УДК 575.155

ЧИННИКИ СОМАКЛОНАЛЬНОЇ МІНЛИВОСТІ РОСЛИН

О.М. БУБЛИК

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, буд. 150
e-mail: o.m.bublyk@imbg.org.ua

Проаналізовано літературні дані щодо чинників, які обумовлюють рівень та особливості генетичних та епігенетичних змін у рослин в культурі in vitro. Значну роль відіграє насамперед вид рослини – часто сомаклональні зміни відображають зміни геному в процесі видоутворення. Певна частина сомаклональних змін є реалізацією мутацій у клітинах експланта, зокрема результатом міксоплоїдності вихідних рослин. Подальше накопичення геномних змін відбувається у процесі вирощування під впливом умов культури in vitro та підлягає добору, селективним фактором якого є пристосованість клітин із певними генетичними особливостями до умов культивування (тверде або рідке живильне середовище) та складу живильного середовища, особливо наявності та співвідношенню у ньому регуляторів росту. Значний вплив на рівень сомаклональної мінливості чинить спосіб регенерації та тип росту культури тканин (організований або неорганізований).

Ключові слова: культура клітин і тканин рослин, сомаклональна мінливість, тривалість культивування in vitro, компоненти живильного середовища, умови культивування, тип росту культури тканин.

Явище сомаклональної мінливості

Сомаклональна мінливість проявляється у клітинах, тканинах та органах рослин в культурі *in vitro* та у рослин-регенерантів як кількісні та якісні мутації, цитологічні порушення, зміни послідовності ДНК, активація та припинення експресії генів [1].

Вперше наявність у культурі *in vitro* клітин із геномними змінами (поліплоїдією та анеуплоїдією, різними аномаліями мітозу) була показана Р. Готре в 1935 р. [2]. Пізніше було встановлено, що високий рівень геномної мінливості – це одна з характерних особливостей клітинних культур, яка виявляється не лише при вивченні каріотипу, а й послідовностей ядерної, хлоропластної та мітохондріальної ДНК [3].

Термін «сомаклональна мінливість» [4] вперше було запропоновано для позначення фенотипної мінливості серед рослин-регенерантів, отриманих із культивованих тканин, однак із часом він набув ширшого значення і на сьогоднішній день застосовується для позначення будь-яких генетичних або епігенетичних змін в культурі *in vitro.*

Це явище має практичне значення для селекції, оскільки є джерелом генетичної різноманітності. Сомаклональну мінливість успішно застосовують для надання господарсько цінним видам бажаних ознак (підвищення врожаю, якості зерна, зміни часу цвітіння тощо), стійкості до хвороб та шкідників, гербіцидів, соле-, морозо- та посухостійкості, стійкості до інших абіотичних стресів [5, 6]. З іншого боку, сомаклональна мінливість зумовлює труднощі багатьох

© О.М. БУБЛИК, 2011

прикладних напрямків, пов'язаних із культурою *in vitro* – мікроклонального розмноження рослин [7], кріозбереження [8], трансформації [5, 9], тривалого стабільного культивування ліній-продуцентів біологічно активних речовин [3], тощо.

Чинники, які впливають на сомаклональну мінливість

Рівень та особливості геномних змін у культурі *in vitro* насамперед залежать від виду рослини та стану геному клітин експланта і знаходяться під впливом низки інших факторів: тривалості культивування, складу живильного середовища, умов вирощування, ступеня відхилення культури від організованого росту [3, 10, 11].

Умови *in vitro* можуть виявляти мутагенний вплив, оскільки клітини експланта зазнають дії стресу, зумовленого травмою при відділенні експланта від материнської рослини та стерилізацією, відмінним від властивого організму фітогормональним складом живильного середовища, геном клітин може зазнавати перепрограмування під час дедиференціації та регенерації в умовах, відмінних від природних [12, 13].

Додатковим чинником, що впливає на напрямок сомаклональної мінливості в культурі *in vitro*, є адаптивна селекція. Зокрема, таким чином може регулюватися плоїдність культивованих *in vitro* клітин, що приводить клітинні популяції до оптимального для даних умов культивування співвідношення клітин із різною кількістю хромосом. Це пояснюється тим, що клітини з різною кількістю хромосом відрізняються за активністю синтезу певних метаболітів, і між ними виникають симбіотичний зв'язок або антагонізм, засновані на обміні продуктами метаболізму. В основі добору можуть лежати і відмінності за тривалості клітинного циклу у клітин різної плоїдності [3]. Продемонстровано також можливість добору ненаправлених спонтанних мутацій ДНК, селективним фактором якого є пристосованість клітин із певним типом мутацій до відмінностей у складі середовищ [14]. Явище подібне до дії на геномну мінливість в культурі *in vitro* добору, селективним фактором якого є пристосованість клітин із певними генетичними особливостями до умов вирощування, показане й для рослин у природі – зафіксована поява специфічних змін геному, що корелюють із умовами зростання (особливостями клімату й ґрунту) (див. наприклад [15]).

Окремі роботи порівнюють силу впливу різних факторів на рівень сомаклональної мінливості. У *Picea mariana* і *P. glauca* статистичний аналіз, проведений для клона, родини клона і тривалості культивування як змінних, показав, що найбільш важливим джерелом генетичної нестабільності був клон, за яким йшла тривалість культивування [11]. За результатами цитофотометричного аналізу у *Curcuma aromatica* старіння калюсу більш ефективно індукувало сомаклональну мінливість, ніж застосовані регулятори росту, що засвідчено частотами поліплоїдних клітин у рослин-регенерантів [16].

Генотип та джерело експлантів

Для багатьох видів рослин показано, що здатність до калюсогенезу, тривалого росту в умовах *in vitro*, морфогенезу, ембріогенезу, тощо відрізняється у різних генотипів [17, 18]. Літературні дані свідчать про те, що рівень мутаційних змін у культурі *in vitro* також залежить від генотипу [5]. Наприклад, це було показано для різних видів стахісу [19], сортів ячменю [20], персика [21], часнику [22], дифенбахії [23] і цукрової тростини [24], сортів і мутантних форм гороху [25], клонів ялин *Picea mariana* і *Picea glauca* [11], родин напівсибсів сосни звичайної *Pinus sylvestris* [26]. Зокрема різні види можуть відрізнятися за рівнем хромосомної стабільності. Наприклад, жито має більшу хромосомну нестабільність, ніж ячмінь або просо, що пов'язують

із гіперваріабельними повторюваними послідовностями, розташованими в гетерохроматині жита [27].

Виявлено, що геномні реорганізації в культурі *in vitro* протягом адаптації клітин до умов ізольованого росту часто мають каналізований характер і певним чином повторюють зміни цього геному у природі в процесі видоутворення. Наприклад, у родині *Solanaceae* багато видів родів *Nicotiana*, *Solanum*, *Lycopersicon* та інших виникли в результаті поліплоїдії. І в культурі клітин цих видів геномна мінливість – це переважно мінливість числа хромосом, яка має широкий розмах і сягає високих рівнів плоїдності. Види *Crepis* відрізняються переважно морфологією хромосом, а поліплоїдія тут зустрічається рідше. Аналогічно, геномна мінливість культивованих *in vitro* клітин *C. capillaris* в основному полягає у зміні морфології хромосом. Цікаво, що серед перебудованих каріотипів переважають такі, що нагадують за морфологією окремі хромосоми і навіть каріотипи інших видів роду *Crepis*, а саме *C. pulchra, C. parviflora, C. alpina, C. rhoeadifolia, C. kotschyana* та ін. [28, 29].

Невипадковий характер змін рослинного геному в умовах ізольованого росту клітин на штучних живильних середовищах показано і на рівні ДНК. Наприклад, у раувольфії зміїної (*Rauwolfia serpentina)* спостерігали паралелізм між перебудовами в клітинах *in vitro* і міжвидовими відмінностями, що виникли в процесі еволюції – фрагменти ДНК культивованих клітин, перебудовані порівняно з рослиною вихідного виду, нагадували такі у окремих представників інших видів роду *Rauwolfia* [30]. Аналогічно, дослідження на сої показали, що усі нові рестрикційні фрагменти рослин-регенератів були присутні у інших сортів сої [31], а у двох регенерантів часнику спостерігали появу RAPD-фрагмента, що збігався за розміром із фрагментом, присутнім у спектрі іншого сорту [22]. При дослідженні рослин-регенерантів картоплі виявлено невипадковий характер перебудов генів рРНК – EcoRI фрагменти 3'-кінцевої послідовності рДНК регенерантів, отриманих із протопластів одного сорту, були подібні до таких в інтактних рослинах іншого сорту [32]. На невипадковий характер геномних перебудов у клітинах *in vitro* вказується також і в роботах [33–37], причому таку закономірність знайдено і для змін метилювання ДНК [38, 39]. Накопичені дані можуть свідчити про певну спільність механізмів еволюції геному рослин у природі в процесі видоутворення і в культурі *in vitro* протягом адаптації клітин до умов ізольованого росту.

Окрім ділянок геному, що за сомаклональної мінливості відтворювали мінливість у природі, виявлено існування нестабільних районів геному рослин із підвищеною здатністю до виникнення мутацій в культурі *in vitro*. Існування таких ділянок геному, так званих "гарячих точок", продемонстровано в низці робіт виконаних на житі [34, 40], унгернії Віктора (*Ungernia victoris*) [41], часнику [22], цибулі ріпчастій [42], пшениці [43]. У регенерантів жита чотири з таких гіперваріабельних ділянок були просеквеновані, одна з них ідентифікована як частина теломерного тандемного повтору, інша виявила високу подібність до ділянок ретротранспозонів Angela, послідовності решти не були виявлені у базах даних [40]. Запропоновано практичне використання чутливих до стресу в культурі тканин ділянок геному із підвищеним рівнем мутацій, як маркерів для ранньої діагностики сомаклональної мінливості [44].

Інший прояв сомаклональної мінливості – варіювання кількості хромосом у культурі *in vitro* – може бути обумовлений соматичними мутаціями [45, 46] й міксоплоїдією вихідних експлантів, широко розповсюдженою у апоміктичних видів та видів, які вегетативно розмножуються [47]. Такі види є полісоматичними – їхні сома-

тичні клітини зазнають ендоредуплікації, яка супроводжує диференціацію, і веде до міксоплоїдизації тканин. Немеристематичні експланти таких рослин є сумішшю клітин із різним рівнем плоїдності, що відображається у культурі тканин *in vitro* [48]. Наприклад, поліплоїдні клітини спостерігали у листках, коренях, але не в апікальних меристемах стебел, стеблах та оцвітині орхідеї. Також знайдено неоднорідний розподіл поліплоїдних клітин у різних частинах листків та коренів. Відмічено, що рівень ендополіплоїдії зародків зростав протягом розвитку [49]. Частота високоплоїдних клітин (>8С) у стеблевих експлантах *Asparagus officinalis* збільшувалася зі зростанням відстані від апікальної меристеми стебла. Калюси, які походили від віддалених від апекса секцій, також демонстрували вищу плоїдність (до 16С), ніж решта [50]. Дані щодо різних рівнів плоїдності різних тканин та органів отримано для низки видів рослин [49, 51–56], в окремих випадках міксоплоїдію спостерігали і у меристемах [54, 57]. Наприклад, у клітинах кінчиків коренів рослин *Centaurea ragusina* було знайдено порушення мітозу, зокрема анеуплоїдію, поліплоїдію, розриви хромосом та хромосомні мости [46].

Генетичні відмінності різних тканин зафіксували на молекулярному рівні – у тканин листка, стебла, кореня і бульби картоплі спостерігали різницю за RAPD-маркерами [58]. У межах однієї рослини (у різних зразках листків) було виявлено мінливість мікросателітного локуса у *Robinia pseudoacacia* [59]. При введенні в культуру *in vitro* такі генетично неоднорідні тканини дають початок гетерогенним клітинним популяціям [3, 50, 53, 60]. Наприклад, при дослідженні порушень мітозу у клітинах листків *Coffea arabica*, що були використані як експланти, та у клітинах отриманого із них калюсу, клітини із порушеннями мітозу було знайдено в обох тканинах. Ці порушення включали поліплоїдію, анеуплоїдію, липкі хромосоми, подвійні профази і відстаючі хромосоми. Також спостерігали інтерфазні клітини із мікроядрами або двоядерні. Проте частота знайдених порушень була достовірно вищою у калюсі, ніж у листках. Калюс мав також декілька додаткових порушень, таких як к-мітоз, зчеплені хромосоми, мультиполярні метафази і хромосомні мости [45].

Вплив на виникнення генетичних змін *in vitro* може чинити і стадія розвитку тканин, використаних як експлант – так поява мутантного алеля мікросателітного локуса у регенерантів винограду була пов'язана із стадією відбору вихідного матеріалу [61].

Тривалість культивування *in vitro*

У процесі вирощування посилюється геномна нестабільність культури тканин. Показано, що вік культури впливає на частоту хромосомних аберацій – загалом ця частота зростає із віком калюсу (див. огляд [27]). Наприклад у ембріогенних культур кукурудзи частка анафаз із мутаціями зростала від 4 % на 3 місяці до 10,6 % на 12 місяців культивування, спостерігали накопичення хромосомних мостів і фрагментів [62]. Аналогічно, зростала частота хромосомних мутацій (анеуплоїдії, змін морфології хромосом, дицентриків тощо) у регенерантів дуба – від 49 % після 4 місяців культивування до 88 % після 20 місяців [63]. У пшениці в 4-місячній калюсній культурі виявили 12 % аберантних хромосом, у подальшому рівень аберацій зростав і досягав 80 % у 8-місячному калюсі [60]. Показано збільшення довжини теломер і кількості теломерних повторів у калюсних культурах ячменю, отриманих із незрілих зародків, із віком калюсу [64]. У регенерантів *Curcuma aromatica*, отриманих із калюсу віком 180 днів частота поліплоїдних клітин була вищою, ніж у регенерантів, що походили із 60-денного калюсу [16].

Таку ж закономірність – пряму залежність рівня сомаклональної мінливості від

віку культури тканин – виявлено і для змін послідовності ДНК. Наприклад, у культури тканин *Ungernia victoris* зафіксовано виникнення змін RAPD-спектрів протягом першого року вирощування і подальше накопичення цих змін протягом другого та третього років: середнє арифметичне генетичних дистанцій за Жакардом між рослиною-донором та калюсними культурами віком 1 рік становило 0,68 %, 2 роки – 1,55 %, та 3 роки – 2,13 % [65]. З підвищенням віку калюсу *Eucalyptus globulus* підвищувалася мінливість отриманих від нього рослин-регенерантів. У межах груп регенерантів, отриманих шляхом непрямого органогенезу від однієї рослини, середня кількість поліморфних AFLP-фрагментів становила відповідно 3,08, 5,40 і 8,38 для 6, 8 і 10 пасажів отримання регенерантів; частка рослин без поліморфних фрагментів становила 41,67 %, 35 % і 25 % відповідно [66].

У цукрового буряка при тривалому (більше двадцяти років) культивуванні калюсних ліній виявлено прогресуючі із часом зміни морфології клітин – вгинання ядра, багатоядерність, вакуолізація ядерця і дефекти клітинної стінки [67].

Збільшення рівня мінливості кодуючих послідовностей також прямо корелює із тривалістю культивування, що показано для генів сахарозосинтази, АТФ/АДФ-транслокатора та актину – у калюсної культури кукурудзи було знайдено значну мінливість довжини та копійності фрагментів цих генів [68].

Із часом перебування в культурі *in vitro* можуть посилюватися і епігенетичні зміни. Наприклад, показано деметилювання геномів рослин-регенерантів хмелю, що прогресувало із кількістю пасажів органогенного калюсу, від якого вони були отримані [69].

Із віком культури спостерігали підвищення рівня транскрипції у трьох родин ретротранспозонів рису (Tos10, Tos17 і Tos19) [70].

Вплив тривалості культивування не обмежується ядерним геномом, а зачіпає увесь генетичний матеріал клітини. Так, делеції і перебудови мітохондріальної ДНК зустрічалися частіше у регенерантів рису, які отримували із тривалокультивованих клітинних культур [71]. Одномісячні культури тканин рису не мали делецій у пластомі, а культури після 11 років вирощування мали різні ступені делецій та перебудов у 100 % випадків [72].

Мутації якісних ознак також накопичуються із часом при культивуванні *in vitro* [72, 73]. Так, серед регенерантів тюльпана фенотипічно нормальними були рослини, отримані методом циклічної мультиплікації бічних пагонів після двох років культивування. Однак серед регенерантів, отриманих із чотирирічної культури усі рослини мали змінений колір пелюсток. Також із чотирьох-семирічних культур були отримані ювенільні рослини із аномальними листками. За допомогою RAPD та ISSR-маркерів показано, що ця фенотипічна мінливість супроводжувалася генетичними змінами [75].

Було зроблено спробу описати математично залежність частоти сомаклональних змін від тривалості культивування. У суспензійної ембріогенної культури кави (*Coffea arabica* L.) частота морфологічних варіантів (*f*) зростала експоненційно із віком культури (*t*) (3, 6, 9 та 12 місяців) у відповідності із функцією $f = 0.99e^{0.267t}$ [76].

Разом із тим, накопичено дані, які не дозволяють говорити про існування простої пропорційної залежності між тривалістю культивування клітин і рівнем накопичення генетичних змін. На цитологічному рівні для низки видів рослин було показано, що після завершення формування клітинного штаму (8–10-й пасаж) за незмінних умов вирощування спостерігається

відносний генетичний гомеостаз, підтримуваний дією стабілізуючого добору [3].

У деяких випадках не можна виявити і прямої закономірності із накопичення генетичних змін у регенерантів, отриманих із старіших культур тканин, порівняно із молодшими. Наприклад, рівень мінливості за RAPD- та ISSR-маркерами у регенерантів гороху після 10 років культивування не перевищував рівня мінливості після двох років культивування. Порівняння ж регенерантів, отриманих після восьми місяців і 10 років у культурі *in vitro* виявило пряму залежність рівня мінливості від тривалості вирощування [25]. Вік калюсу не мав впливу і на рівень сомаклональної мінливості у регенерантів дифенбахії – рівні мінливості у рослин, що регенерували із 8- і 16-місячного калюсу були однакові [23]. У отриманих із калюсу рослинах *Theobroma cacao* генетичні та епігенетичні відмінності від вихідних рослин (вивчені відповідно за допомогою SSR- та MSAP-маркерів (methylation-sensitive amplified polymorphism)) спершу накопичувалися із віком культури, досягаючи максимуму на 10–14 тижні), а при подальшому культивуванні – зменшувалися до закінчення експерименту (22 тиждень) [77]. Можливим поясненням такої картини є втрата тотипотентності клітинами із значними генетичними порушеннями і розвиток регенерантів лише із генетично стабільних клітин, як на початкових, так і на пізніх етапах культивування калюсу.

Склад живильного середовища та умови культивування

Істотний вплив на рівень і спектр змін геному, що виникають в культурі *in vitro*, мають компоненти живильних середовищ, умови культивування та продукти метаболізму клітин [3]. Вважають, що провідну роль при цьому відіграють фітогормони та синтетичні регулятори росту [14, 78–86]. Є дані про можливість впливу на сомаклональну мінливість також вітамінів [87, 88], сахарози [89, 90], агару [78, 91, 92] і мінеральних солей [93, 94].

Дисбаланс регуляторів росту у середовищі, особливо ауксинів і цитокінів, є важливою причиною стресу і призводить до вітрифікації, сомаклональної мінливості, нездатності культивованих клітин та тканин до відповіді на маніпуляції в культурі *in vitro* і перетворення їх на незалежні від ростових факторів [13]. Особливе значення регуляторів росту пов'язано із тим, що вони впливають на процес поділу клітини [95].

Показано, що під впливом регуляторів росту на рослинну клітину може відбуватися диференційна реплікація повторюваних послідовностей високої частоти [96], активація промоторів деяких транспозонів [97], зміна кількості хромосом [3, 50, 55, 79, 80, 86] та вмісту ядерної ДНК [79, 81], аберації хромосом [3, 98], зміни спектрів ізоферментів [84], індукція сестринських хроматидних обмінів [99] та специфічні перебудови геному, що визначаються молекулярно-генетичними маркерами, зокрема методом RAPD-ПЛР [14, 82, 83, 100, 101].

Виявлено зв'язок рівня метилювання ДНК у культурі тканин й фітогормонального складу живильного середовища. Так, загальний рівень метилювання суспензійної культури моркви змінювався у відповідь на зміну концентрації гормонів у середовищі. Рівень метилювання знижувався зі збільшенням концентрації кінетину, але підвищувався зі збільшенням концентрації ауксинів 2,4-Д, НОК і ІОК [102]. Додавання кінетину до живильного середовища спричиняло значне зниження рівня метилювання ДНК моркви і за даними іншого дослідження [103]. Також показано вплив регуляторів росту на метилювання ДНК у суспензійних культур баклажана (*Solanum melongena L.*) [104].

Відомо, що регулятори росту у низьких та близьких до оптимальних доз, мають захисну (антимутагенну) дією, а у підвищених, навпаки, – мутагенну [3]. Так, з набору концентрацій α-НОК, застосованих при вирощуванні культури тканин орхідеї *Doritaenopsis*, істотну поліплоїдизацію клітинної популяції спричиняла концентрація 10 мг/л, але не нижчі концентрації (1 і 5 мг/л) [80]. У клітин калюсу тютюну α – НОК викликала зменшення кількості ДНК у ядрах у концентрації 18,6 мг/л, а нижчі концентрації (0,2 і 1,9 мг/л) не впливали на зміну цієї ознаки [81]. Збільшення концентрації кінетину з 4 до 8 мг/л сприяло значному підвищенню рівня генетичної різноманітності у культурі тканин кактуса *Cereus peruvianus*: із 176 врахованих RAPD-ампліконів поліморфними були 40 і 80 відповідно [82]. Хоча зустрічаються і повідомлення про відсутність впливу високих концентрацій регуляторів росту на генетичну стабільність культури тканин – застосування до 10 мг/л 6-бензиламінопурину та кінетину дозволяло отримати рослини-регенеранти банана, стабільні за RAPD- та ISSR-маркерами [105]. Протиріччя даних із впливу на сомаклональну мінливість різних концентрацій екзогенних регуляторів росту, імовірно, пов'язані з індивідуальними потребами різних видів, сортів, ліній рослин у регуляторів росту і різними порогами прояву селективного й мутагенного впливів останніх.

Рівень мутагенної активності відрізняється у різних регуляторів росту, наприклад 2,4-Д має більший вплив на зміни генетичного апарату клітини, ніж НОК у таких самих концентраціях, або концентраціях того ж порядку [55, 65, 80, 106]. Так, у суспензійної культури орхідеї *Doritaenopsis* культивування з 1 мг/л 2,4-Д спричиняло значне зменшення частки клітин із вмістом ДНК 4С і збільшення клітин із 8С. Застосування НОК призводило до подібного, але менш вираженого результату зміни структури клітинної популяції лише в концентрації 10 мг/л, але не в нижчих концентраціях (1 і 5 мг/л) [80]. У *Urginea indica* 2,4-Д (2 и 4 мг/л) і НОК (2 мг/л) відрізнялися за впливом на полісоматичну тканину експланту. 2,4-Д стимулювала поділ політенних ядер, НОК – ні [55].

Крім того на геномну мінливість культури тканин може впливати і співвідношення різних регуляторів росту у живильному середовищі. Наприклад, надлишок у живильному середовищі ауксинів відносно цитокінінів може призводити до ендоредуплікації [16, 107,108].

Спостерігали залежність геномних змін не лише від складу живильного середовища, але і від способу культивування – у вигляді калюсу на твердому живильному середовищі чи у вигляді суспензії – у рідкому. Для пшениці було показано, що більше хромосомних мутацій індукується у рідкому середовищі, ніж на твердому [109]. Для калюсних і суспензійних культур гаплопаппуса *H. gracilis* [91, 92] і наперстянки *Digitalis lanata* [78] показано, що поліплоїдизація клітинних культур на твердих живильних середовищах відбувалась інтенсивніше, рівень плоїдності у сформованих калюсних штамів був вище, ніж у суспензійних.

Деякі дані свідчать про те, що зміна умов вирощування більше впливає на геномну мінливість культивованих тканин порівняно зі зміною складу живильного середовища. Так рівень поліморфізму RAPD-ампліконів у калюсної культури раувольфії зміїної при зміні умов вирощування з поверхневого на глибинне був значно вищий, ніж при зниженні вмісту сахарози і зміні мінеральної основи агаризованого середовища [110]. У калюсних ліній *U. victoris* встановлено збільшення частки метафаз із диплоїдним набором хромосом за зміни поверхневого на глибинне вирощування, але впливу компонентів живильних середовищ у тому числі регуляторів росту, на фор-

мування певних співвідношень клітин різної плоїдності, при цьому не виявлено [111].

Спонтанні мутації в культурі *in vitro* також можуть бути спричинені продуктами метаболізму культивованих клітин та рослин. До таких автомутагенних речовин належать роданід, ізотіоціанат, путресцин, гістидин, аргінін, сечовина, молочна кислота, малонова кислота, формальдегід, ацетальдегід, пуринові алкалоїди і аденін [112].

Тип росту культури тканин

При розмноженні рослин шляхом регенерації із калюсних, суспензійних культур та протопластів досить часто виникають генетичні зміни. Тому мікроклональне розмноження у промислових масштабах в основному спирається на методи соматичного ембріогенезу та індукції розвитку пазушних бруньок у культурі пагонів, за яких регенерація відбувається із організованих тканин меристем. Вважається, що ці два методи дозволяють отримувати генетично однорідні рослини, оскільки меристеми не мають схильності до генетичних змін, які можуть виникнути під час поділів чи диференціації в культурі *in vitro* [7]. Наприклад показано, що рослини *Eucalyptus camaldulensis* розмножені за допомогою методу індукції розвитку пазушних бруньок у культурі пагонів та перенесені в поле, були стабільними за розміром геному, ПДРФ ядерного геному та геномів органел і RAPD-маркерами [113]. Регенеранти банана, отримані з пазушних бруньок, були абсолютно ідентичними материнській рослині за тридцятьма RAPD- та п'ятьма ISSR-маркерами [114]. При розмноженні *Curcuma caesia* бруньковими експлантами, регеранти виявляли стабільність за вмістом ДНК, RAPD- та ISSR-маркерами [115]. Рослини *Passiflora cincinnata* отримані шляхом первинного і вторинного ембріогенезу (305 і 138 рослин відповідно) за вмістом ядерної ДНК відповідали сіянцям, лише одна рослина з отриманих із первинних ембріонів мала підвищений більш ніж удвічі середній вміст ДНК [116]. Методом соматичного ембріогенезу отримано ідентичні за RAPD-маркерами рослини-регенеранти дуба, генетично стабільними були і вихідні ембріогенні клітинні лінії [117].

Однак із цього правила існують і винятки. Рослини кукурудзи, отримані із культури соматичних ембріоїдів, були варіабельнішими, як за фенотипом, так і цитологічно, ніж отримані шляхом органогенезу [118]. У регенерантів *Tricyrtis hirta,* отриманих із ембріогенних калюсних культур, були знайдені морфологічні відхилення та поліплоїдія [119]. Серед регенерантів чаю, отриманих шляхом соматичного ембріогенезу, лише 9,2 % сомаклонів мали суттєву подібність на генетичному рівні за ISSR-маркерами [120]. При соматичному ембріогенезі у *Pinus pinaster* зафіксовано зміни у SSR-локусах 9,6 % проаналізованих рослин-регенерантів [121]. Серед регенерантів *Robinia ambigua* отриманих методом індукції розвитку пазушних бруньок у культурі пагонів знайдено поліморфізм за RAPD-маркерами, який досягав 26 % поліморфних ампліконів [122]. У рослин цукрової тростини, отриманих із меристем, поліморфізм за 98 RAPD-локусами становив 6,93 % [24].

Рівень генетичної мінливості може відрізнятися у різних типів калюсних культур. Показано, що тип калюсу пов'язаний зі стабільністю числа хромосом культивованих клітин. Морфогенний калюс загалом має нормальну кількість хромосом, у той час як неморфогенний демонструє високу частоту анеуплоїдії і поліплоїдії. Такі дані отримано для *Daucus carota, Hordeum vulgare, Haworthia setata, Nicotiana tabacum, Pisum sativum, Triticum aestivum* і *Zea mays* [27], *Dianthus acicularis* [123], кормового буряка (*Beta vulgaris* L. v.

Crassa) [124], хоча знайдено і винятки із цього правила [125]. Літературні дані надають і непрямі докази оберненої залежності між рівнем диференціації культури тканин й рівнем сомаклональної мінливості, наприклад аналіз морфологічних ознак регенерантів, отриманих із культур тканин різного ступеня диференціації у ячменю [126] і бегонії [127].

Існування оберненої залежності між рівнем сомаклональної мінливості та рівнем відхилення культивованих тканин від організованого росту знайдено при вивченні стабільності послідовностей ДНК різних типів калюсу. Після культивування протягом двох років генетичні дистанції за Жакардом між неморфогенною культурою *U. victoris* та материнською рослиною на двох різних середовищах склали 2,32 та 1,93 %, відповідні показники для морфогенної культури – 1,15 та 0,77 %. Тобто генетичні зміни у неморфогенних калюсів за результатами RAPD-аналізу були до 2,5 разів вищими, ніж у морфогенних [65].

Відмінності між двома типами калюсу на молекулярному рівні були знайдені у дуба: серед чотирьох калюсних ліній, які походили від однієї рослини, лінія, що втратила здатність до ембріогенезу, відрізнялася за RAPD-маркерами від трьох інших ембріогенних ліній [128]. Аналогічно, за RAPD-маркерами знайдено відмінності між здатною і нездатною до регенерації калюсними лініями овочевого стахісу [83], хоча автори не вважають, що знайдені відмінності RAPD-спектрів можуть бути безпосередньо пов'язані зі здатністю калюсів до регенерації.

Також знайдено відмінності різних типів калюсних культур за метилюванням ДНК. Досліджено два типи калюсу олійної пальми (*Elaeis guineensis*): нодулярний компактний калюс і швидкоростучий калюс, із яких відповідно отримували 5 % і 100 % рослин-регенерантів із фемінізованими пиляками. У останнього загальний рівень метилювання був нижчим на 4,5 % (23,2 % та 18,7 % відповідно) [129]. При аналізі ембріогенного і неморфогенного калюсів елеутерококу *Eleuterococcus senticosus* методом MSAP виявлено, що рівень метилювання в ембріогенному калюсі був значно нижчим за такий у неморфогенному. В неморфогенному калюсі було метильовано 16,99 % сайтів 5'-CCGG–3', а в ембріогенному лише 11,2 % [30]. Гіперметилювання залишків цитозину було знайдене у неморфогенного калюсу кормового буряка порівняно із морфогенним калюсом [124].

Зафіксовано, що напрямки змін профілів метилювання ДНК суттєво відрізнялися при соматичному ембріогенезі і органогенезі у *Rosa hybrida*. У ембріогенного калюсу з високою частотою відбувалося деметилювання зовнішніх цитозинів у послідовностях 5'-CCGG–3' і більшість змінених AFLP-фрагментів передавалися рослинам-регенерантам. Однак більшість змінених у органогенного калюсу фрагментів поверталися до вихідного стану у отриманих із нього регенерантів [131].

Різні типи калюсних культур можуть відрізнятися і на біохімічному рівні. Так, у калюсних культур конюшини лугової (*Trifolium pratense*) регенерація супроводжувалася зниженням інтенсивності забарвлення і кількості фрагментів пероксидаз порівняно з нерегенеруючими культурами. Унікальний пероксидазний фрагмент був характерний для нерегенеруючих культур на відміну від регенеруючих [132]. Відрізнялися метаболічні профілі рослин першого покоління, отриманих від трьох типів культур тканин огірка – листкової калюсної культури, цитокінінзалежної клітинної суспензії і рідинної культури меристематичних брилок [133]. Виявлено ізоформи пероксидаз – маркери процесів диференціації й дедиференціації клітин тютюну: ПО з R_f (відносна електрофоретична рухливість білків) 0,14 і 0,21 є маркерами де-

диференціації, а ПО з R_f 0,26; 0,51 і 0,65 – повної диференціації клітин тютюну [134].

Висновок

Коло чинників, які можуть впливати на рівень та особливості геномних змін в культурі *in vitro*, в загальному уже окреслене, проте їхня дія на сьогоднішній день виглядає неоднозначною, а механізми, за якими вони діють, поки не досліджені. Дотепер недостатньо вивчені, зокрема, вплив компонентів живильних середовищ на геном рослинної клітини, реорганізації геному, що супроводжують дедиференціювання та редиференціювання клітин. Незважаючи на накопичення даних щодо дії цих чинників усе ще неможливо передбачати наслідки культивування *in vitro*. Подальше вивчення генетичних основ сомаклональної мінливості, її причин, механізмів, особливостей та розмаху, якого вона може досягати за певних умов, дозволить у перспективі зробити це явище керованим та удосконалити існуючі біотехнологічні методики. Крім того, результати таких досліджень дозволять відповісти і на низку фундаментальних питань, зокрема дослідити відповідь рослин на стрес та визначити клітинні механізми, що діють у процесі еволюції.

Перелік літератури

1. *Kaeppler S. M., Kaeppler H.F., Rhee Y.* Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants // Plant Molec. Biol. – 2000. – T. 43. – P. 179–188.
2. *Gautheret R. J.* La culture *in vitro*: bref apercu historique // C. r. Acad. agr France. – 1980. – Vol. 66, № 8. – P. 621–627.
3. *Кунах В. А.* Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005.– 724 с.
4. *Larkin P. J., Scowcroft W. R.* Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // Theor. Appl. Genet. – 1981. – Vol. 60. – P. 197–214.
5. *Veilleux R.E., Johnson A.T.* Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interaction, and utilization // Plant Breeding Reviews. – 1998. – Vol. 16. – P. 229–268.
6. *Duncan R.R.* Tissue culture-induced variation and crop improvement // Adv. Agron. – 1997. – Vol. 58. – P. 201–240.
7. *Rani V., Raina S.N.* Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal // *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2000. – Vol. 36, № 5. – P. 319–330.
8. *DeVerno L.L., Park Y.S., Bonga J.M., Barrett J.D.* Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss.] // Plant Cell Rep. – 1999. – Vol. 18. – P. 948–953.
9. *Sala F., Castiglione S., Labra M., Savini C., Bracale M., Pelucchi N., Yifan H., Arencibia A.* Somaclonal variation in transgenic plants // Acta Hortic. – 2000. – Vol. 530. – P. 411–419.
10. *Karp A.* Somaclonal variation as a tool for crop improvement // Euphytica. – 1995. – Vol. 85, № 1–3. – P. 295–302.
11. *Tremblay L., Levasseur C., Tremblay F.M.* Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana, Pinaceae*) and white spruce (*P. glauca, Pinaceae*) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability // Am. J. Bot. – 1999. – Vol. 86, №10. – P. 1373–1381.
12. *Jain M.S.* Tissue culture-derived variation in crop improvement // Euphytica. – 2001. – Vol. 118. – P. 153–166.
13. *Van Staden J., Fennell C.W., Taylor N.J.* Plant stress *in vitro*: The role of phytohormones // Acta Horticulturae. – 2006. – Vol. 725, I. – P. 55–61.
14. *Bogani P., Simoni A., Lio P., Germinario A., Buiatti M.* Molecular variation in plant cell populations evolving *in vitro* in different physiological context // Genome. – 2001. – Vol. 44. – P. 549–558.
15. *Nevo E.* Evolution in action across life at "Evolution Canyons", Israel // Trends in Evolutionary Biology. – 2009. – Vol. 1, № 1. – P. 12–34.
16. *Mohanty S., Panda M.K., Subudhi E., Nayak S.* Plant regeneration from callus culture of *Curcuma aromatica* and *in vitro* detection of somaclonal variation through cytophotometric analysis // Biologia Plantarum. – 2008. – Vol. 52, № 4. – P. 783–786.
17. *Кунах В.А.* Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 6. – С. 919–929.
18. *Кушнір Г.П., Сарнацька В.В.* Мікроклональне розмноження рослин. – К.: Наукова думка, 2005. – 272 с.
19. *Легкобит М.П., Хадеева Н.В.* Особенности морфогенеза и появление вариаций при микрокло-

нальном размножении разных видов стахиса // Генетика. – 2004. – Т. 40, № 7. – С. 916–924.
20. *Campbell B.C., LeMare S., Piperidis G., Godwin I.D.* IRAP, a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley // Molecular Breeding. – 2010. – Vol. 27, № 2. – P. 193–206.
21. *Hashmi G., Huettel R., Meyer R., Krusberg L., Hammerschlag F.* RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach // Plant Cell Rep. – 1997. – Vol. 16, № 9. – P. 624–627.
22. *Al-Zahim M.A., Ford-Lloyd B.V., Newbury H.J.* Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis // Plant Cell Rep. –1999. – Vol. 18. –P. 473–477.
23. *Shen X., Chen J., Kane M.E., Henny R.J.* Assessment of somaclonal variation in Dieffenbachia plants regenerated through indirect shoot organogenesis // Cell, Tissue Organ Cult. – 2007. – Vol. 91, № 1. – P. 21–27.
24. *Zucchi M.I., Arizono H., Morais V.A., Pelegrinelli-Fungaro M.H. Carneiro-Vieira M.L.* Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures // Gen. Mol. Biol. – 2002. – Vol. 25, № 1. – P. 91–96.
25. *Кузнецова О.И., Аш О.А., Хартина Г.А., Гостимский С.А.* Исследование растений-регенерантов гороха (*Pisum sativum* L.) с помощью молекулярных RAPD- и ISSR -маркеров // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 1. – С. 71–77.
26. *Burg K., Helmersson A., Bozhkov P., von Arnold S.* Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine // J. Experim. Botany. – 2007. – Vol. 58, № 3. – P. 687–698.
27. *Gupta P.K.* Chromosomal basis of somaclonal variation in plants // Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement / Eds Jain S.M., Brar D.S., Alhoowalia B.S. – Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 1998. – P. 149–168.
28. *Кунах В.А.* Еволюція геному рослин в культурі клітин *in vitro*: особливості, причини, механізми та наслідки / Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. Т. 1. – К.: Логос, 2001. – С. 53–67.
29. *Кунах В.А.* Механізми та деякі закономірності сомаклональної мінливості рослин // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2003. – Т. 1, № 1.– С. 101–106.
30. *Andreev I.O., Spiridonova K.V., Solovyan V.T., Kunakh V.A.* Variability of ribosomal RNA genes in *Rauwolfia* species: parallelism between tissue culture-induced rearrangements and interspecies polymorphism // Cell Biol. Int. – 2005. – Vol. 29. – P. 21–27.
31. *Roth E.J., Frazier B.L., Apuya N.R., Lark K.G.* Genetic variation in an inbred plant: variation in tissue cultures of soybean // Genetics. – 1989. – Vol. 121, № 2. – P. 359–368.
32. *Петюх Г.П., Борисюк Н.В., Кучко А.А., Сидоров В.А.* Изменчивость рибосомальных РНК у сомаклональных вариантов картофеля // Цитология и генетика. – 1995. – Т. 29, № 1. – С. 29–33.
33. *Бублик О.М., Андреев И.О., Спиридонова Е.В., Музыка В.И., Колонина И.В., Кунах В.А.* Изменчивость генома *Ungernia victoris* в природе и в культуре *in vitro* по результатам RAPD – анализа // Материалы IX международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». – Звенигород, 8–12 сентября 2008 г. – Москва, 2008. – С. 54–55.
34. *Linacero R., Freitas Alves E., Vazques A.M.* Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rie // Theor. Apl. Genet.– 2000. – Vol. 100 – P. 506–511.
35. *Мельник В.М., Спірідонова К.В., Андрєєв І.О., Страшнюк Н.М., Кунах В.А.* Варіабельність ядерної 18s–25s рДНК *Gentiana lutea* L. в природі та в культурі тканин *in vitro* // Цитология и генетика. – 2004. – № 3. – С. 16–21.
36. *Aubry C., De Buyser J., Hartmann C., Henry Y., Rode A.* Changes in the molecular organization of the mitochondrial genome in albino tissue cultures derived from wheat pollen embryos and in plants regenerated from these cultures // Plant Sci. – 1989. – Vol. 65, № 1. – P. 103–110.
37. *Dorfel P., Weihe A., Knosche R., Borner T.* Mitochondrial DNA of *Chenopodium album* (L.): a comparison of leaves and suspension cultures // Curr. genet. – 1989. – Vol. 16, № 5–6. – P. 375–380.
38. *Schellenbaum P., Mohler V., Wenzel G., Walter B.* Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (*Vitis vinifera* L.) // BMC Plant Biology. – 2008. – 8:78. doi:10.1186/147.1–2229–8–78.
39. *Bednarek P.T., Orlowska R., Koebner R.M.D., Zimny J.* Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.) // BMC Plant Biology. – 2007. – 7:10. doi:10.1186/1471–2229–7–10.
40. *De la Puente R., Gonzalez A. I., Ruiz M. L., Polanco C.* Somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) analyzed using polymorphic and sequenced AFLP markers // *In Vitro* Cellular and Developmental Biology – Plant – 2008. – Vol. 44, № 5.– P. 419–426.
41. *Бублик О.М., Андрєєв І.О., Спірідонова К.В., Кунах В.А.* Молекулярно-генетичний аналіз рослин-регенерантів *Ungernia victoris* / Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр.

Т. 7. / відп. ред. В.А. Кунах – К.: Логос, 2009. – С. 208–212.
42. *Bohanec B., Jakse M., Ihan A., Jovorik B.* Studies in gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.) – induction procedures and genetic analysis of regenerants // Plant Sci. – 1995. – Vol. 104. – P. 215–224.
43. *Brown P.T.H., Lange F.D., Krang E., Lorz H.* Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology // Gen. Genet. – 1993. – Vol. 237. – P. 311–317.
44. *Oh T.J., Cullis M.A., Kunert K., Engelborghs I., Swennen R., Cullis C.A.* Genomic changes associated with somaclonal variation in banana (Musa spp.) // Physiologia Plantarum. – 2007. – Vol. 129, Is. 4. – P. 766–774.
45. *Menendez-Yuffa A., Da Silva R.F., Rios L., de Enrech N.X.* Mitotic aberrations in coffee (*Coffea arabica* cv. 'Catimor') leaf explants and their derived embryogenic calli // EJB Electron. J. Biotechn. – 2000. – Vol. 3, №.2. – P. 161–166.
46. *Radic S., Prolic M., Pavlica M., Pevalek-Kozlina B.* Cytogenetic stability of *Centaurea ragusina* long-term culture // Plant Cell, Tissue Organ Cult. – 2005. – Vol. 82. – P. 343–348.
47. *Joubes J., Chevalier C.* Endoreduplication in higher plants // Plant Mol Biol. 2000. – Vol. 43, № 5–6. – P. 735–745.
48. *D'Amato F.* Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates // Crit. Rev. Plant Sci. – 1985. – № 3. – P. 73–112.
49. *Lim W.L., Loh Ch.Sh.* Endopolyploidy in Vanda Miss Joaquim (*Orchidaceae*) // New Phytologist. – 2003. – Vol. 159. – P. 279–287.
50. *Mishiba K.-I., Tawada K.-I., Mii M.* Ploidy distribution in the explant tissue and the calluses induced during the initial stage of internode segment culture of *Asparagus officinalis* L. // *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2006. – Vol. 42, № 1. – P. 83–88.
51. *Traas J., Hulskamp M., Gendreau E., Hofte H.* Endoreduplication and development: rule without dividing? // Curr. Opin. Plant Biol. – 1998. – Vol. 1, № 6. – P. 498–503.
52. *Gilissen L.J.W. , van Staveren M.J., Hakkert J.C., Smulders M.J. M., Verhoeven H.A., Creemers-Molenaar J.* The competence of cells for cell division and regeneration in tobacco explants depends on cellular location, cell cycle phase and ploidy level // Plant Science. – 1994. – Vol. 103, № 1. – P. 81–91.
53. *Hajdera I., Siwinska D., Hasterok R., Maluszynska J.* Molecular cytogenetic analysis of genome structure in *Lupinus angustifolius* and *Lupinus cosentinii* // Theor Appl Genet. – 2003. – Vol. 107, № 6. – P. 988–996.
54. *Meric C., Dane F.* Determination of ploidy levels in *Ipheion uniflorum* (R. C. Graham) Rafin (*Liliaceae*) // Acta Biol. Hung. – 2005. – Vol. 56, № 1–2. – P. 129–136.
55. *Jha S., Sen S.* Induction of mitosis in polytene nuclei and hormonal effect on nuclear changes during callus initiation in diploid *Urginea indica* Kunth. (*Liliaceae*) // Genetica. – 1990. – Vol. 80, № 1. – P. 9–15.
56. *Yang M., Loh Ch.Sh.* Systemic endopolyploidy in *Spathoglottis plicata* (*Orchidaceae*) development // BMC Cell Biol. – 2004. – № 5. – P. 33.
57. *Булгаков В.П., Лауве Л.С., Чернодед Г.К., Ходоковская М.В., Журавлев Ю.Н.* Хромосомная вариабельность клеток женьшеня, трансформированных растительным онкогеном *rolC* // Генетика. – 2000. – Т. 36, № 2. – С. 209 – 216.
58. *Chakrabarti S.K., Pattanayak D., Sarkar D., Chimote V.P., Naik P.S.* Stability of RAPD fingerprints in potato: Effect of source tissue and primers // Biologia Plantarum. – 2006. – Vol. 50, № 4. – P. 531–536.
59. *Lian C., Oishi R., Miyashita N., Hogetsu T.* High somatic instability of a microsatellite locus in a clonal tree, Robinia pseudoacacia // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 108, № 5. – P. 836–841.
60. *Henry Y., Marcotte J.L., De Buyser J.* The effect of aneuploidy on karyotype abnormality in wheat plants regenerated from short and long-term somatic embryogenesis // Plant Sci. – 1996. – Vol. 114. – P. 101–109.
61. *Prado M.J., Rodriguez E., Rey L., Gonzalez M.V., Santos C., Rey M.* Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis-regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers // Cell, Tissue Organ Cult. – 2010. – Vol. 103, № 1. – P. 49–59.
62. *Fluminhah A., Kameya T.* Behavior of chromosomes in anaphase cells in embriogenic callus cultures on maize (*Zea mays* L.) // Theor. Appl. Genet. – 1996. – Vol. 92. – P. 982–990.
63. *McCoy T.J., Phillips R.L., Rines H.W.* Cytogenetic analysis of plants regenerated from oat (*Avena sativa*) tissue cultures: high frequency of partial chromosome loss // Can. J. Genet. Cytol. – 1982. – Vol. 24. – P. 37–50.
64. *Kilian A., Stiff C., Kleinhofs A.* Barley telomeres shorten during differentiation, but grow in callus culture// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 92. – P. 9555–9559.
65. *Бублик О.М., Андрєєв І.О., Спірідонова К.В., Кунах В.А.* Мінливість морфогенної та неморфогенної культури тканин *Ungernia victoris* за результатами RAPD-аналізу // Вісник Українського това-

риства генетиків і селекціонерів. – 2008. – Т. 6, № 1. – С. 44–51.
66. *Mo X.Y., Long T., Liu Z., Lin H., Liu X.Z., Yang Y.M., Zhang H.Y.* AFLP analysis of somaclonal variations in Eucalyptus globulus // Biologia Plantarum. – 2009. – Vol. 53, № 4 – P. 741–744.
67. *Hasler J., Wuest J., Gaspar T., Crevecoeur M.* Long term *in vitro*-cultured plant cells show typical neoplastic features at the cytological level // Biology of the Cell. – 2003. – Vol. 95. – P. 357–364.
68. *Brown P.T.H., Gobel E., Lorz H.* RFLP analysis of *Zea mays* callus cultures and their regenerated plants // Theor. Appl. Genet. – 1991. – Vol. 81. – P. 227–232.
69. *Peredo E.L., Revilla, M. A., Arroyo-Garcна R.* Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures of organogenic calli // J. Plant Physiol. – 2006. – Vol. 163, № 10. – P. 1071–1079.
70. *Hirochika H., Sugimoto K., Otsuki Y., Tsugawa H., Kanda M.* Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture // Proc. Natl. Acad. Sci. USA– 1996. – Vol. 93. – P. 7783–7788.
71. *Chowdhury M.K.U., Schaeffer G.W., Smith R.L., DeBonte L.R., Matthews B.F.* Mitochondrial DNA variation in long-term tissue cultured rice lines // Theor. Appl. Genet. – 1990. – Vol. 80. – P. 81–87.
72. *Kawata M., Ohmiya A., Shimamoto Y., Oono K., Takaiwa F.* Structural changes in the plastid DNA of rice (*Oryza sativa* L.) during tissue culture // Theor. Appl. Genet. – 1995. – Vol. 90. – P. 364–371.
73. *Fukui K.* Sequential occurrence of mutations in a growing rice callus // Theor. Appl. Genet. – 1983. – Vol. 65. – P. 225–230.
74. *Zehr B.E., Williams M.E., Duncan R.D.* Somaclonal variation among the progeny of plants regenerated from callus cultures of seven inbred lines of maize // Can. J. Bot. –1987. – Vol. 61. – P. 491–499.
75. *Podwyszynska M., Niedoba K., Korbin M., Marasek A.* Somaclonal variation in micropropagated tulips determined by phenotype and DNA markers // Acta Horticulturae. – 2006. – Vol. 714. – P. 211–219.
76. *Etienne H., Bertrand B.* Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants // Tree Physiology. – 2003. – Vol. 23. – P. 419–426.
77. *Rodriguez Lopez C.M., Wetten A.C., Wilkinson M.J.* Progressive erosion of genetic and epigenetic variation in callus-derived cocoa (*Theobroma cacao*) plants // New Phytologist. – 2010. – Vol. 186, Is. 4. – P. 856–868.
78. *Ernst S., Scheibner K., Diettrich B., Luckner M.* Androgenetic cell cultures and plants from anthers of *Digitalis lanata* // J. Plant Physiol. – 1990. – Vol. 137, № 2, – P. 129–134.
79. *Nayak S., Sen S.* Growth, chromosome number and DNA content in callus of *Ornithogalum thyrosides* as influenced by different auxins // Cytobios. – 1993. – Vol. 76, № 306–307. – P. 209–216.
80. *Mishiba K., Okamoto T., Mii M.* Increasing ploidy level in cell suspension cultures of Doritaenopsis by exogenous application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid // Physiologia Plantarum. – 2001. – Vol. 112. – P. 142–148.
81. *Раклявичене Д., Урбонайте Б.* Содержание ядерной ДНК в процессе дедифференциации клеток каллуса табака в зависимости от типа ауксина и плоидности экспланта // Физиология и биохимия культурных растений. – 1995. – Т. 27, № 5–6. – С. 367–373.
82. *Mangolin C., Ottoboni L, Machado M.* RAPD Markers to Evaluate Callus Tissue of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) Maintained in Different Growth Regulator Combinations // Biochemical Genetics. – 2002. – Vol. 40, № 9–10. – P. 351–358.
83. *Кочиева Е.З, Хуссейн И.А., Легкобит М.П., Хадеева Н.В.* Использование RAPD-анализа для выявления геномного полиморфизма у представителей рода *Stachys* // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 5. –С. 629–634.
84. *Хусейн И.А., Кочиева Е.З., Хадеева Н.В.* Изменение спектров пероксидаз у регенерантов *Stachis sieboldii* (Miq.) в результате гормональных и мутагенных воздействий // Генетика. –2000. – Т. 36, № 8. – С. 1093–1099.
85. *Rakoczy-Trojanowska M.* The effects of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits // Cellular & Molecular biology letters. – 2002. – № 7. – P. 1111–1120.
86. *Kumar S.P., Mathur V.L.* Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum* // Plant Cell, Tissue Organ Cult. – 2004. – Vol. 78, № 3. – P. 267–271.
87. *Попов А.С., Волкова Л.А.* Криосохранение и некоторые изменения культур клеток диоскореи на среде без витаминов // Физиология растений. – 1994. – Т. 41, № 6. – С. 923–928.
88. *Богданова Е. Д.* Эпигенетическая изменчивость, индуцированная никотиновой кислотой у *Triticum aestivum* L. // Генетика. –2003. – Т. 39, № 9. – С. 1221–1227.
89. *Чережанова Л.В., Мелик-Саркисов О.С., Овчинникова В.Н.* Цитогенетический эффект саха-

ров // Генетика. – 1991. – Т. 27, № 8. – С. 1372–1378.
90. *Pijnaker L.P., Ferwerda M.A.* Effect of sucrose on polyploidization in early callus cultures of *Solanum tuberosum* // Plant Cell, Tissue Organ Cult. – 1990. – Vol. 21, № 2. – P. 153–157.
91. *Ashmore S.E., Shapcot A.S.* Cytogenetic studies of *Haplopappus gracilis* in both callus and suspension cell cultures // Theor. Appl. Genet. – 1989. – Vol. 78, № 2. – P. 249–259.
92. *Кунах В.А.* Геномна мінливість соматичних клітин рослин 6. Мінливість та добір у процесі адаптації до умов вирощування *in vitro* // Біополімери і клітина. – 2000. – Т. 16, № 3. – С. 159–186.
93. *Hashim Z.N., Campbell W.F., Carman J.G.* Normalization of the DNA content of telophase cells from wheat calli by nutrient modifications // Teor. Appl. Genet. – 1991. – Vol. 82. – P. 413–416.
94. *Steffensen D.M.* Chromosome structure with special reference to the role of metal ions // Int. Rev. Cytol. – 1961. – Vol. 12. – P. 163–197.
95. *Кулаева О.Н., Прокопцева О.С.* Новейшие достижения в изучении механизма действия фитогормонов // Биохимия. – 2004. – Т. 69, № 9. – С. 293–310.
96. *Nagl W., Rucker W.* Effects of phytogormones on thermal denaturation profiles of Cymbidium DNA: indication of differential DNA replication // Nucleic Acids Res. – 1976. – № 3. – P. 2033–2039.
97. *Takeda S., Sugimoto K., Otsuki H., Hirochika H.* A 13-bp cis-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposon Tto1 is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl jasmonate and fungal elicitors // Plant Journal. – 1999. – Vol. 18. – P. 383–393.
98. *Ronchi V.N., Martini G., Buiatti M.* Genotype-hormone interaction in the induction of chromosome aberrations: Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and kinetin on tissue cultures from nicotiana SPP // Mutation Research. – 1976. – Vol. 36. – P. 67–72.
99. *Murata M.* Effects of auxin and cytokinin on induction of sister chromatid exchanges in cultured cells of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. – 1989. – Vol. 78, № 4. – P. 521–524.
100. *Nawrot-Chorabik K.* Somaclonal variation in embryogenic cultures of silver fir (*Abies alba* Mill.) // Plant Biosystems. – 2009. – Vol. 143, Is. 2. – P. 377–385.
101. *Santos M.D.M., Buso G.C.S., Torres A.C.* Evaluation of genetic variability in micropropagated propagules of ornamental pineapple [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens and Leal] using RAPD markers // Genetics and Molecular Research. – 2008 – Vol. 7, № 4. – P. 1097–1105.
102. *LoSchiavo F., Pitto L., Giuliano G., Torti G., Nuti-Ronchi V., Marazziti D., Vergara R., Orselli S., Terzi M.* DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variation as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs // Theor. Appl. Genet. – 1989. – Vol. 77. – P. 325–331.
103. *Arnholdt-Schmitt B., Holzapfel B., Schillinger A., Neumann K.H.* Variable methylation and differential replication of genomic DNA in cultured carrot root explants during growth induction as influenced by hormonal treatments // Theor. Appl. Genet. – 1991. – Vol. 82, № 3. – P. 283–288.
104. *Bucherna N., Szabo E., Heszky L. E.. Nagy I.* DNA methylation and gene expression differences during alternative *in vitro* morphogenetic processes in eggplant (*Solanum melongena* L.) //*In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2001. – Vol. 37, № 5. – P. 672–677.
105. *Venkatachalam L., Sreedhar R.V., Bhagyalakshmi N.* Micropropagation in banana using high levels of cytokinins does not involve any genetic changes as revealed by RAPD and ISSR markers // Plant Growth Regulation. – 2007. – Vol. 51, № 3. – P. 193–205.
106. *May R. A., Sink K. C.* Genotype and auxin influence direct somatic embryogenesis from protoplasts derived from embryogenic cell suspensions of *Asparagus officinalis* L. // Plant Sci. – 1995. – Vol. 108, № 1. – P. 71–84.
107. *Lavia G., Fernandez A., Marquez G.* Chromosome doubling in *Turnera ulmifolia* (*Turneraceae*) induced by regeneration of plants from *in vitro* cultured leaf explants // Plant Systematics and Evolution. – 1994. – Vol. 192, № 1–2. – P. 41–48.
108. *Valente P., Tao W., Verbelen J.-P.* Auxins and cytokinins control DNA endoreduplication and deduplication in single cells of tobacco //Plant Science. – 1998. – Vol. 134, № 2. – P. 207–215.
109. *Karp A., Wu Q.S., Steele S.H., Jones M.G.K.* Chromosome variation in dividing protoplasts and cell suspensions of wheat // Theor. Appl. Genet. – 1987. – Vol. 74. – P. 140–146.
110. *Спиридонова Е.В., Адноф Д.М., Андреев И.О., Кунах В.А.* Динамика изменений генома каллусных тканей раувольфии змеиной при переводе в условия глубинного выращивания // Цитология и генетика. – 2008. – Т. 42, № 2. – С. 35–41.
111. *Бублик Е.Н., Адонин В.И., Кунах В.А.* Цитогенетическая изменчивость клеточных линий *Ungernia victoris* при выращивании на питательных средах различного состава. – Цитология и генетика. – 2008. – № 1. – С. 29–36.

112. *Olhoft, P.M., Phillips R.L.* Genetic and epigenetic instability in tissue culture and regenerated progenies // Plant responses to environmental stresses: from phytohormones to genome reorganization / Ed. Lerner H.R. – New York: Marcel Dekker, 1999. – P. 111–148.
113. *Rani V., Raina S.N.* Genetic analysis of enhanced axillary branching derived *Eucalyptus tereticornis* and *E. camaldulendis* plants // Plant Cell Rep. – 1998. – Vol. 17. – P. 236–242.
114. *Lakshmanan V., Venkataramareddy S.R., Neelwarne B.* Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers // Electronic Journal of Biotechnology. – 2007. – Vol. 10, № 1. – P. 106–113.
115. *Mohanty S., Joshi R.K., Subudhi E., Sahoo S., Nayak S.* Assessment of Genetic Stability of Micropropagated Curcuma caesia through Cytophotometric and Molecular Analysis // Cytologia. – 2010. – Vol. 75, № 1 – P. 73–81.
116. *Pinto D.L.P., de Almeida Barros B., Viccini L.F., de Campos J.M.S., da Silva M.L., Otoni W.C.* Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry // Cell, Tissue Organ Cult. – 2010. – Vol. 103, № 1. – P. 71–79.
117. *Valladares S., Sanchez C., Martinez M.T., Ballester A., Vieitez A.M.* Plant regeneration through somatic embryogenesis from tissues of mature oak trees: true-to-type conformity of plantlets by RAPD analysis // Plant Cell Rep. – 2006. – Vol. 25, № 9. – P. 879–886.
118. *Armstrong C.L., Phillips R.L.* Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable embriogenic tissue cultures of maize // Crop Sci. – 1988. – Vol. 28. – P. 363–369.
119. *Nakano M., Nomizu T., Mizunashi K., Suzuki M., Mori S., Kuwayama S., Hayashi M., Umehara H., Oka E., Kobayashi H., Asano M., Sugawara S., Takagi H., Saito H., Nakata M., Godo T., Hara Y., Amano J.* Somaclonal variation in *Tricyrtis hirta* plants regenerated from 1-year-old embryogenic callus cultures // Scientia Horticulturae. – 2006. – Vol. 110, № 4. – P. 366–371.
120. *Thomas J., Vijayan D., Joshi S. D., Lopez S.J., Kumar R.R.* Genetic integrity of somaclonal variants in tea (*Camellia Sinensis* (L.) o Kuntze) as revealed by inter simple sequence repeats // J. Biotech. – 2006. – Vol. 123, № 2. – P. 149–154.
121. *Marum L., Rocheta M., Maroco J., Oliveira M.M., Miguel C.* Analysis of genetic stability at SSR loci during somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*) // Plant Cell Reports. – 2009. – Vol. 28, № 4. – P. 673–682.
122. *Ngezahayo F., Guo W., Gong L., Li F., Liu B., Dong Y.* Genomic variation in micropropagated *Robinia ambigua* 'idahoensis' revealed by RAPD markers // HortScience. – 2006. – Vol. 41, № 6. – P. 1466–1468.
123. *Shiba T., Mii M.* Visual selection and maintenance of the cell lines with high plant regeneration ability and low ploidy level in *Dianthus acicularis* by monitoring with flow cytometry analysis // Plant Cell Rep. – 2005. – Vol. 24. – P. 572–580.
124. *Дубровная О.В., Тищенко Е.Н.* Геномная изменчивость морфогенного и неморфогенного каллуса кормовой свеклы // Цитология и генетика. – 2003. – № 6. – С.23 – 30.
125. *Makowczynska J., Andrzejewska-Golec E., Sliwinska E.* Nuclear DNA content in different plant materials of *Plantago asiatica* L. cultured *in vitro* // Cell, Tissue Organ Cult. – 2008. – Vol. 94, № 1. – P. 65–71.
126. *Bregitzer Ph., Zhang Sh., Cho M.-J., Lemaux P.G.* Reduced somaclonal variation in barley is associated with culturing highly differentiated, meristematic tissues // Crop Sci. – 2002. – Vol. 42. – P. 1303 – 1308.
127. *Bouman H., De Klerk G.-J.* Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays // Theor. Appl. Genet. – 2001. – Vol. 102. – P. 111–117.
128. *Sanchez M.C., Martinez M.T., Valladares S., Ferro E., Vieitez A.M.* Maturation and germination of oak somatic embryos originated from leaf and stem explants: RAPD markers for genetic analysis of regenerants // J. Plant Physiol. – 2003. – Vol. 160, № 6. – P. 699–707.
129. *Jaligot E., Rival A., Beule T., Dussert S., Verdeil J.-L.* Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis // Plant Cell Rep. – 2000. – Vol. 19. – P. 684–690.
130. *Chakrabarty D., Yu K.W., Paek K.Y.* Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleuterococcus senticosus*) // Plant Sci. – 2003. – Vol. 165. – P. 61–68.
131. *Xu M., Li X., Korban S.S.* DNA-methylation alterations and exchanges during *in vitro* cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.) // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 109. – P. 899–910.
132. *McLean N.L., Nelke M., Nowak J., Wright J.M.* Meiotic Chromosome Pairing, Isozyme Analyses and Ferritin Expression in a Red Clover Mutant Capable of Somatic Embryogenesis // Annals of Botany. – 1999. – Vol. 83. – P. 315–323.
133. *Filipecki M., Wisniewska A., Yin Zh., Malepszy S.* The heritable changes in metabolic profiles of

plants regenerated in different types of *in vitro* culture // Plant Cell, Tissue Organ Cult. – 2005. – Vol. 82. – P. 349–356.

134. *Кузовкова (Ленец) А.А., Фоменко Т.И., Бердичевец Л.Г.* Сопряженность процессов де- и дифференциации клеток *Nicotiana tabacum* с модификацией экспрессии генов пероксидаз // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2009. – Т. 7, № 2. – С. 211–217.

Представлено Дубровною О.В.
Надійшла 4.01.2011

ФАКТОРЫ СОМАКЛОНАЛЬНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

Е.Н. Бублик

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Украина, 03680, г. Киев, ул. Академика Заболотного, д. 150
e-mail: o.m.bublyk@imbg.org.ua

Проанализированы литературные данные относительно факторов, обуславливающих уровень и особенности генетических и епигенетических изменений у растений в культуре *in vitro*. Значительную роль играет, прежде всего, вид растения – часто сомаклональные изменения отображают изменения генома в процессе видообразования. Определенная часть сомаклональних изменений является реализацией мутаций в клетках экспланта, в частности результатом миксоплоидности исходных растений. Дальнейшее накопление геномных изменений происходит в процессе выращивания под влиянием условий культуры *in vitro* и подлежит отбору, селективным фактором которого является приспособленность клеток с определенными генетическими особенностями к условиям культивирования (твердая или жидкая питательная среда) и составу питательной среды, особенно наличию и соотношению в нем регуляторов роста. Значительное влияние на уровень сомаклональної изменчивости оказывает способ регенерации и тип роста культуры тканей (организованный или неорганизованный).

Ключевые слова: культура клеток и тканей растений, сомаклональная изменчивость, продолжительность культивирования *in vitro*, компоненты питательной среды, условия культивирования, тип роста культуры тканей.

FACTORS OF PLANT SOMACLONAL VARIATION

O.M. Bublyk

Institute of molecular biology and genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine
Ukraine, 03680, Kiev, Akad. Zabolotnogo str., 150
e-mail: o.m.bublyk@imbg.org.ua

Literature data on factors that influence the level and peculiarities of genetic and epigenetic changes in plant tissue culture were analyzed. First of all plant species has significant role – frequently somaclonal variation mirrors genome changes during speciation. Some part of somaclonal changes is an implementation of mutations in explant cells; particularly it is the result of maternal plant mixoploidy. Subsequent accumulation of genome changes occurs during culturing process under the influence of *in vitro* conditions and is liable to selection, the selective factor of which is the adaptation of cells with some genetic features to culturing conditions (solid or liquid nutrient medium) and to composition of nutrient medium, especially to the presence and the ratio of growth regulators in it. The mode of regeneration and the type of tissue culture growth (organized or unorganized) exert significant influence on somaclonal variation level.

Key words: plant cell and tissue culture, somaclonal variation, *in vitro* culturing duration, components of nutrient medium, culturing conditions, the type of tissue culture growth.