

УДК 575.22:633.15+581.143.6

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ IN VITRO ТКАНЕЙ КУКУРУЗЫ

И.О. АНДРЕЕВ¹, Е.В. СПИРИДОНОВА¹, Д.Н. МАЙДАНИЮК^{1,2}, В.А. КУНАХ¹

¹Институт молекулярной биологии и генетики Национальной академии наук Украины
03680 Киев, ул. Академика Заболотного, 150
e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

²Луганский национальный аграрный университет
91008 Луганск

По результатам молекулярно-генетического анализа каллюсных тканей инбредных линий кукурузы Black Mexican Sweet Corn C456, ВИР-27, ЧК-218, Р346, а также соматоклональных линий, созданных на основе линии Р346, оценены генетические эффекты культивирования in vitro тканей кукурузы. Установлено, что уже на ранних этапах культивирования происходят перестройки генома, проявляющиеся в полиморфизме продуктов RAPD-ПЦР. При этом часть обнаруженных изменений имела обратимый характер, что позволяет предполагать их взаимосвязь с процессами дедифференцировки клеток при индукции каллюсообразования. Культивирование in vitro может вызывать дестабилизацию генома, отдаленные последствия которой проявляются в повышенной генетической изменчивости потомства растений-регенерантов. В целом исследованные линии кукурузы характеризовались низким уровнем изменчивости в культуре тканей независимо от типа эксплантата.

Ключевые слова: *Zea mays* L., соматоклональная изменчивость, культура тканей, растения-регенеранты.

Кукуруза наряду с рисом и пшеницей является одной из наиболее важных зерновых культур, используемых как для производства продуктов питания, так и в качестве источника кормов для животноводства. В мировом земледелии она занимает первое место по площади посевов и второе (после пшеницы) — по валовому сбору зерна. Прогнозируется, что к 2020 г. мировые потребности в кукурузе вырастут на 50 % — до более 800 млн т в год и превысят потребление риса и пшеницы [19].

В Украине кукуруза является ценной продовольственной культурой. На протяжении многих лет для ее улучшения применяют традиционные методы селекции. Основными целями селекции в настоящее время являются повышение урожайности кукурузы и ее устойчивости к болезням и вредителям, приспособление растений к специфическим почвенно-климатическим условиям, разработка более эффективных методов селекции.

Поскольку эффективность селекции в значительной степени определяется размахом генетического разнообразия исходной выборки сортоформ растений, программы, направленные на получение высокоурожайных сортов с заданными характеристиками, требовали поиска и внедрения новых подходов, обеспечивающих увеличение генетической

гетерогенности селекционного материала. Одним из таких подходов стало применение метода культуры клеток, тканей и органов растений, который послужил основой для ряда биотехнологических разработок, в частности, генетического улучшения растений путем получения соматоклональных вариантов с новыми ценными качествами, биотрансформации, получения новых сортов с использованием созданных *in vitro* гаплоидов, удвоенных гаплоидов и др. [14, 18].

Культивирование в условиях *in vitro* представляет собой достаточно сильное стрессовое воздействие, следствием которого может быть генетическая изменчивость, получившая название соматоклональной [17]. Изучение этого явления, с одной стороны, помимо собственно теоретического представляет также и практический интерес в связи с возможностью использования в селекционной практике, с другой — когда основной целью является микроклональное размножение или получение генетически трансформированных растений, оно очевидно нежелательно и должно быть сведено к минимуму. В любом случае при использовании культуры тканей важно представлять себе частоту соматоклональной изменчивости, а также факторы, которые могут на нее влиять.

В данной работе мы обобщили результаты собственных исследований, проведенных с использованием нескольких инбредных линий кукурузы с целью оценки уровня соматоклональной изменчивости в культуре тканей кукурузы, а также возможных долговременных генетических эффектов культивирования в условиях *in vitro*.

Соматоклональная изменчивость в культуре тканей. В качестве источника эксплантатов для получения каллюсных культур, способных к регенерации, могут быть использованы различные меристематические ткани растения, однако считается, что наибольшей регенерационной способностью обладают каллюсы, происходящие из незрелых зародышей [10]. Нами проведен молекулярно-генетический анализ каллюсных культур кукурузы линии Black Mexican Sweet Corn C456 (в дальнейшем — C456), полученных из незрелых зародышей. Введение в культуру, методики выделения ДНК и RAPD-анализа подробно описаны в [1]. Изучением каллюсных культур возрастом 2, 3, 9 и 15 мес установлено, что основная масса изменений наблюдается уже после 2 мес культивирования. Генетические дистанции по Неи между двухмесячным каллюсом и исходным растением, рассчитанные с использованием программы POPGENE 1.32, для линии C456 составили 0,0079. При дальнейшем выращивании *in vitro* наблюдали постепенное увеличение генетических дистанций культивируемых тканей от растения-донора эксплантатов, которые после 15 мес составили 0,0118.

Оценка уровня соматоклональной изменчивости каллюсных культур, полученных из незрелых зародышей, не дает возможности провести генетический анализ тканей эксплантата и предполагает использование в качестве контроля растений той же линии. В связи с этим возникает необходимость дополнительного молекулярно-генетического анализа внутрелинейной гетерогенности. Мы проанализировали 10 случайно отобранных растений линии C456. Полиморфизм RAPD-спектров подтвердил наличие внутрелинейной гетерогенности. Вместе с тем вариативность по полиморфным в культуре ампликонам не выявлена, вопрос о реальном уровне изменчивости в культуре тканей кукурузы линии C456 остался открытым.

Чтобы исключить возможный вклад внутрилинейной гетерогенности, были исследованы каллюсные ткани, полученные от индивидуальных растений инбредных линий кукурузы С456, Pioneer 346 (P346), ВИР-27 и ЧК-218 [3–5]. В качестве эксплантатов для получения таких культур использовали 1–2-суточные проростки, полученные проращиванием семян *in vitro* на питательной среде Мурасиге и Скуга с половинным содержанием солей. Оставшуюся часть проростка доращивали в течение 14 сут и выделяли из нее ДНК, которую использовали в качестве контроля. Это позволило оценить изменения, индуцированные культивированием *in vitro*, путем непосредственного сравнения ДНК каллюсной культуры и растения-донора ее эксплантата.

Сравнительным изучением двух растений линии С456 и полученных от них каллюсных тканей возрастом 4, 7, 12 мес методом RAPD-анализа с использованием 40 десятинуклеотидных праймеров обнаружено по 2 полиморфных ампликона из 275 учтенных (0,73 %) в каллюсах обоих растений [4]. Генетические дистанции по Неи между каллюсными культурами и исходными растениями составили 0,0073.

При исследовании 6-месячных каллюсных тканей, полученных от восьми индивидуальных растений линии ВИР-27 и семи — линии ЧК-218, с применением 20 RAPD-праймеров из числа использованных для анализа каллюсных культур линии С456 выявлен один полиморфный фрагмент из 164 (0,61 %), который наблюдался в каллюсных тканях трех растений линии ВИР-27 (генетические дистанции по Неи составили 0,0061). Отличия между растениями и 6-месячными каллюсными культурами для ЧК-218 не обнаружены [5].

RAPD-анализом двух растений линии P346 и полученных от них каллюсных культур возрастом 2 и 4 мес с применением 10 RAPD-праймеров выявлен один полиморфный ампликон из 77 (1,29 %) в каллюсной культуре одного из растений [3]. Генетические дистанции между каллюсными культурами и исходными растениями составили от 0 до 0,0131.

Долговременные генетические эффекты культивирования *in vitro*. Помимо изучения непосредственного воздействия индукции каллюсообразования и последующего культивирования в условиях *in vitro* мы провели исследования, которые позволили оценить долговременные эффекты культивирования тканей *in vitro* на геном кукурузы. Материалом для этих исследований послужила инбредная линия кукурузы P346 и созданные на ее основе в Институте физиологии растений и генетики НАН Украины линии УКЧ-5, УКЧ-6, УКЧ-7, УКЧ-8, УКЧ-9, которые по сравнению с исходной P346 являются носителями ценных признаков, обладают повышенным регенерационным потенциалом [8, 9]. Основой для создания этих линий были соматоклональные варианты, процедура получения которых включала индукцию каллюсообразования из незрелых зародышей с последующим отбором из культивируемых тканей, характеризовавшихся спонтанной изменчивостью, клонов с фенотипическими признаками «индукция тотипотентного каллюсообразования» и «регенерационная способность» [9]. В ходе эксперимента, направленного на изучение межлинейных отличий и внутрилинейного полиморфизма кукурузы линии P346 и ее соматоклонов, было проанализировано 9 растений линии P346, по 10 растений линий УКЧ-5, УКЧ-6, УКЧ-8 и УКЧ-9, 8 растений — УКЧ-7. RAPD-анализ проводили с применением 10 произвольных праймеров из числа использованных для других линий кукурузы.

Для всех объектов учтено 89 ампликонов, 68 из которых принадлежали спектрам продуктов амплификации исходной линии Р346, а остальные 21 — обнаруживали только у соматоклональных вариантов. Количество полиморфных ампликонов составило 42 (47,2 % общего числа ампликонов). Более подробно данное исследование описано в работе [2].

В ходе анализа спектров продуктов амплификации индивидуальных растений нами было выделено две группы полиморфных фрагментов. В первую из них вошли ампликоны (в количестве 20, или 22,5 %), характеризующиеся внутрелинейным полиморфизмом. При этом оказалось, что исследованные линии отличаются между собой по уровню генетической гетерогенности, в частности, по количеству растений с полиморфными спектрами и количеству варибельных фрагментов. Наибольшая гетерогенность была обнаружена у растений линий УКЧ-6 и УКЧ-8, наименьшая — у УКЧ-5. В то же время отличий в спектрах отдельных растений исходной инбредной линии Р346 не наблюдали.

Во вторую группу вошли ампликоны (в количестве 22, или 24,7 %), которые характеризовались только межлинейным полиморфизмом и оставались стабильными в пределах выборки растений отдельных линий. Часть ампликонов из этой группы оказалась специфичной для определенных линий, тогда как другие обнаруживались у нескольких из них. Исследованные линии отличались между собой по количеству фрагментов этой группы, а значит, и по генетическим дистанциям по Неи от исходной линии Р346. Наибольшее количество полиморфных ампликонов из этой группы и наибольшие генетические дистанции от Р346 были у линий УКЧ-6 и УКЧ-8 (соответственно 0,1542 и 0,1391), а наименьшие отличия — у УКЧ-5 (0,0131). Линии УКЧ-7 и УКЧ-9 практически не отличались между собой по генетической дистанции от Р346 (0,0671 и 0,0811) и занимали промежуточное положение.

Для исследования генетической стабильности соматоклональных линий проведено изучение каллюсных тканей, полученных в результате их повторного введения в культуру *in vitro* [3]. В качестве эксплантатов в этом эксперименте использовали ткани проростков семян индивидуальных растений. Всего проанализировано 19 растений и полученных от них каллюсных культур, в частности два растения линии Р346; три — линии УКЧ-5; четыре — линии УКЧ-6; пять — линии УКЧ-7; три — линии УКЧ-8 и два — линии УКЧ-9. RAPD-ПЦР проводили с использованием тех же 10 праймеров, которые применяли для молекулярно-генетического анализа соматоклональных линий. Всего учтено 77 фрагментов, 6 из которых (7,7 % общего числа) были полиморфными.

Установлено, что соматоклональные линии отличались по уровню изменчивости в 2-месячной культуре тканей, в частности, по количеству каллюсов, обладавших генетическими отличиями от исходных растений, а также обнаруженных у них полиморфных ампликонов. В каллюсных культурах линий УКЧ-7 и УКЧ-9 полиморфизм не наблюдался вообще. В культуре тканей одного из двух растений линии Р346 обнаружено отсутствие одного ампликона. Сходная по уровню изменчивость выявлена у соматоклональной линии УКЧ-5, в каллюсе одного из растений которой наблюдали дополнительный фрагмент, отсутствовавший в спектрах растения-донора эксплантата. В каллюсных культурах двух из трех растений линии УКЧ-8 обнаружено три полиморфных фрагмента. Наибольшим уровнем полиморфизма в культуре тканей *in vitro* характеризовалась ли-

ния УКЧ-6, в каллюсных тканях всех растений которой было от одного до трех переменных ампликонов.

При анализе тех же каллюсных культур 4-месячного возраста, направленного на изучение влияния длительности культивирования *in vitro* на генетическую изменчивость, не обнаружено большинства отличий (9 из 15 проявлений полиморфизма), наблюдавшихся между растениями-донорами и 2-месячными каллюсами. Отличия от растений сохранились только у одной каллюсной культуры линии Р346, двух — УКЧ-6 и двух — УКЧ-8, а общее количество полиморфных ампликонов снизилось до трех (3,9 % общего числа). Методом блот-гибридизации установлено, что гомологичные полиморфным ампликонам фрагменты есть и в RAPD-спектрах тех объектов, где они не выявлялись окраской бромистым этидием. Это позволяет предположить, что наблюдаемый полиморфизм вероятнее всего обусловлен значительными изменениями количества отдельных ПЦР-продуктов. Причинами таких количественных вариаций могут быть как нуклеотидные замены в участке гибридизации праймера, так и изменение количества амплифицируемой последовательности в составе матричной ДНК.

Обобщение. Первое сообщение об успешной регенерации полноценных растений из культуры тканей кукурузы было сделано в 1975 г. Грином и Филлипсом [12]. С того времени методики получения культивируемых тканей, способных к регенерации растений, а также питательные среды существенно усовершенствованы. Однако, несмотря на более чем 30-летнюю историю исследования культивируемых тканей кукурузы, количество публикаций, посвященных изучению соматической изменчивости этого растения в культуре *in vitro*, весьма немногочисленно. В частности установлено, что в каллюсных культурах и растениях-регенерантах кукурузы наблюдаются изменения нуклеотидной последовательности и количества копий некоторых генов [11]. Данные об изменении характера метилирования ДНК под влиянием культивирования *in vitro* неоднозначны. Так, уровень метилирования мобильных элементов *Mu* оставался неизменным в эмбрионных каллюсных культурах кукурузы линии А188 и полученных из них регенерантах [20]. В то же время в растениях, регенерированных из 7-месячных эмбрионных каллюсных культур, полученных из двух незрелых зародышей, обнаружены значительные вариации уровня метилирования ДНК ряда геномных последовательностей [15]. В работах Осиповой и соавторов, изучавших соматические варианты кукурузы линии А188, полученные из 2- и 8-месячных каллюсных культур с использованием RAPD- и ISSR-анализа, обнаружен высокий уровень генетического полиморфизма [6, 7].

В качестве метода исследования соматической изменчивости нами выбран RAPD-ПЦР. Хотя этот подход предложен еще в 1990 г. [21] и с того времени появились другие более точные и эффективные методы молекулярно-генетического анализа, он по-прежнему находит применение для решения широкого круга задач. Основными достоинствами RAPD-анализа являются его относительная простота, дешевизна и быстрота проведения анализа, а также возможность получения большого количества молекулярных маркеров, случайным образом распределенных в геноме, с использованием небольшого количества матричной ДНК. Кроме того, этот метод не требует проведения предварительного анализа последовательности ДНК исследуемого генома. Показано, что в случае близкородственных или размножающихся клональным путем организ-

мов RAPD-анализ по точности сопоставим с AFLP-ПЦР [16]. К числу основных его недостатков относится то, что RAPD-маркеры подобно AFLP- и ISSR-маркерам являются доминантными, т.е. не позволяют отличать гомозиготу по доминантному аллелю от гетерозиготы. Среди недостатков RAPD-анализа часто упоминается и высокая чувствительность к условиям реакции ПЦР, однако тщательный их контроль обеспечивает хорошую воспроизводимость результатов.

Исследованием каллюсных культур четырех линий кукурузы установлено, что выращивание в условиях *in vitro* приводит к возникновению перестроек генома, проявляющихся в виде полиморфизма продуктов RAPD-ПЦР. Все исследованные линии характеризовались низким уровнем изменчивости: полиморфизм отсутствовал вообще либо заключался в варибельности единичных RAPD-ампликонов. Каллюсные культуры, полученные из незрелых зародышей или тканей проростков кукурузы, характеризовались примерно одинаковым уровнем изменчивости. Отличия от исходного растения наблюдали уже в 2-месячных культивируемых тканях. Дальнейшее выращивание *in vitro* сопровождалось возрастанием количества таких отличий, однако это происходило не во всех случаях.

При изучении соматоклональных линий обнаружены их генетические отличия от исходной инбредной линии Р346, что также указывает на существование изменчивости в культуре тканей *in vitro*. Кроме того, в исследованных соматоклональных линиях наблюдали внутрилинейную гетерогенность. Растения каждой из соматоклональных линий являются прямыми потомками одного растения-регенеранта, полученными путем самоопыления, поэтому одним из источников такой гетерогенности могло стать расщепление признаков в потомстве гетерозиготной особи. Однако растения исходной линии были гомозиготными по изучавшимся локусам, что подтвердили результаты проведенного нами RAPD-анализа. В таком случае гетерозиготность растений-регенерантов свидетельствует о том, что в культуре тканей *in vitro* произошли мутации, которые привели к возникновению разных аллельных форм части геномных локусов. Не исключено также, что под влиянием культивирования *in vitro* произошла дестабилизация генома, отдаленные последствия которой проявились у потомков растения-регенеранта. Однако имеющиеся у нас данные не позволяют сделать однозначного вывода о реализации какого-либо конкретного механизма. Существование другой группы полиморфных фрагментов, не характеризовавшихся внутрилинейной варибельностью, но отличавшей соматоклональные линии от исходного генотипа, свидетельствует о возможности возникновения мутаций в гомозиготной форме или об их отборе при дальнейшем размножении.

В числе особенностей, обнаруженных в результате анализа линии Р346 и полученных от нее соматоклональных линий, следует отметить взаимосвязь между отличиями от исходной линии, уровнем внутрилинейной гетерогенности и соматоклональной изменчивости. Так, наиболее удаленные от Р346 соматоклональные линии имеют наивысший уровень внутрилинейного полиморфизма и изменчивости в культуре *in vitro*, и наоборот, линии с наименьшей генетической дистанцией от Р346 характеризуются наименьшей внутрилинейной генетической гетерогенностью и низким уровнем изменчивости культивируемых тканей. Взаимосвязь между генетической удаленностью от исходной линии и внутрилинейной гетерогенностью можно объяснить тем, что изменения, возникающие в куль-

туре *in vitro*, приводят к переходу генных локусов в гетерозиготное состояние: чем большим изменениям подвергается геном, тем больше локусов становятся гетерозиготными и тем выше гетерогенность среди семенных потомков растения-регенеранта. Вместе с тем культивирование *in vitro* может быть причиной дестабилизации генома, отдаленные последствия которой могут проявляться в повышенной изменчивости растений соматоклональных линий. В пользу такого предположения свидетельствует и повышенная изменчивость растений этих линий в культуре тканей.

Полученные данные показывают, что величина генетических отличий от исходного растения у соматоклональных линий, полученных из растений-регенерантов, может существенно отличаться от таковой у культивируемых тканей. Так, в случае линии Р346 генетические дистанции каллюсных культур от исходного растения варьировали от 0 до 0,0131. Для соматоклональных линий значение этого показателя составляло от 0,0131 до 0,1542. Данные многочисленных цитологических исследований, в том числе и кукурузы, свидетельствуют о том, что культивируемые ткани растений представляют собой гетерогенную клеточную популяцию [13]. RAPD-анализ ДНК культивируемых тканей не дает возможности охарактеризовать всю эту гетерогенность, а выявляет главным образом лишь генетические маркеры, присущие клеткам, представляющим значительную часть популяции. В то же время растения-регенеранты несут в себе генетическую информацию отдельных клеток, которые дали им начало. Поэтому молекулярно-генетический анализ культивируемых тканей позволяет лишь приблизительно прогнозировать генетические изменения в растениях-регенерантах.

Еще одной особенностью обнаруженных в культивируемых тканях генетических изменений является то, что значительная часть ампликонов характеризуется вариабельностью по количеству. Как уже отмечалось, причинами количественного полиморфизма может служить как изменение количества амплифицируемой последовательности в составе матричной ДНК, которое, в свою очередь, может быть обусловлено вариабельностью ее копийности в геномах культивируемых клеток, так и колебания соотношения различных типов клеток в составе клеточной популяции. Для возникновения обнаруженных нами генетических изменений потребовался небольшой интервал времени (1–2 мес), и это позволяет предполагать, что они происходили одновременно в значительной части популяции культивируемых клеток. Такие упорядоченные перестройки генетического материала, на наш взгляд, возможны только в том случае, если они являются запрограммированным ответом клетки на внешнее воздействие, т.е. ассоциированы с определенными изменениями физиологического состояния клетки. В качестве примера таких событий можно назвать процессы дедифференцировки клеток при индукции каллюсообразования и их последующей дифференцировки при воздействии определенными фитогормонами. Таким образом, часть обнаруженных нами в культуре тканей кукурузы изменений может быть отнесена к эпигенетическим. В пользу этого предположения свидетельствует однотипность изменений в каллюсных культурах, полученных от растений одной или даже разных линий, а также наблюдаемая в некоторых случаях их обратимость.

Подводя итоги, можно сделать следующие заключения. Выращивание тканей кукурузы в условиях *in vitro* приводит к возникновению пе-

реструктуризации генома уже на ранних этапах культивирования, проявляющихся в виде полиморфизма продуктов RAPD-ПЦР. Каллюсные ткани четырех исследованных линий кукурузы характеризовались низким уровнем изменчивости. Существенных отличий в уровне изменчивости каллюсных культур, полученных с использованием различных типов эксплантатов, а именно незрелых зародышей и тканей проростков, не наблюдалось. Обнаруживаемый в культивируемых *in vitro* тканях кукурузы генетический полиморфизм может быть реализован в виде более широкого диапазона изменчивости в растениях-регенерантах. Культивирование *in vitro* способно вызывать дестабилизацию генома, отдаленные последствия которой проявляются в повышенной генетической изменчивости потомства растений-регенерантов.

Авторы благодарны за предоставленный семенной материал д-ру биол. наук Т.М. Чеченовой, д-ру биол. наук Е.А. Ларченко (Институт физиологии растений и генетики НАН Украины), канд. с-х. наук И.А. Гурьевой (Институт растениеводства им. В.Я.Юрьева УААН), д-ру биол. наук Н.Е. Кожуховой (Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН и МОН Украины), д-ру Мартину Саксу (Maize Genetics Cooperative Stock Center, USA).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ГНТП Министерства образования и науки Украины в рамках проекта № 03.02.02/0014128.

1. Майданюк Д.Н., Андреев И.О., Спиридонова Е.В. и др. Геномная изменчивость линии кукурузы Black Mexican Sweet Corn C456 в культуре *in vitro*: результаты RAPD-анализа // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2006. — 4, № 1. — С. 58—67.
2. Майданюк Д.М., Андреев И.О., Спиридонова К.В., Кунах В.А. Генетичний поліморфізм соматоклональних ліній кукурудзи, отриманих від лінії P346 // Біополімери і клітина. — 2007. — 23, № 4. — С. 324—331.
3. Майданюк Д.М., Андреев И.О., Спиридонова К.В., Кунах В.А. Геномна мінливість в культурі *in vitro* кукурудзи лінії P346 і отриманих від неї соматоклональних ліній // Там само. — № 5. — С. 416—424.
4. Майданюк Д.М., Андреев И.О., Спиридонова К.В., Кунах В.А. Низька геномна мінливість в культурі *in vitro* лінії кукурудзи Black Mexican Sweet Corn C456 // Доп. НАН України. — 2008. — № 1. — С. 161—164.
5. Майданюк Д.Н., Андреев И.О., Спиридонова Е.В., Кунах В.А. RAPD-фрагмент, вариабельний в культурі тканин кукурузи // Фактори експериментальної еволюції організмів: 36. наук. праць. — 2009. — 7. — С. 231—236.
6. Осипова Е.С., Ковеза О.В., Троицкий А.В. и др. Выявление специфических фрагментов у соматоклонов кукурузы и создание на их основе SCAR-маркеров // Генетика. — 2003. — 39, № 12. — С. 1664—1672.
7. Осипова Е.С., Кокаева З.Г., Троицкий А.В. и др. RAPD-анализ соматоклонов кукурузы // Там же. — 2001. — 37, № 1. — С. 91—96.
8. Чеченева Т.М., Гур'єва І.А. Порівняльне дослідження соматоклональних інбредних ліній кукурудзи за кількісними ознаками // Генетика в Україні на межі тисячоліть. — К.: Логос, 2001. — Т. 1. — С. 586—589.
9. Чеченева Т.М. Спонтанна та індукована мінливість кукурузи *in vitro*: Автореф. ... д-ра біол. наук. — К., 2003. — 41 с.
10. Bajaj Y.P.S. Biotechnology in maize improvement // Biotechnology in Agriculture and Forestry. Maize. — 1994. — 25. — P. 3—23.
11. Brown P.T.H., Göbel E., Lörz H. RFLP analysis of *Zea mays* callus and their regenerated plants // Theor. Appl. Genet. — 1991. — 81. — P. 227—232.
12. Green C.E., Phillips R.L. Plant regeneration from tissue cultures of maize // Crop. Sci. — 1975. — 15. — P. 417—420.
13. Gubar E.K., Kunakh V.A. C-banding in *Zea mays* // Biotechnology in Agriculture and Forestry. Maize. — 1994. — 25. — P. 366—381.
14. Jones T.J. Maize tissue culture and transformation: the first 20 years // Biotechnology in Agriculture and Forestry. Improvement Molecular Genetic Approaches to Maize. — 2009. — 36. — P. 7—27.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

15. *Kaeppler S.M., Phillips R.L.* Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1993. — **90**. — P. 8773–8776.
16. *Kjolner S., Sestad S. M., Taberlet P., Brochmann C.* Amplified fragment length polymorphism versus random amplified polymorphic DNA markers: clonal diversity in *Saxifraga cernua* // *Mol. Ecol.* — 2004. — **13**. — P. 81–86.
17. *Larkin P.J., Scowcroft W.R.* Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // *Theor. Appl. Genet.* — 1981. — **60**. — P. 197–214.
18. *Mohan Jain S.* Tissue culture-derived variation in crop improvement // *Euphytica.* — 2001. — **118**, N 2. — P. 153–166.
19. *Pingali P.L., Pandey S.* Meeting world maize needs: Technology opportunities and priorities for the public sector // *World Maize Facts and Trends. Meeting World Maize needs: Technological Opportunities and Priorities for the Public Sector.* — CIMMYT: Mexico City, 2001. — P. 1–3.
20. *Planckaert F., Walbot V.* Molecular and genetic characterization of Mu transposable elements in *Zea mays*. Behavior in callus culture and regenerated plants // *Genetics.* — 1989. — **123**. — P. 567–578.
21. *Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J. et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucleic Acids Res.* — 1990. — **18**, N 22. — P. 6531–6535.

Получено 28.04.2009

ГЕНЕТИЧНІ ЕФЕКТИ КУЛЬТИВУВАННЯ IN VITRO ТКАНИН КУКУРУДЗИ

I.O. Андреев¹, K.B. Спіридонова¹, D.M. Майданюк^{1,2}, V.A. Кунах¹

¹Інститут молекулярної біології та генетики Національної академії наук України, Київ

²Луганський національний аграрний університет

За результатами молекулярно-генетичного аналізу калюсних тканин інбредних ліній кукурудзи Black Mexican Sweet Corn C456, VIP-27, ЧК-218, P346, а також соматоклональних ліній, створених на основі лінії P346, оцінено генетичні ефекти культивування in vitro тканин кукурудзи. Встановлено, що вже на ранніх етапах культивування відбуваються перебудови геному, що виявляється у поліморфізмі продуктів RAPD-ПЛР. При цьому частина виявлених змін мала оборотний характер, що дає підставу припускати їх взаємозв'язок із процесами дедиференціювання клітин при індукції калюсоутворення. Культивування in vitro може спричинювати дестабілізацію геному, віддалені наслідки якої виявляються в підвищеній генетичній мінливості потомства рослин-регенерантів. Загалом досліджені лінії кукурудзи характеризувалися низьким рівнем мінливості в культурі тканин незалежно від типу експлантата.

GENETIC EFFECTS OF TISSUE CULTURE ON MAIZE

I.O. Andreev¹, K.V. Spiridonova¹, D.M. Maidanyuk^{1,2}, V.A. Kunakh¹

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
150, Acad. Zabolotnogo St. Kyiv, 03680, Ukraine

²Lugansk National Agrarian University,
Lugansk, 91008, Ukraine

Genetic effects of tissue culture on maize were evaluated based on the results of molecular-genetic analysis of callus tissues of the *Zea mays* inbred lines Black Mexican Sweet Corn C456, VIR-27, ChK-218 and P346, as well as somaclonal lines developed on the basis of P346. There was found that genome rearrangements occurred as early as after two months in culture in vitro, as is evidenced by appearance of RAPD-spectra polymorphism. At same time, reversibility of some genome rearrangements implies their association with dedifferentiation processes to be occurred in the course of callus induction. Tissue culture may induce genome instability, which long-lasting consequences may result in enhanced genetic variability of plant regenerants progeny. Thus, the lines under study show a low level of variability in tissue culture regardless of explant types.

Key words: *Zea mays* L., somaclonal variability, tissue culture, plant regenerants.

