* L. (5 образцов), произрастающие в различных природно-климатических условиях Таджикистана: на Гиссарском, Туркестанском, Зеравшанском хребтах и в Южном Таджикистане. Из них в наибольшей степени подошли для проведения экспериментальной работы с использованием подобранных нами питательных сред сорта Стекловидная-24, Алекс, Сете-Церрос-66, Истравшан, Джагер, топкроссный гибрид ЭСИ-24 (Na160/HEINEVII/Vuc/3/F59.71/GHK), виды *Ae. taushii*: образцы под каталожными номерами 3-1; 8-1; 8-2; 10-1; 10-2; 11-1; 11-2; 17-1; 35-1; *Ae. cylindrica* - 61-1; 69; 71; 72; *Ae. triuncialis* - 52; 53; 54.

Выделение зародышей злаковых растений и приготовление питательной среды. Для получения стерильных образцов незрелых двухнедельных зародышей пшеницы семена обрабатывали 0.5 % раствором диацита в течение 5-8 мин. Для получения стерильных образцов зрелых зародышей эгилопса семена предварительно замачивали в стерилизованной воде, а затем также обрабатывали 0.5 % раствором диацита в течение 5-8 мин. После стерилизации семена промывали дистиллированной водой 3-4 раза по 3-5 мин, затем извлеченные из семян зародыши помещали в пробирку на агаризированные (7 %) или жидкие (3 % агара) культивируемые среды Мурасиге и Скуга (1962) (МС), содержащие полный набор витаминов, 10 мг/л аспарагина или глутамина, 20 г/л сахарозы и 7 г/л агара, 0.2 мг/л 2,4-Д. На такой среде образование каллусов начинается в течение 20-22 дней.

Процесс выделения зародыша из семени проходил под боксом, в стерильных условиях. После инициации каллусов их переносили на другую среду МС, содержащую 0.5 мг/л 2,4-Д и 10 мг/л аспарагина. Пересевы каллусов повторяли каждые 17-20 дней. Каллусные культуры выращивали при +22° С и 12-часовом фотопериоде. Освещенность 600 лк, влажность 80-85% в комнате, в которой поддерживался идентичный режим. Общая продолжительность каллусообразования составила 38-40 дней в случае с пшеницей и 60-70 - в случае с эгилопсом от начала посадки эксплантов на среду МС.

Вторая фаза работы была связана с разработкой условий для эмбриогенеза и поддержания каллусов в среде *in vitro* длительное время. Наиболее оптимальной оказалась среда, содержащая 0.2 мг/л кинетина, 0.2 мг/л 2,4-Д, 0.5 мг/л ИУКа и 10 мг/л аспарагина.

Третья фаза работы была связана с разработкой условий для регенерации побегов. Наиболее эффективной оказалась среда МС, содержащая 10 мг/л аспарагина и 0.5 мг/л НУКа и 0.2 мг/л кинетина. В этих условиях через 26-28 дней на каллусах начали появляться от двух до трех побегов. Корневую систему индуцировали на среде без 2,4-Д.

Четвертая фаза нашей работы заключалась в использовании различных сочетаний цитокининов и ауксинов в ходе культивирования дикорастущих форм и сортов пшеницы.

Регенеранты перед посадкой в почву пересаживали в полиэтиленовый стакан, заполненный торфопочвенной смесью в соотношении 3:1.

Эксперименты с гормонами. Незрелые и зрелые зародыши генотипов злаковых растений культивировали в стерильных условиях на среде МС, содержащей 2% сахарозы, 0.7% агара, 6.0 мг/л мезоинозита, 0.4 мг/л тианина, 0.5 мг/л β НУК, 1.0 мг/л кинетина. Такую среду мы обозначили как среда A^+K^+ . Среда, содержащую только кинетин, мы обозначили A^+K^- , среду, содержащую только ауксин - A^-K^+ , среду, содержащую только 2,4-Д - A^-K^- (контроль). Все пробы выращивали в темноте в течение 30-35 дней с последующим переносом на свет.

Размер каллусов устанавливали по его наибольшему диаметру. В общей выборке каллусов исследуемых сортов пшеницы и их дикорастущих сородичей оценивали наличие адвентивных почек и их размер в конце второго и третьего месяцев, а затем рассчитывали средний балл их размера у морфогенных и неморфогенных каллусов.

Выделение РНК проводили с использованием набора препаратов для выделения РНК из растительных тканей RNA-ExtraPhen.

Поли(А)-содержащие мРНК определяли в ходе двухстадийной аффинной хроматографии на поли(У)-сефарозе. Поли(А)⁺⁺ мРНК элюировали при +60°C от поли(А)⁺ мРНК (однократная очистка) - элюированием при +30°C буфером (0.1м трис-НСl, рН 7.8, 0.012 М MgCl₂). Соотношение молекул мРНК с короткими и длинными поли(А) последовательностями на 3'-конце определяли в ходе термального ступенчатого элюирования с колонки поли(У)-сефарозы при температуре +30°C и +60°C соответственно. Содержание РНК определяли исходя из пропорции $22.0 E_{254}^{0.5} = 1$ мг РНК.

Для выделения ДНК использовали метод Plaschke с соавторами (1995).

ПЦР-анализ. ПЦР-анализ проводили по методике Roeder с соавторами (1996) с SSR-праймерами.

Электрофорез продуктов ПЦР проводили в агарозном геле. Для электрофоретического разделения SSR-фрагментов амплифицированной ДНК использовали 2% агарозный гель с добавлением бромистого этидия.

Образцы, содержащие ДНК, наносили с добавлением загрузочного буфера в соотношении 10:1. Электрофорез проводили в специальной камере в ТАЕ буфере в течение 1-2 ч. Маркером длины фрагментов ДНК служил гидролизат ДНК фага λ . Электрофореграммы фотографировали под ультрафиолетовым светом в Bio Doc системе.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Культивирование зародышей пшеницы и эгилопса и их регенерация *in vitro*

В наших исследованиях средой для культивирования служила среда Мурасиге и Скуга - МС с различными добавками фитогормонов, углеводов, амидов, аминокислот в различных сочетаниях.

Исходя из поставленной задачи, мы использовали 12 сред для каллусогенеза, эмбриогенеза и поддержки каллусов длительный период, а также для регенерации растений из каллусов.

Экспериментатор в своей работе может использовать два способа: приготовить одну среду, культивировать на ней разные объекты и выявить, какой именно объект хорошо развивается в данной среде. Другой способ - берется один объект, для него готовятся разные среды и из них выбирается самая оптимальная.

Мы решили вначале к сортам пшеницы Саратовская-24, Стекловидная-29 и эгилопс (*Ae. taushii*) подобрать состав питательных сред, более подходящий именно для этих образцов, а затем посмотреть, как на этих средах будут вести себя каллусы других сортов пшеницы и эгилопс.

Из наших экспериментов видно, что лучше каллусообразование вышеуказанных сортов и эгилопса происходит на средах, содержащих 2,4-Д (№№ 2, 11), но в отличие от среды № 11, на которой на каллусах появлялись адвентивные почки, на среде № 2 каллусы оставались неморфогенными. При повышении концентрации 2,4-Д до 2.0 мг/л отмечено образование неморфогенных каллусов, не способных к формированию растений.

Образование каллуса на среде, содержащей 6-БАП, было низким, при этом каллус образовывался на поздних этапах культивирования незрелых зародышей (среда № 5).

Образование морфогенных структур наблюдалось на средах, содержащих НУК, ИУК, кинетин как в отдельности, так и в различных их сочетаниях (среды № 7-12). Образование морфогенных структур наблюдалось на средах, содержащих ИУК и кинетин в сочетании с аспарагином (среды № 8, 9, 11). Особенно интенсивным был морфогенный процесс с образованием адвентивных почек, глобул, а также корней на среде, содержащей НУК и кинетин в сочетании с аспарагином (среда № 10).

Таким образом, нам удалось подобрать состав питательных сред для каллусогенеза, эмбриогенеза, поддержания каллусов в среде в течение длительного времени, а также среду для регенерации растений.

Среда для каллусогенеза: 0.5 мг/л 2,4-Д, 10 мг/л аспарагина, а также добавление к этой среде 0.5 мг/л ИУК и 0.2 мг/л кинетина.

Среда для морфогенеза и длительного поддержания каллусов: 0.2 мг/л кинетина, 0.2 мг/л 2,4-Д, 0.5 мг/л ИУК, 10 мг/л аспарагина.

Среда для регенерации: 0.5 мг/л кинетина или 6-БАП, 0.2 мг/л НУК, 10 мг/л аспарагина, 0.5 мг/л фолиевой кислоты.

На основе полученных результатов можно заключить, что дикорастущие и культурные растения при их культивировании в определенных условиях формируют каллус и различные органогенные структуры в зависимости от состояния детерминированности каллусных клеток. Процессы каллусообразования и появления морфогенных клеток являются независимыми процессами и контролируются различными группами генов. Органогенез и морфогенез злаковых растений тесно связаны с определенным соотношением фитогормонов и углеводов в культуральной среде. Также показано, что в процессе ускорения морфогенетических потенциалов злаковых растений значительную роль играет правильный подбор концентрации цитокининов и ауксинов и их дифференцированное применение для индукции морфогенеза.

3.2. Прлиферация и морфогенез зародышей разных генотипов злаков *in vitro*

Для каллусных культур генотипов дикорастущих злаковых растений и пшеницы данных очень мало и они противоречивы. Соотношение активности пролиферации каллусных клеток и морфогенеза у исследованных объектов различно.

Обнаружено, что эмбриогенный каллус растет быстрее, чем неэмбриогенный. У дикорастущих злаковых растений интенсивность пролиферации не коррелирует с интенсивностью морфогенеза, что, по-видимому, указывает на отсутствие сопряженностей генетических механизмов пролиферации и морфогенеза при культивировании *in vitro*.

Нормальная пролиферация и рост клеток растений *in vitro* требуют наличия в питательной среде разных комбинаций гормонов. Возникает вопрос: какова природа такой гормонозависимости? Поэтому в наших экспериментах мы изучали роль фитогормонов (кинетина и НУК) на стадии каллусогенеза и регенерации *in vitro* у различных генотипов пшеницы и эгилопса.

Таблица 1

Средняя масса каллусных культур незрелых зародышей пшеницы и зрелых зародышей эгилопса при разном сочетании фитогормонов в культуральной среде

| Среда | Сырая масса каллусов, г | Фитогормональная зависимость, % от контроля |
|--|-------------------------|---|
| Саратовская-29 | | |
| А-К ⁻ (контроль) + 2,4-Д | 0.52±0.03 | 100 |
| А+К ⁺ | 1.78±0.02 | 342.3 |
| А-К ⁺ | 1.37±0.08 | 263.4 |
| А+К ⁻ | 0.94±0.14 | 180.7 |
| Истравшан | | |
| А-К ⁻ (контроль) + 2,4-Д | 0.63±0.04 | 100 |
| А+К ⁺ | 2.02±0.17 | 320.6 |
| А-К ⁺ | 1.81±0.19 | 287.3 |
| А+К ⁻ | 1.10±0.15 | 174.6 |
| Стекловидная-24 | | |
| А-К ⁻ (контроль) + 2,4-Д | 0.44±0.05 | 100 |
| А+К ⁺ | 1.49±0.07 | 338.6 |
| А-К ⁺ | 1.31±0.11 | 297.7 |
| А+К ⁻ | 0.78±0.06 | 177.2 |
| Сете-Церрос-66 | | |
| А-К ⁻ (контроль) + 2,4-Д | 0.32±0.03 | 100 |
| А+К ⁺ | 1.17±0.08 | 365.6 |
| А-К ⁺ | 1.02±0.05 | 318.7 |
| А+К ⁻ | 0.63±0.04 | 196.8 |
| Эгилопс (<i>Ae. cylindrica</i>) | | |
| А-К ⁻ (контроль) + 2,4-Д | 0.17±0.02 | 100 |
| А+К ⁺ | 0.83±0.05 | 488.2 |
| А-К ⁺ | 0.56±0.04 | 329.4 |
| А+К ⁻ | 1.31±0.02 | 770.5 |

Интенсивность роста каллусов оценивали по величине сырой массы в течение цикла культивирования *in vitro*. Массу каллусов определяли в среднем из 10 пробирок.

В табл. 1 приведены результаты экспериментов с незрелыми зародышами генотипов пшеницы (Саратовская-29, Истравшан, Стекловидная-24 и Сете-Церрос-66) и зрелыми зародышами эгилопса, выращенными в питательной среде с фитогормонами и без них, что дало возможность установить их реакцию на различное сочетание фитогормонов. Как видно из данных этой таблицы, отсутствие

фитогормонов в культуральной среде ингибировало появление каллусов. Вместе с тем, добавление фитогормонов (кинетина, НУК в сочетании с 2,4-Д) в среду культивирования незрелых зародышей резко стимулировало образование каллусов.

В присутствии только кинетина (среда А⁺К⁺) у всех генотипов пшеницы рост каллусов был больше, чем в присутствии ауксина.

В отсутствие цитокининов в среде культивирования незрелых зародышей пшеницы (среда А⁺К⁻) наблюдалось уменьшение роста каллусов. Следует отметить, что на среде с ауксином, при последующих пересадках каллусы давали обычную морфофизиологическую реакцию - на них появлялись единичные или множественные эмбриогенные клетки. В некоторых случаях наблюдалось появление побегов-регенерантов. В большинстве случаев первичные каллусы при пересадке в среду без цитокининов и 2,4-Д погибали, т.е. наблюдалась цитокинин-зависимая индукция каллусов у генотипов пшеницы.

Особо необходимо отметить, что в опытах с эгилопсом при посадке зрелых зародышей в среду с отсутствием фитогормонов (А⁻К⁻) также происходило сильное ингибирование роста каллусов, а при дальнейших пересадках в среде А⁺К⁻ каллусы успешно развивались. В присутствии цитокининов (среда А⁺К⁺) в среде культивирования зрелых зародышей эгилопса, даже в последующих пассажах, образование каллусов было в 2,5 раза ниже, чем в среде, содержащей ауксина (среда А⁺К⁻) - наблюдалась ауксин-зависимая индукция каллусов у эгилопса.

Таким образом, использованные в опытах генотипы злаковых растений оказались разночувствительными к фитогормонам. В случае с сортами пшеницы (Саратовская-29, Истрвшан, Стекловидная-24, Сете-Церрос-66) индукция каллусов требовала для интенсивного роста наличия в среде культивирования кинетина, т.е. являлась цитокининотрофной культурой, а в случае с эгилопсом - ауксинотрофной культурой.

В следующих экспериментах на среде для каллусогенеза анализировали способность генотипов пшеницы к каллусообразованию. Как показывают данные табл. 2, интенсивность образования каллусов имела генотипический характер. Среди изученных сортов пшеницы потенциальную способность к каллусогенезу проявили сорта Стекловидная-24, Алекс, Истрвшан, Сете-Церрос-66, ЭСИ-24 (Na160/HEINEVII/Вuc/3/F59.71/GHK), Сурхак (Кумсангир). У этих сортов каллусообразование составило от 82.0 до 100% от количества посаженных эксплантов. Наименьшее образование каллусов наблюдалось у сортов Джагер, Норманн, NAZ. У этих сортов образование каллусов составило от 26.2 до 41.2% от посаженных эксплантов в среде А⁺К⁺ с добавлением 0.2 мг/л 2,4-Д.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что интенсивность каллусообразования имеет генотипический характер и индуцируется при добавлении в среду культивирования ауксинов и цитокининов (среда А⁺К⁺) до определенного уровня. При изменении состава питательной среды сорта могли бы проявить себя по-другому, и мы наблюдали бы, скорее всего, другую картину каллусообразования.

Таблица 2

Каллусогенез у разных генотипов пшеницы

| Сорт | Количество эксплантов | Количество образовавшихся каллусов | Каллусообразование, % |
|--------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------|
| Саратовская-29 | 130 | 101 | 77.6 |
| Стекловидная-24 | 130 | 120 | 92.3 |
| Джагер | 40 | 15 | 37.5 |
| Алекс | 50 | 42 | 84.0 |
| Истрвшан | 60 | 60 | 100.0 |
| Сете-Церрос-66 | 50 | 41 | 82.0 |
| Сурхак (Шурабад) | 80 | 42 | 52.5 |
| Норман | 80 | 21 | 26.2 |
| Навруз | 80 | 63 | 78.7 |
| NAZ | 80 | 33 | 41.2 |
| ЭСИ-24 | 40 | 36 | 90.0 |
| Сурхак (Кумсангир) | 40 | 35 | 87.5 |
| Лалмикилак | 40 | 25 | 62.5 |
| Алмалы | 40 | 28 | 70.0 |

Далее изучалась динамика нарастания каллусов у некоторых генотипов злаковых растений. В табл. 3 представлена динамика роста незрелых зародышей сортов пшеницы (Истрвшан, Стекловидная-24, Алекс) и зрелых зародышей эгилопса (*Ae. cylindrica*) на питательной среде, содержащей разное соотношение гормонов и 2,4-Д. Как показывают данные табл. 3, у изученных сортов пшеницы активный рост каллусов длился до 40 дней, после стабилизировался.

Таблица 3

Сырая масса каллусов пшеницы и эгилопса (мг)

| Варианты | Продолжительность культивирования, дни | | | | |
|--|--|-----|------|------|------|
| | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| Сорт Алекс | | | | | |
| А-К+ | 6.4 | 8.4 | 14.7 | 14.7 | 14.9 |
| А-К ⁻ (контроль) | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| Сорт Сете-Церрос-66 | | | | | |
| А-К+ | 4.1 | 6.2 | 7.8 | 8.4 | 8.8 |
| А-К ⁻ (контроль) | 0.2 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.5 |
| Сорт Истрвшан | | | | | |
| А-К+ | 3.3 | 4.7 | 14.3 | 15.1 | 16.1 |
| А-К ⁻ (контроль) | 0.3 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 |
| Эгилопе (<i>Ae. cylindrica</i>) | | | | | |
| А+К ⁻ | 1.1 | 2.1 | 4.4 | 4.5 | 4.7 |
| А-К ⁻ (контроль) | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.3 |

В контрольном варианте (среда А-К⁻) активный рост был продолжительнее и медленнее. Вместе с тем, следует отметить, что увеличение массы каллусов у исследованных сортов неодинаково. Наибольший размер каллусов наблюдался у сорта Истрвшан и Алекс. У сорта Сете-Церрос-66 масса каллусов была меньше, чем у сортов Истрвшан и Алекс. Что же касается динамики роста каллусов у эгилопса, то она по характеру напоминает динамику роста каллусов пшеницы, но масса каллусов в течение 60 дней увеличивалась значительно меньше. В контрольном варианте (А-К⁻) масса каллусов у эгилопса была гораздо меньше, чем в среде, содержащей ауксин (среда А⁺К⁻).

Таким образом, полученные данные указывают на то, что размер и масса каллусов также являются цитокинин-зависимыми у всех исследованных сортов пшеницы, каллусогенез у эгилопса является более ауксин-зависимым, а также, что незрелые зародыши развивались быстрее, чем зрелые.

Различие в потребности фитогормонов у сортов пшеницы и у эгилопса возможно связано с эпигенетическим характером гормонозависимости у генотипов с разной активацией генетических элементов ДНК в контрастных условиях их произрастания.

Из полученных результатов следует, что для интенсивной инициации каллусной ткани и регенерации из нее растений следует учитывать генотипические и эпигенетические особенности злаковых растений. Выход морфогенных каллусов можно стимулировать, применяя гормоны в разных сочетаниях в среде культивирования зародышей.

3.3. Характеристика маркировки каллусов по морфогенетическому потенциалу

Нами проведены исследования генотипических особенностей незрелых зародышей пшеницы и зрелых зародышей эгилопса в культуре

in vitro и роли гормонального статуса среды на выход морфогенных каллусов.

Для геномного анализа зародышей злаковых представляет интерес установление соотношения между процессами пролиферации и морфогенеза *in vitro*. Это позволяет судить о генетической общности исследуемых процессов, несмотря на различное их генетическое происхождение.

Регенерационную способность каллусов рассчитывали как отношение общего количества растений-регенерантов к общему числу каллусов с адвентивными почками и выражали в процентах (табл. 4).

Таблица 4
Морфогенез каллусных культур зародышей злаковых растений

| Сорта пшеницы | Количество посаженных экплантов, шт, | Количество образовавшихся каллусов, % | Морфогенные каллусы, % | Неморфогенные каллусы, % | Регенерационная способность, % | Балл |
|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------------|------|
| Истравшан | 100 | 81 | 66.6 | 33.3 | 31.4 | 4 |
| Алекс | 100 | 73 | 64.3 | 35.6 | 29.7 | 4 |
| Сете-Церрос-66 | 100 | 34 | 52.9 | 47 | 27.7 | 3 |
| Саратовская-29 | 100 | 39 | 30.7 | 69.2 | 16.7 | 2 |
| Стекловидная-24 | 100 | 44 | 36.3 | 63.6 | 43.7 | 4 |
| Эгилопсы | | | | | | |
| <i>Aegilops cylindrica</i> | 50 | 47 | 21.2 | 78.7 | 10 | 2 |
| <i>Aegilops triuncialis</i> | 50 | 42 | 28.5 | 71.4 | 16.6 | 2 |

Исследование морфогенеза разных сортов пшеницы и видов эгилопса позволило выявить некоторые особенности морфогенного потенциала злаковых растений. В наших опытах начало морфогенеза сортов пшеницы отмечалось на 35 сутки культивирования каллусов. Эти процессы начинались с появления на каллусах ярко-зеленых глобулярных участков ткани, на которых в дальнейшем развивались адвентивные почки и/или корни. У эгилопса начало морфогенеза отмечалось на 60-70 сутки культивирования каллусов, т.е. позже, чем у пшеницы. У эгилопса на 60-70 дни культивирования также отмечалось появление адвентивных почек и/или корней. Данные каллусы можно считать морфогенными, в отличие от каллусов, не дающих адвентивные почки (неморфогенные каллусы).

Морфогенетическая способность каллусов проявлялась в конце четвертого месяца культивирования каллусов у всех сортов пшеницы. Окончательное появление адвентивных почек у эгилопса происходило в конце пятого месяца и/или начале шестого. Однако не все каллусы,

образовавшие адвентивные почки, были способны формировать регенеранты.

Количество каллусов, дающих регенеранты, было небольшим и зависело от генотипов злаковых растений.

Наибольшей способностью к каллусообразованию обладали сорта пшеницы Истравшан, Алекс, у которых количество каллусов составило более 70%. У видов рода Эгилопс образование каллусов было меньше, чем у пшеницы, и составило 42-47% (21-23 шт.).

При изменении концентрации 2,4-Д от 0.2 мг/л до 2 мг/л появлялись каллусы двух типов: 1 тип - каллус с белым матовым цветом, плотной компактной структурой, в дальнейшем на этом каллусе образовались ярко-зеленые участки, а затем - растения-регенеранты, 2 тип - желтый, рыхлый, мягкий - этот каллус был неморфогенным.

Наибольшее количество морфогенных каллусов было у сортов Истравшан, Алекс и Сете-Церрос-66, количество которых превышало 50% (52.9-66.6%). Количество морфогенных каллусов было больше у сортов Истравшан, Алекс, Сете-Церрос-66, тогда как количество морфогенных каллусов у эгилопсов и сортов пшеницы Саратовская-29, Стекловидная-24 было меньше, чем неморфогенных каллусов. Наибольшей регенерационной способностью обладал сорт Стекловидная-24 (43.7%), у сортов Истравшан, Алекс, Сете-Церрос-66 регенерационная способность составила от 27.7 до 31.4%. Следует отметить, что у пшеницы сорта Саратовская-29 как количество морфогенных каллусов - 30.7%, так и регенерационная активность были ниже, чем у остальных сортов - 16.7 % (возможно потому, что этот сорт является гибридом пшеницы и пырея).

Исследование морфогенеза каллусных культур разных генотипов злаковых позволило маркировать наиболее активные морфогенные каллусы, т.е. наибольшую пролиферацию каллусных клеток с образованием адвентивных почек (корни) по четырехбалльной шкале. Балл - это относительный показатель, мы рассчитывали его по способности накопления массы и размеру каллуса, каллусам с 0.5 см мы давали 1 балл, 1.0 см - 2 балла, 1.5 - 3 балла, 2.0 - 4 балла, а также учитывали появление на нем глобулярных структур, консистенцию, цвет. Оценка размеров каллусов по этой шкале показала, что у всех генотипов пшеницы уровень формирования адвентивных почек зависел от размера каллусов, поэтому каллусы большего размера должны обладать и большей биомассой, и такие каллусы обладают способностью к формированию эмбриогенных каллусов большего объема, но это не значит, что каллусы способны увеличиваться до очень больших размеров. Аналогичную зависимость мы наблюдали и у эгилопса.

Оценка каллусов по четырехбалльной шкале также показала существенное отличие между сортами пшеницы и дикорастущими видами злаковых растений. Наибольший балл был у сортов Истрвшан, Алекс, Стекловидная-24, наименьший - у сорта Саратовская-29.

Уровень морфогенных каллусов дикорастущих видов не превышал 2 балла, т.е. практически не наблюдалось видового отличия по этим признакам. Вместе с тем, у сортов пшеницы обнаружено существенное сортовое (внутривидовое) различие морфогенных каллусов, оцениваемых по четырехбалльной системе.

Таким образом, маркировка каллусов по морфогенетическому потенциалу, размерам каллусов и плотности их консистенции (по четырехбалльной шкале) может быть характеристикой, которую можно использовать для клеточной селекции каллусных культур злаковых растений.

Полученные данные свидетельствуют о возможности выработки критериев, имеющих прогнозирующее значение в отношении оценки морфогенетической способности каллусов разных генотипов злаковых растений.

3.4. Транскрипционная активность в каллусах пшеницы и эгилопса *in vitro*

Особое место в исследовании механизмов каллусогенеза и органогенеза занимает изучение экспрессии РНК, транскрипционной активности генов, поскольку эти вопросы практически не изучены у дикорастущих злаковых растений и пшеницы.

Разный уровень интенсивности каллусогенеза и органогенеза пшеницы и эгилопса возможно связан с активностью транскрипционной системы генома у этих растений. Возможно, транскрипция поли(А)-содержащих РНК является одним из контролирующих факторов в культуре *in vitro*, что и побудило нас заняться подобными исследованиями.

В работах многих авторов (Плотников, Бакалдина, Сметанин, 2000) показано, что стабильность и функционирование мРНК значительно меняются под влиянием абиотических факторов у проростков пшеницы. Вышеперечисленные работы указывают на то, что модуляция стабильности вторичных структур посредством варьирования поли(А)-последовательностей мРНК может являться одним из факторов адаптации растений и, возможно, играет важную роль в процессе регенерации в культуре *in vitro*.

Как видно из данных табл. 5, по накоплению поли (А)-содержащих РНК проростки эгилопса и пшеницы, выращенные в чашках Петри,

существенно отличаются друг от друга. Содержание суммарной РНК, а также поли(А)-РНК в проростках гораздо выше, чем в семенах как у пшеницы, так и у эгилопса. Анализ этих данных указывает на то, что образование поли(А)-содержащих РНК является одним из факторов морфогенетической активности клеток, которая зависит от состояния растений.

Таблица 5

Содержание суммарной РНК и поли(А)-содержащих РНК в семенах и проростках эгилопса и пшеницы

| Генотип | Суммарная РНК, мкг/г сыр. массы | Поли(А)-РНК, мкг/г сыр. массы | Поли(А)-РНК, % |
|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------|
| Семена | | | |
| Эгилопс (<i>Ae. cylindrica</i>) | 20.2±2.5 | 0.09±0.3 | 0.4 |
| Пшеница (сорт Стекловидная-24) | 32.3±5.4 | 0.50±0.3 | 1.5 |
| Проростки | | | |
| Эгилопс (<i>Ae. cylindrica</i>) | 36.2±5.1 | 1.42±0.3 | 3.9 |
| Пшеница (сорт Стекловидная-24) | 64.5±5.5 | 4.20±1.1 | 6.5 |

Далее мы изучали содержание РНК на стадии каллусогенеза и органогенеза при изменении соотношения ауксинов и цитокининов. Как видно из данных табл. 6, на стадии каллусогенеза содержание суммарной РНК в контрольном варианте в каллусах эгилопса примерно в два раза ниже, чем у пшеницы. Если при добавлении в культуральную среду для каллусогенеза эгилопса НУК содержание общей фракции РНК составляло 12.3 мкг/мг сырой массы каллуса, то при добавлении кинетина ее содержание несколько уменьшалось и составляло 10.1 мкг/мг сырой массы каллуса. Так, содержание поли(А)-РНК при добавлении в среду каллусогенеза НУК составляло 0.83 мкг/мг сырой массы каллуса от общей фракции РНК, а при добавлении в среду культивирования цитокинина ее содержание было ниже и составляло 0.42 мкг/мг сырой массы каллуса.

Другая зависимость установлена у пшеницы. Более высокий уровень содержания РНК в каллусах пшеницы обнаружен при культивировании каллусов в среде, содержащей кинетин - 54.7 мкг/мг сырой массы каллуса, в отличие от среды, содержащей ауксин - 50.3 мкг/мг сырой массы каллуса. Содержание поли(А)-фракций РНК при добавлении в среду культивирования цитокинина составляло 5.5 мкг/мг сырой массы каллуса, а при добавлении ауксина содержание поли(А)-РНК было несколько ниже и составляло 4.1 мкг/мг сырой массы каллуса.

Таким образом, на уровне каллусогенеза эгилопса и пшеницы выявлена разная зависимость от фитогормонов: каллусогенез эгилопса является более зависимым от ауксина, а пшеницы - от цитокинина.

Следует отметить, что добавление 2,4-Д как агента, индуцирующего каллусогенез, вызывает ингибирование экспрессии разных фракций РНК, как у дикорастущих злаковых растений, так и у пшеницы. Добавление в питательную среду 2,4-Д приводит, по-видимому, к экспрессии определенных генов, вызывающих только лишь образование однотипных клеток, т.е. каллусов. Переход каллусных клеток к дифференцировке требует участия новых иницирующих компонентов, таких как изменение соотношения ауксинов и цитокининов, добавление к среде культивирования органических кислот и амидов, а также - исключение из среды гормона ауксинового типа - 2,4-Д.

Таблица 6

Содержание различных фракций РНК в каллусах эгилопса и пшеницы в зависимости от наличия в культуральной среде фитогормонов (стадия каллусогенеза)

| Среда | Суммарная РНК, мкг/мг сыр. массы | Поли (А)-РНК, мкг/мг сыр. массы | Поли (А)-РНК, % |
|--|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------|
| Эгилопс (<i>Ae. cylindrica</i>) | | | |
| А·К ⁻ + 2,4-Д (контроль) | 7.3±1.7 | 0.22±0.03 | 3.0 |
| А ⁺ К ⁺ | 14.5±1.8 | 0.67±0.05 | 4.6 |
| А ⁺ К ⁻ | 12.3±1.2 | 0.83±0.04 | 6.7 |
| А·К ⁺ | 10.1±1.1 | 0.42±0.04 | 4.1 |
| Пшеница (Сорт Стекловидная-24) | | | |
| А·К ⁻ + 2,4-Д (контроль) | 16.4±2.3 | 0.93±0.05 | 5.6 |
| А ⁺ К ⁺ | 34.4±4.7 | 6.52±0.20 | 18.9 |
| А ⁺ К ⁻ | 50.3±2.4 | 4.12±0.3 0 | 8.2 |
| А·К ⁺ | 54.7±4.2 | 5.50±0.30 | 10.6 |

Примечание: А·К⁻ - среда МС без фитогормонов, с 2,4-Д,
 А⁺К⁺ - среда МС с ауксином и кинетином,
 А⁺К⁻ - среда МС с кинетином, без ауксина (НУК),
 А·К⁺ - среда МС с ауксином, без кинетина.

Образование эмбрионидных структур и формирование нормальных растений требует наличия как цитокинина, так и ауксина. Но эти гормоны по-разному действуют на содержание как суммарной РНК, так и поли(А)-фракции РНК, так же, как в варианте с каллусогенезом эгилопса - при дифференцировке каллусных клеток с образованием морфологических органов, более зависимым от наличия в культуральной среде ауксина (табл. 7). При добавлении в среду органогенеза ауксина содержание

общей РНК и ее поли(А)-фракций гораздо выше, чем в варианте с цитокинином. Если фракция поли(А)-РНК при добавлении ауксина в среду органогенеза эгилопса соответствовала примерно 1.12 мкг/мг сырой массы каллуса, то при наличии в среде цитокинина ее содержание было несколько ниже и составляло 0.86 мкг/мг сырой массы каллуса.

Различие в действии ауксинов и цитокининов на экспрессию разных фракций РНК в каллусогенезе и органогенезе может свидетельствовать о независимом влиянии этих двух гормонов на экспрессию различных фракций РНК в процессе каллусогенеза и органогенеза у представителей дикорастущих злаковых растений.

Таблица 7

Содержание различных фракций РНК в каллусах эгилопса и пшеницы в зависимости от наличия в культуральной среде фитогормонов (стадия органогенеза)

| Среда | Суммарная РНК, мкг/мг сыр. массы | Поли(А)-РНК, мкг/мг сыр. массы | Поли(А)-РНК, % |
|--|----------------------------------|--------------------------------|----------------|
| Эгилопс (<i>Ae. cylindrica</i>) | | | |
| A ⁻ K ⁻ + 2,4-Д (контроль) | 12.3±2.2 | 0.45±0.08 | 3.6 |
| A ⁺ K ⁺ | 27.2±2.7 | 1.28±0.02 | 4.7 |
| A ⁺ K ⁻ | 25.9±2.3 | 1.12±0.05 | 4.3 |
| A ⁻ K ⁺ | 20.6±2.2 | 0.86±0.07 | 4.1 |
| Пшеница (Стекловидная-24) | | | |
| A ⁻ K ⁻ + 2,4-Д (контроль) | 32.4±2.3 | 1.83±0.05 | 5.6 |
| A ⁺ K ⁺ | 64.5±5.4 | 10.20±1.40 | 15.8 |
| A ⁺ K ⁻ | 56.8±5.2 | 7.90±1.40 | 13.9 |
| A ⁻ K ⁺ | 55.8±5.5 | 8.10±0.30 | 14.5 |

Таким образом, при дифференцировке каллусных клеток у эгилопса наблюдалось ауксин-зависимое накопление поли(А)-РНК, и при органогенезе оно было больше, чем при каллусогенезе (табл. 6 и 7).

Несколько иная картина наблюдалась при дифференцировке каллусных клеток у пшеницы. Дифференцировка каллусных клеток с образованием различных органов и ростовые процессы больше зависели от наличия цитокинина и меньше от ауксина. Высокая степень зависимости органогенеза от ауксина и/или цитокинина не наблюдалась, но содержание различных фракций РНК при органогенезе было выше, чем при каллусогенезе. Вместе с тем, если при каллусогенезе у пшеницы имела место большая зависимость от цитокинина, то в процессе органогенеза такой четкой зависимости от использованных в эксперименте гормонов (НУК и кинетин) не наблюдалось.

Содержание суммарной РНК составляло 56.8 мкг/мг сырой массы каллуса в среде с ауксином и 55.8 мкг/мг сырой массы каллуса в среде с кинетином. Другая зависимость обнаружена по накоплению поли(А)-

РНК. При добавлении в среду только ауксина содержание составляло 7.9 мкг/мг сырой массы каллуса, а при добавлении только кинетина - 8.1 мкг/мг сырой массы каллуса, т.е. кинетин и НУК примерно одинаково вызывали экспрессию поли(А)-содержащих РНК в процессе органогенеза пшеницы.

Поли (А)-фракции РНК при образовании генеративных органов у пшеницы почти одинаково экспрессируются при добавлении в культуральную среду как ауксина (НУК), так и цитокинина (кинетин или 6-БАП). Вместе с тем, общее содержание поли (А)-фракций РНК больше у пшеницы, чем у эгилопса в фазе образования вегетативных органов, а также при каллусогенезе (табл. 7).

Можно предположить, что в среде, содержащей ауксин и цитокинин (0.5 мг/л НУК и 1 мг/л кинетина), активность генома связана с транс-факторами, сопряженными с регуляторными последовательностями ДНК.

Возможно, гормоны, взаимодействуя с транс-факторами, вызывают подавление экспрессии одних генов и активацию других на участке промотора, находящегося в регуляторной области ДНК. Необходимо проведение дальнейших специальных исследований гормонозависимой экспрессии генов у злаковых растений.

Вместе с тем, ответ на причины генетической изменчивости, возникающей при культивировании зародышей злаковых растений в культуре *in vitro*, может дать анализ ампликонов, образующихся при ПЦР-реакции, что послужило задачей дальнейших наших исследований.

3.5. Изучение полиморфизма ДНК проростков и каллусных культур пшеницы и эгилопса

Трудность в изучении соматоклональной изменчивости связана с необходимостью разработки методов, с помощью которых можно было бы четко выявлять достоверные генетические различия между каллусными культурами и исходными линиями, из которых они получены.

В последние годы находит все более широкое применение метод ПЦР-анализа из-за относительной простоты и эффективности. ДНК-маркеры используются для выявления генетического родства между близкими видами растений, что хорошо дополняет традиционные методы. Действие полимеразной цепной реакции (ПЦР) заключается в амплификации в пробирке определенного участка ДНК в условиях повторяющихся температурных циклов. В своей основе ПЦР - обычная биохимическая реакция синтеза, катализируемая ферментом полимеразой.

Открытие ПЦР было обусловлено расшифровкой нуклеотидных последовательностей генома ряда микроорганизмов и обнаружением

термоустойчивой Taq-ДНК-полимеразы. Данный фермент содержится в живущих в горячих источниках бактериях *Thermus aquaticus*, обладает исключительной термостойкостью и сохраняет ферментативную активность в течение 40 мин при температуре +95° С. Замена ранее использовавшейся неустойчивой к высоким температурам ДНК-полимеразы Taq-полимеразой позволила сократить время проведения реакции.

Для внутривидового сравнения разных геномов высокоэффективны SSR-маркеры, которые дают возможность выявить генетические различия между разновидностями, сортами, линиями и даже отдельными особями одного и того же вида, что имеет важное практическое значение для характеристики разных линий и создания перспективных форм растений.

Применение ДНК-маркеров открывает новые перспективы для изучения природы соматической изменчивости. ДНК-маркеры успешно применяются и для построения генетических карт. Усовершенствование техники использования ДНК-маркеров открывает новые перспективы в решении задач идентификации и анализа генов, обуславливающих практически значимые качественные и количественные признаки растений.

Молекулярные маркеры, полученные на основе ПЦР, являются методической базой изучения структурно-функциональной организации и изменчивости геномов различных растений.

Изменение в уровне функциональной активности генома на стадии каллусогенеза, морфогенеза и эмбриогенеза, очевидно, также связано со структурными изменениями ДНК. Невидимые структурные изменения ДНК при прохождении разных стадий клеткой в условиях *in vitro* можно идентифицировать методом ПЦР-анализа.

Одна из задач нашей работы состояла в том, чтобы изучить полиморфизм ДНК проростков и каллусных культур пшеницы и эгилопса с использованием ПЦР-анализа.

В нашей работе для изучения полиморфизма ДНК пшеницы и эгилопса, выращенных в обычных условиях, и каллусных культур мы использовали метод молекулярного генотипирования с использованием SSR-маркеров Simple Sequence Repeats (повторы простых последовательностей) (праймеры 513, 58) или микросателлитов. Простые повторяющиеся последовательности распределены по всему геному и образованы многократным (до нескольких тысяч раз) повторением структурного элемента, состоящего из 1-6 нуклеотидов (Хурматов и др., 2007).

Исследование полиморфизма ДНК разных генотипов можно разделить на два этапа. К первому относится электрофорез белков,

полиморфизм которых отражает несинонимические замены в кодирующих последовательностях, вследствие чего происходит существенное изменение электрического заряда белковой молекулы, т.е. продукта конкретного гена. Второй этап заключается в выявлении мини- и микросателлитных продуктов, полиморфизм которых был связан со вставками - делециями элементарной единицы повтора и отличается от белкового полиморфизма более широким аллельным разнообразием. Это служило основанием для разработки методов оценок полиморфизма полилокусных фрагментов ДНК, т.е. оценки инвертированных повторов, локализованных на флангах нити ДНК.

Следующим, более информативным этапом является использование ДНК-биочипов (SNP) для структурно-функционального анализа полиморфизма растений. Оно позволяет обнаружить множественные мононуклеотидные сайты полиморфизма, выявить распределение вдоль геномов и сегментные дубликации, а также выделить наиболее консервативные участки ДНК в некодирующих геномных последовательностях.

На рис. представлены SSR-спектры (праймер 513) разных сортов пшеницы и эгилопса и каллусных культур. Этот праймер оказался более информативным, в отличие от 58 SSR-праймера.

Более высокий уровень генетического полиморфизма, выявленный нами у каллусных культур, свидетельствует о значительных генетических изменениях, которые могут возникать при выращивании клеток и тканей в условиях *in vitro*.

Нами был исследован полиморфизм фрагментов ДНК сортов пшеницы, эгилопса и их каллусных культур. Спектры продуктов амплификации имели определенную изменчивость при одних и тех же условиях ПЦР с SSR-праймером 513.

Всего было получено шесть фрагментов ДНК. Количество мономорфных и полиморфных фрагментов у всех изученных образцов составляло по 50%. Отличие каллусных культур от проростков заключалось в том, что они имели свой набор амплифицируемых продуктов, отличающийся количеством фрагментов, а также степенью их выраженности. Следует также отметить, что морфогенные и неморфогенные каллусы у всех исследованных образцов отличались только по степени их выраженности при электрофорезе (исключение составляет только неморфогенный каллус у *Aegilops triuncialis* 52).

Исходя из данных рис., следует отметить, что различия в расположении локусов были обнаружены между пшеницей и эгилопсом (у проростков и их каллусных культур). ПЦР-фрагмент у всех генотипов пшеницы (проростков) не выявлялся на уровне 240-245 п.н., тогда как при

использовании геномной ДНК, выделенной из их каллусных культур, такой ПЦР-фрагмент присутствовал. Также можно отметить, что у сортов Джагер и ЭСИ-24 у проростков также отсутствовал ПЦР-фрагмент на уровне 390-395 п.н., но присутствовал в каллусных культурах.

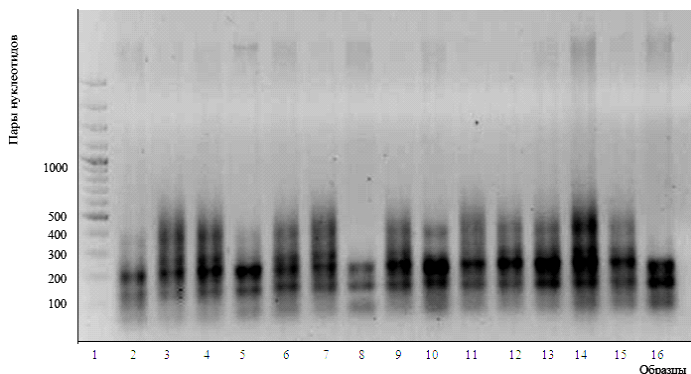


Рис. Электрофореграмма продуктов ПЦР разных сортов пшеницы и эгилоса и их каллусных культур.

SSR-праймер 513. 1 - линейка (*Hind III*); 2 - С-Ц-66 (проросток); 3 - С-Ц-66 (морфогенный каллус); 4 - С-Ц-66 (неморфогенный каллус); 5 - Джагер (проросток); 6 - Джагер (морфогенный каллус); 7 - Джагер (неморфогенный каллус); 8 - ЭСИ-24 (проросток); 9 - ЭСИ-24 (морфогенный каллус), 10 - ЭСИ-24 (неморфогенный каллус); 11 - *Ae. cylindrica* 71* (проросток); 12 - *Ae. cylindrica* 71 (морфогенный каллус); 13 - *Ae. cylindrica* 71 (неморфогенный каллус); 14 - *Ae. triuncialis* 52* (проросток); 15 - *Ae. triuncialis* 52 (морфогенный каллус); 16 - *Ae. triuncialis* 52 (неморфогенный каллус).

* *Ae. cylindrica* (каталожный номер 71), произрастающий в Файзабадском районе, *Ae. triuncialis* (каталожный номер 52), произрастающий в Тавильдаринском районе.

Количество мономорфных и полиморфных фрагментов у отдельно взятого образца составляло соответственно 66.7% и 33.3% у сортов Сете-Церрос-66, Джагер, ЭСИ-24. Эти результаты указывают на значительный уровень внутривидового полиморфизма, выявляемого на уровне целого растения и его каллусной культуры. Возможно, это связано с тем, что у пшеницы в процессе селекции при получении гибридов закреплялись какие-то последовательности нуклеотидов (или признаки), которые в культуре *in vitro* проявились как соматональные вариации.

Что касается эгилоса, то следует отметить, что больших отличий между проростками и их каллусными культурами не обнаружено и локусы на уровне 240-245 п.н. и 390-395 п.н. присутствовали как у проростков, так и их каллусных культур (исключение составляет только неморфогенный каллус у *Aegilops triuncialis* 52). Количество же

мономорфных и полиморфных фрагментов у *Aegilops cylindrica* 71 составляет - 100% мономорфных фрагментов против 0% полиморфных. Возможно, это связано со стабильностью генома у эгилопса.

Хотя для выявления полиморфизма ДНК нами использовано ограниченное количество SSR-маркеров, тем не менее, различия между проростками пшеницы, эгилопса и каллусами очевидны. Эти различия, выявляемые на уровне целого растения и его каллусной культуры, можно использовать для создания растений с качественно полезными признаками.

ДНК-маркеры (SSR) могут служить быстрым и достаточно надежным способом выявления генетических различий между исходными растениями и каллусами.

Можно заключить, что при SSR-анализе происходит отбор моноинерционных линий из гибридных линий со множественными вставками, что имеет важное значение в селекционной работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ресурс эффективных генов, обуславливающих устойчивость к болезням, в генофонде мягкой пшеницы крайне ограничен. Один из возможных путей его расширения - интрогрессия генов от дикорастущих сородичей. Среди них важную роль играют виды рода *Aegilops L.* Использование нетрадиционных технологий в повышении продуктивности и устойчивости к абиотическим стрессам зерновых культур является эффективным благодаря фундаментальным знаниям в области молекулярной биологии и биотехнологии. Вместе с тем, попытка их использования у зерновых культур пока еще до конца не решена в связи с трудностями методического характера. Достижения последних лет дают надежду на преодолимость имеющихся методических затруднений и возможность использования методов клеточной биотехнологии для создания новых типов растений, устойчивых к экстремальным природным воздействиям (засоление, засуха, высокая температура).

В нашей работе большое внимание уделено регенерации растений в культуре незрелых зародышей пшеницы и зрелых зародышей эгилопса. К важному позитивному результату работы можно отнести получение эмбриогенной культуры каллусных клеток и их регенерацию. На наш взгляд, представляет интерес разработка гормональной системы для пшеницы и эгилопса, эффективно влияющей на каллусогенез, эмбриогенез и регенерацию растений *in vitro*. Полученные результаты свидетельствуют о разном гормональном статусе питательной среды при культивировании каллусов пшеницы и эгилопса, что может являться основой для разработки перспективных методов биотехнологии злаковых растений.

Наиболее сложными и мало изученными вопросами являются процессы морфогенеза клеток *in vitro* у зерновых злаков. Это направление является решающим для разработки методов регенерации злаковых культур и

реконструкции растений *in vitro* с целью получения устойчивых к стрессовым воздействиям растений, обладающих высокой продуктивностью.

Кроме того, использование методов биотехнологии позволяет привести к достижениям в понимании вопросов каллусогенеза, эмбриогенеза и регенерации растений в условиях *in vitro*.

Нами разработаны селективные среды для каллусогенеза, эмбриогенеза и регенерации злаковых растений *in vitro*. Экспланты зародышей сначала выращивались в среде для каллусогенеза, затем переносились в среду для морфогенеза, а уже потом в селективную регенерационную среду. Регенерированные растения переносились в торфо-почвенную среду на 3-4 недели при температуре +3...+4°C и затем высаживались в почву. Процессы каллусогенеза и формирования эмбрионных структур пшеницы и эгилопса различались по потребности в гормонах в системе *in vitro*. Было установлено, что каллусогенез и образование адвентивных почек эгилопса больше зависят от наличия в культуральной среде ауксина, а пшеницы - цитокинина.

Анализ поли(А)-содержащих фракций РНК показал, что ее содержание в клетках каллуса и эмбрионных клетках эгилопса также увеличивается при наличии в культуральной среде выращивания ауксина. При каллусогенезе и органогенезе пшеницы в среде, содержащей цитокинин, наблюдается наибольшее количество поли(А)-содержащих РНК. Таким образом, полученные результаты указывают на различия транскрипционного уровня регуляции синтеза РНК в системе *in vitro*, связанного, возможно, со специфичностью зависимости синтеза белковых факторов транскрипции от ауксина и цитокинина, характерных для представителей разных групп злаковых. Существенным шагом в понимании механизмов органогенеза могут служить данные о различиях в копийности некоторых генов, выявляемых в ходе ПЦР-анализа ДНК пшеницы и эгилопса. Высокий уровень каллусогенеза и органогенеза у некоторых видов злаковых растений и сортов пшеницы, видимо, зависит от вариабельности белкового индекса.

Полученные результаты, возможно, указывают на различие в активации генов при каллусогенезе, органообразовании и соматическом эмбриогенезе, которые зависят от гормонального статуса среды. В культуре *in vitro* может также проявляться активность специфичных генов, экспрессия которых связана с активацией транскрипции и посттранскрипции *in vitro* под влиянием экзогенных гормонов. Возможно, в культуре *in vitro* также имеет место явление снятия организменного уровня контроля генной экспрессии, которое играет важную роль в растениях. Гены, контролирующие морфогенез *in vitro*, могут служить инструментом для повышения эффективности методов биотехнологии злаковых растений. Возможно, по этим причинам проявлялось различие на посттранскрипционном уровне у пшеницы и эгилопса в культуре *in vitro*, что может служить основой для создания новых форм злаковых растений с признаками высокой устойчивости к неблагоприятным факторам. Это требует дальнейшего специального исследования.

Для Таджикистана, с его резко контрастными природно-экологическими зонами, биотехнологические подходы будут играть более важную роль в

повышении урожайности путем создания пластичных сортов злаковых культур (особенно пшеницы) в условиях возрастающего действия абиогенных стрессов.

ВЫВОДЫ

1. Подобран состав питательных сред, оптимальных для каллусогенеза, эмбриогенеза и длительного поддержания каллусных культур зародышей пшеницы и эгилопса, а также для регенерации растений.

2. Незрелые и зрелые зародыши дикорастущих (эгилопс) и культурных растений (пшеница) при их культивировании в определенных условиях формируют каллус и различные органогенные структуры в зависимости от состояния детерминированности каллусных клеток. Показано, что для интенсивной инициации каллусной ткани и регенерации из нее растений следует учитывать как генотипические, так и эпигенетические особенности злаковых растений. Выход морфогенных каллусов можно стимулировать, применяя гормоны в различных сочетаниях.

3. Наиболее эффективными по регенерационной способности оказались экспланты незрелых зародышей сортов пшеницы Стекловидная-24, Алекс, Сете-Церрос-66, Истравшан, Джагер, топкроссный гибрид ЭСИ-24 (Na160/HEINEVII/Buc/3/F59.71/GHK); зрелых зародышей видов эгилопса: *Ae. taushii* - образцы под каталожными номерами 3-1; 8-1; 8-2; 10-1; 10-2; 11-1; 11-2; 17-1; 35-1; *Ae. cylindrica* - 61-1; 69; 71; 72; *Ae. triuncialis* - 52; 53; 54. Причем в культуре *in vitro* проявилась большая регенерационная способность у незрелых зародышей пшеницы, в отличие от зрелых зародышей эгилопса.

4. Полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют в пользу существования различной зависимости между гормональным статусом, ростом каллусов и морфогенетической спецификой сортов пшеницы и эгилопсов в культуре *in vitro*. При каллусогенезе сорта пшеницы проявляют цитокининовую зависимость, а дикорастущие злаки (эгилопс) - ауксиновую зависимость, т.е. первые можно классифицировать как цитокининтрофные, а вторые как ауксинотрофные растения.

5. Каллусообразующая и регенерационная способность незрелых и зрелых зародышей злаковых растений *in vitro* на молекулярном уровне выражается в изменении синтеза РНК, особенно поли(А)-содержащей фракции РНК (мРНК), вызываемого дифференцированной активностью генов.

6. Переход от каллусообразования к морфогенезу сопряжен с усилением синтеза поли(А)-фракций РНК. Накопление поли(А)-содержащей РНК существенно выше у пшеницы и на стадии каллусообразования и на стадии морфогенеза, чем у эгилопса на этих стадиях соответственно. Показано цитокинин-зависимое накопление поли(А)-содержащей РНК у пшеницы, а у эгилопса ауксин-зависимое.

7. С помощью ДНК-маркеров (SSR-праймер 513) выявлены определенные генетические различия между исходными растениями и культурой *in vitro* (каллусами).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Файзиева С.А., Наимов С.Н., Насырова Ф.Ю., Алиев К.А. Особенности культивирования разных сортов пшеницы и их регенерация *in vitro* // Известия АН РТ. Отд. биол. и мед. наук. 2006. № 1 (154). С. 30-34.
2. Алиев К.А., Алиева С.К., Умаров Х.У., Назарова Н.Н., Мирзоханова Г.О., Файзиева С.А., Каримов Б.К. Биотехнология растений в Таджикистане // В сб. Вклад физиологии, генетики, селекции и биотехнологии растений в решение проблем сельского хозяйства, посвященной 15-летию государственной независимости Таджикистана. 2006. С. 35-57.
3. Наимов С., Нигмонов М., Насырова Ф.Ю., Касымова Г.Ф., Хурматов Х.Х., Донцова С.В., Кавракова З.Б., Файзиева С.А., Сергеев Д.А., Гулов М.К., Алиев К.А., Рахматов А.С., Кичитов В.К. Каталог видов и образцов рода *Aegilops L.*, собранных в различных эколого-географических зонах Таджикистана // Институт физиологии растений и генетики Академии наук Республики Таджикистан. Душанбе. 2007. 57с.
4. Наимов С., Нигмонов М., Насырова Ф.Ю., Касымова Г.Ф., Хурматов Х.Х., Донцова С.В., Кавракова З.Б., Файзиева С.А., Сергеев Д.А., Гулов М.К., Алиев К.А., Рахматов А.С., Кичитов В.К. // Авторское свидетельство № 048ТJ от 23.10.2007. Душанбе.
5. Файзиева С.А. Морфогенез и каллусогенез разных генотипов пшеницы *in vitro* // Конференция "Чавонон ва илми муосир". Душанбе. 2007. С. 106-109.
6. Файзиева С.А., Наимов С.Н., Алиев К.А. Взаимосвязь пролиферации и морфогенеза в каллусных культурах разных генотипов пшеницы *in vitro* // Международная конференция "Современная физиология растений: от молекул до экосистем". Сыктывкар. 2007. С. 214-216.
7. Кавракова З.Б., Сергеев Д.А., Файзиева С.А., Хурматов Х.Х., Наимов С.Н., Насырова Ф.Ю. Изучение генетической изменчивости видов рода *Aegilops L.*, произрастающих в Таджикистане, с помощью молекулярных маркеров // Материалы научной конференции, посвященной 120-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова. Душанбе. 2007. С. 36-38.
8. Хурматов Х.Х., Сергеев Д.А., Кавракова З.Б., Файзиева С.А., Наимов С.Н., Насырова Ф.Ю. Молекулярные маркеры ДНК в генетико-популяционных исследованиях // Известия АН РТ. Отд. биол. и мед. наук. 2007. № 1 (158). С. 32-37.
9. Хурматов Х.Х., Кавракова З.Б., Файзиева С. А., Гулов М.К., Сергеев Д. А., Наимов С.Н., Насырова Ф.Ю. Анализ генетического разнообразия рода эгилопс с помощью молекулярных маркеров // Материалы республиканской конференции "Адаптационные аспекты функционирования живых систем". Душанбе. 2007. С. 154-158.
10. Файзиева С.А., Сабоиев И.А., Наимов С.Н., Алиев К.А. Взаимосвязь пролиферации и морфогенеза незрелых зародышей разных генотипов злаков *in vitro* // Известия АН РТ. Отд. биол. и мед. наук. 2008. № 2 (163). С. 49-55.
11. Файзиева С.А., Наимов С. Н., Алиев К.А. Посттранскрипционная активность каллусов пшеницы и эгилопса *in vitro* // Доклады АН РТ. 2008. Т. 51, №6. С. 458-464.

12. Файзиева С.А., Сабоиев И.А., Наимов С.Н., Алиев К.А. Особенности морфогенеза незрелых зародышей разных генотипов злаков *in vitro* // Материалы научной конференции, посвященной памяти академика Академии наук Республики Таджикистан Ю.С. Насырова "Достижения современной физиологии растений: теоретические и прикладные аспекты". Душанбе. 2008 г. С. 120-122.

13. Файзиева С.А., Наимов С., Насырова Ф.Ю., Хурматов Х.Х., Алиев К.А. Изучение полиморфизма ДНК проростков и каллусных культур пшеницы и эгилопса // Известия АН РТ. Отд. биол. и мед. наук. 2008. № 4 (165). С. 29-35.