

О.В. ДУБРОВНА, А.В. БАВОЛ
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ
E-mail: baval1@rambler.ru

МІНЛИВІСТЬ ГЕНОМУ ПШЕНИЦІ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*



Наведено результати досліджень мінливості геному пшениці, яка виникає за культивування *in vitro* і спостерігається на різних рівнях його організації. Представлено відомості про зміни, які виявляються при дослідженні каріотипу, послідовностей ядерної, хлоропластної та мітохондріальної ДНК клітинних культур і рослин-регенерантів.

© О.В. ДУБРОВНА, А.В. БАВОЛ, 2011

Вступ

Значне місце в селекції пшениці відводиться використанню клітинних технологій, які створюють генетичне розмаїття на рівні соматичних клітин, з наступним скринінгом генотипів, що мають цінні ознаки. Отримані практичні результати з клітинної селекції на стійкість до абіотичних та біотичних стресових чинників [1, 2], соматональної мінливості [3], генетичної інженерії [4] свідчать про можливість використання біотехнологічних підходів для розширення генетичного потенціалу пшениці та поліпшення існуючих генотипів за багатьма ознаками. Ці напрямки застосування потребують більш поглибленого дослідження геномної мінливості та генетичної стабільності клітин, що вирощуються в умовах ізолюваного росту на штучних живильних середовищах.

Однією з характерних особливостей клітинних культур пшениці є високий рівень геномної мінливості, яка виявляється не лише при вивченні каріотипу, а й послідовностей ядерної, хлоропластної та мітохондріальної ДНК [5–8]. У пшениці всі геномні зміни в клітинах, які культивуються в умовах *in vitro*, можна умовно поділити на дві групи. До першої належать зміни, обумовлені генетичною гетерогенністю вихідного експланту, що включають мутації, які виникли при диференціації, та соматичні мутації, накопичені в тканинах рослини під час онтогенезу. Наприклад, в роботі Анрі та ін. [9] зазначено, що більшість анеуплоїдних каріотипів у регенерантах пшениці, отриманих з нетривало культивованих калюсних культур, є наслідком незбалансованих хромосомних чисел у експлантах — незрілих зародках. Іншу групу складають зміни, що безпосередньо виникли *de novo* за культивування *in vitro*. Наприклад, китайськими вченими [10] при дослідженні хромосом клітин калюсів та рослин-регенерантів не тільки було виявлено транслокації, але й показано, що вони виникають саме за культивування *in vitro*.

Вважається, що значна частина геномної мінливості в культурі *in vitro* виникає не випадково, а є наслідком запрограмованих у клітині процесів [11]. На сьогодні встановлено, що мінливість геному в культурі тканин пшениці спостерігається на різних рівнях його організації у вигляді зміни кількості та структури хромосом, ампліфікації й елімінації повторюваних ділянок ДНК, мутацій у кодуючих ді-

лянках ДНК, зміни рівня метилювання цитозинових і аденінових залишків, а також активації мобільних генетичних елементів (МГЕ).

Мінливість числа і структури хромосом

Численними працями показано, що хромосоми культивованих клітин пшениці зазнають значних кількісних і структурних змін. Описано різноманітні порушення каріотипу, такі як втрата однієї або кількох хромосом, транслокації, дуплікації, інверсії та ін. [5, 9, 10, 12–16]. Проте в працях різних авторів наводяться досить суперечливі дані щодо природи, спектра та часу виникнення цих змін. Такі розбіжності можна пояснити тим, що частота мутаційних змін в умовах *in vitro* залежить від багатьох факторів, зокрема складу живильного середовища, природи експланту, морфогенного потенціалу, віку калюсної культури тощо [9, 10, 13, 16, 17].

Значна частина дослідників у своїх роботах вказують на вплив компонентів живильного середовища, зокрема фітогормонів [18,19], на хромосомну мінливість. Карп та ін. [20] зазначають, що в рідкому живильному середовищі хромосомні зміни трапляються частіше, ніж на твердому агаризованому. Генотип та рівень плоідності рослин також мають значний вплив на розмах хромосомної мінливості [21, 22]. Показано, що суспензійні культури пшениці, отримані від рослин різного рівня плоідності (диплоїдні, тетраплоїдні, гексаплоїдні), відрізняються між собою за рівнем хромосомної нестабільності [23].

Крім того, рівень хромосомної мінливості може відрізнитися і у різних типів калюсних культур. Морфогенні калюси, як правило, мають збалансовану кількість хромосом, в той час як неморфогенні характеризуються наявністю поліплоїдних і анеуплоїдних клітин [22].

Відомо, що клітини із зміненим числом наборів хромосом в культурі *in vitro* можуть утворюватися двома шляхами, але в основі своїй нерозривно зв'язаними з поділом клітин. Перший – це активація поділу передіснуючих в тканині експланту клітин з тим чи іншим набором хромосом, другий – поява таких клітин *de novo* в результаті різних змін процесу мітотичного циклу у вигляді блокування або випадіння окремих його стадій, а також в ре-

зультаті порушень роботи мітотичного апарату та структурних перебудов хромосом [11].

Показано, що під час неорганізованого росту в культурі *in vitro* нестабільність регуляції процесів репарації та реплікації ДНК і порушення в мітозі можуть призводити до ендоредуплікації ДНК, що обумовлює зростання ендополіплоїдії [24]. При цьому для культури ізольованих тканин характерною є наявність значної кількості поліплоїдних клітин, а дуже часто і повна поліплоїдизація, що призводить до появи поліплоїдних рослин-регенерантів [10, 13, 16, 25].

Причиною зміни кількості хромосом може бути uszkodження веретена поділу, що веде до нерозходження та відставання хромосом в анафазі. На думку Бабаєвої [26], в клітинах калюсів такі порушення відбуваються через часткове або повне припинення синтезу рРНК у результаті підвищеної конденсації ядерного хроматину. Поліплоїдні клітини можуть утворюватися і в результаті злиття веретен поділу в дво- та багатоядерних клітинах.

Іншою причиною зміни кількості хромосом у клітинах пшениці, культивованих *in vitro*, може бути елімінація частини хромосом або поява додаткових, так званих мініхромосом та *double minute*-хромосом [27, 28]. Так, Вінфільд та ін. [5] встановили, що хромосоми геному В в клітинах калюсів м'якої пшениці еліминувались значно частіше за хромосоми геномів А та D. В них також частіше відмічалися різні структурні перебудови. Поряд із зміною числа хромосом геномів А, В та D можуть з'являтися мініхромосоми – генетичні елементи з автономним способом реплікації, що звичайно мають значно менший розмір порівняно зі стандартними хромосомами каріотипу. Мініхромосоми – лінійні або кільцеві молекули ДНК, що містять нативну кодуючу послідовність, мають власну рамку зчитування; крім того, лінійні мікрохромосоми мають теломерні послідовності на їхніх кінцях. На сьогодні *minute*-хромосоми та *double minute*-хромосоми були ідентифіковані як частинки гранулярного хроматину, що містять 0,17–5,54 пг ДНК. В цих структурах ДНК за розмірами становить від $2,56 \cdot 10^5$ до $1,05 \cdot 10^7$ пар нуклеотидів. Звертає на себе увагу тісний зв'язок між утворенням *minute*-хромосом і амплі-

фікацією ДНК та диференціацією клітин в ембріогенному калюсі пшениці [28]. На цитологічних препаратах вони виявляються як маленькі подвійні тільця, часто асоційовані з певною хромосоною. Походження мініхромосом пшениці поки що не з'ясоване, проте вважається, що їхня поява можлива в результаті циклів мостів і утворення ацентричних фрагментів.

У літературі наводяться дані, які свідчать про те, що структурні зміни хромосом у клітинах культивованих тканин виникають частіше за кількісні зміни [22]. Невипадковість структурних перебудов хромосом пов'язана з особливостями їхньої будови [15]. Аналіз структурних змін хромосом привів до припущення, що локуси, в яких відбуваються хромосомні перебудови, не є випадковими. Лі та Філліпс [16], узагальнюючи літературні та власні дані, роблять висновок, що в геномі існують специфічні сайти хромосомних та хроматидних розривів. Автори також вказують, що такі ділянки пов'язані з певними гетерохроматиновими блоками. Наприклад, велика частина аберацій відбувається в хромосомах, які мають ядерцевий організатор.

Накопичення даних щодо ролі гетерохроматину в розривах хромосом дозволило висунути гіпотезу про пізню реплікацію гетерохроматину в клітинному циклі. Згідно з цією гіпотезою утворення анафазних мостів і наступні розриви хромосом відбуваються за рахунок недореплікації гетерохроматинових ділянок. Можливими причинами пізньої реплікації гетерохроматину вважають збій у клітинному циклі та дисбаланс нуклеотидного обміну, зокрема нестачу аденіну та тиміну (нуклеотиди, які в значній кількості містяться в гетерохроматинових ділянках) [29]. Виявлено припущення, що підвищена частота мітотичної рекомбінації в культурі тканин може призводити до хромосомних перебудов [30, 31].

Специфічні умови культивування тканин *in vitro* спричиняють підвищення частоти виникнення клітин з каріологічними змінами, що призводить до утворення рослин з різними генетичними порушеннями [9–11, 14, 31]. Наприклад, китайські автори [10, 14] зазначають наявність таких структурних перебудов хромосом, як телоцентричні та дицентричні хромосоми, делеції та фрагменти, внаслідок чого у

отриманих регенерантів виявлено значне варіювання числа хромосом у клітинах.

Карп та Меддок [25] провели цитологічні дослідження регенерантів пшениці, отриманих в культурі незрілих зародків, та виявили високу частоту появи анеуплоїдів (близько 30 %). У більшості випадків анеуплоїдія була наслідком втрати або приєднання додатково однієї, рідше двох хромосом. Згідно з даними Кім та ін. [32], які досліджували рівень плоїдності рослин-регенерантів пшениці, отриманих з культури пиляків (всього було проаналізовано 83 зелені рослини та 222 альбіносні), частота виникнення гаплоїдів (3x) становила 43,6 %. На такому ж рівні (43 %) було зафіксовано появу подвійних гаплоїдів (6x). Автори вказують на порівняно низьку частоту виникнення науплоїдів (9x) – 1,3 % та додекаплоїдів (12x) – 1,0 %, а також анеуплоїдів – 11,1 %. Звертає на себе увагу той факт, що у зелених рослин було зафіксовано значно нижчий рівень хромосомної мінливості порівняно з альбіносними. Анеуплоїдія (а саме моносомія й трисомія) також може бути пояснена механізмом нерозходження хромосом, який спричиняє розриви, або бути результатом нецентромерної активності гетерохроматину [33]. Значну хромосомну мінливість спостерігали в регенерантах пшениці, у яких експресується ген *Em* [34].

Перебудови нуклеотидних послідовностей ДНК

Зміни в нуклеотидних послідовностях ДНК можуть бути викликані помилками у роботі ДНК-полімерази, неефективною роботою систем репарації, дезамінуванням метилованого цитозину, пошкодженням ДНК під дією випромінювання або активних форм кисню. Помилки реплікації і репарації призводять як до транзицій, так і до трансверсій, дія випромінювання найчастіше викликає димеризацію тиміну, а дезамінування метилованого цитозину призводить до С–Т-транзицій [33]. Крім того, радикали кисню можуть спричинити активацію транспозонів, заміни нуклеотидів та інгібування метилаз, яке призводить до гіпометилювання [33, 35].

Для виявлення перебудов нуклеотидних послідовностей ДНК пшениці при культивуванні тканин *in vitro* вже тривалий час застосовують методи ПДРФ [36] та ПЛР [37–41], зок-

рема ISSR- та SSR-аналіз [38–41]. Геращенко та ін. [39] показали, що рівень поліморфізму, виявлений за допомогою RAPD-методу в культурі *in vitro* пшениці, невисокий. Попри значні переваги застосування того чи іншого підходу для виявлення перебудов ДНК, досить часто дослідники у своїй роботі поєднують кілька методів молекулярної генетики, що є більш ефективним і дозволяє детальніше досліджувати соматоклональну мінливість. Так, зроблено спроби оцінити ефективність маркерів для аналізу соматоклональної мінливості пшениці на основі ISSR, RFLP та RAPD [41]. Перебудови нуклеотидних послідовностей за культивування *in vitro* спостерігаються як в ядерній ДНК, так і в ДНК клітинних органел.

Перебудови ядерної ДНК. В літературі наводяться дані про те, що перебудови ядерної ДНК пов'язані як із мінливістю повторюваних послідовностей, так і змінами в кодуючих ділянках. Відомо, що повторювані послідовності ДНК не є такими консервативними, як унікальні ділянки, та часто зазнають змін за дії стресових умов, зокрема культивування *in vitro*. Такі дані є і для пшениці [42]. Наприклад, колективом науковців [43] проводились дослідження змін повторюваних послідовностей ДНК *Triticum aestivum* L. лінії ТаКВ1, отриманої з суспензійної культури. За допомогою гібридизації *in situ* була проаналізована гетерохроматинова ділянка рSc119.2, що утворена повторюваними тандемними блоками. Автори показали зменшення розміру хромосом у лінії ТаКВ1 порівняно з вихідною формою за рахунок делеції дистальних сегментів і зменшення кількості копій повторюваних послідовностей ДНК, а також загального числа таких сайтів.

Дані, отримані групою російських дослідників на синтетичних алополіплоїдах *Triticum* [44], свідчать про можливу роль тандемних повторів з субтеломерною локалізацією Spelt1 та Spelt52 у формуванні алополіплоїду та організації його геному на початкових етапах. Показано, що Spelt1 у першому поколінні в більшості варіантів елімінувались, в той же час спостерігалась ампліфікація Spelt52. Аналогічні зміни також можуть проходити в клітинах культивованих тканин.

Зміни в кодуючих ділянках ядерної ДНК, обумовлені перебуванням рослинних тканин в

умовах *in vitro*, найповніше досліджені на прикладі генів рибосомної ДНК (гени 5S, 5.8S, 18S, 25S, 45S – рРНК). Відомо, що такі гени розташовуються в одному чи кількох локусах, а їхнє число в клітині може сягати 500–20 000 копій [45], що і обумовлює зручність роботи з ними. Дослідниками були описані значні якісні та кількісні зміни певних ділянок рРНК та показано, що така мінливість обумовлена саме культивуванням *in vitro*. Також були знайдені значні якісні і кількісні варіації ділянки рДНК. Зміни копійності окремих ПДРФ-фрагментів рДНК у пшениці виявлені Чоудхари та ін. [46]. Автори довели, що ці зміни не є наслідком гетерозиготності використаного рослинного матеріалу, а утворились внаслідок культивування *in vitro*.

У пшениці однією з основних реакцій на алополіплоїдизацію є елімінація ДНК послідовностей, що відбувається після утворення поліплоїду і охоплює значну частину геному, включаючи повторювані послідовності 45S рРНК [47]. Крім того, локалізація таких послідовностей у теломерних ділянках хромосом значною мірою може сприяти їхній втраті чи зменшенню числа копій [48]. Оскільки при культивуванні *in vitro* часто спостерігається спонтанна поліплоїдизація, є всі підстави припускати, що в таких умовах також буде виявлено елімінацію значних ділянок ядерної ДНК.

Перебудови ДНК мітохондрій та хлоропластів. Культивування калюсних тканин призводить до виникнення різноманітних змін і в позаядерній – мітохондріальній та хлоропластній ДНК. У мітохондріальному геномі пшениці описано точкові мутації, делеції, інверсії та дуплікації [8, 49]. Так, Гартмен та ін. [8] не тільки виявили зміни в мтДНК у регенерантів, отриманих з калюсних культур пшениці сорту Chinese Spring, а й довели, що частота їхнього виникнення корелює з тривалістю культивування калюсів. Про значні зміни в мтДНК клітин калюсів пшениці, що культивувались протягом тривалого періоду, повідомляється і у роботі японських дослідників [50]. Показано також, що для клітинних культур, отриманих з різних експлантів, характерні різні зміни в мтДНК [51].

Перебудови мтДНК виникають як у кодуючих, так і некодуючих ділянках. У більшості

випадків мутації мтДНК морфологічно чи фізіологічно не проявляються, однак інколи вдається простежити взаємозв'язок між змінами в мтДНК та регенераційною здатністю калюсних культур [52, 53]. Відома також робота Обрі та ін. [54], результати якої переконливо свідчать про зміни молекулярної організації мітохондріального геному у культурі тканин пиляків пшениці та індукованих альбіносних рослин. Зміни мітохондріального геному описано не тільки у рослин-регенерантів, але й у калюсних культур пшениці [55]. Показано, що перебудови мітохондріального геному успадковуються за материнською лінією [56].

При культивуванні *in vitro* у пластидній ДНК виникають мутації, які часто призводять до появи альбіносних рослин. Поява таких рослин є серйозною проблемою, яка постає при отриманні регенерантів в культурі пиляків. Зазначено [13], що хлоропластна ДНК (хпДНК) безхлорофільних рослин-регенерантів, індукованих з культури пиляків, характеризується численними перебудовами. Авторами було показано, що у хлоропластах однієї і тієї ж рослини існують якісно різні молекули лінійної та кільцевої хпДНК. Слід зазначити, що до появи альбіносних рослин можуть призводити мутації і в ядерних генах. Так, Тавессон та ін. [56] не тільки підтверджують це, а й доводять наявність позитивної кореляції ($r = 0,81$) між генетично обумовленою здатністю до регенерації та індукцією зелених рослин. На прикладі культури пиляків пшениці показано: склад живильного середовища та умови культивування спричиняють мутації в генах, задіяних в синтезі хлорофілу, що врешті призводить до появи безхлорофільних рослин [57].

Активация мобільних генетичних елементів

МГЕ широко представлені в геномі рослин та є важливим компонентом ядерної ДНК. У пшениці за приблизними підрахунками близько 90 % геному представлено повторюваними послідовностями та 68 % – послідовностями, що здатні міняти свою локалізацію. Існує думка, що в культурі *in vitro* клітини, в яких присутні активні МГЕ, генетично більш нестабільні ніж ті, в яких ці ділянки геному не активні [58]. З огляду на літературні дані, на сьогодні не викликає сумніву, що культивування тка-

нин *in vitro*, яке є потужним стресовим чинником [58–60], здатне активізувати мобільні генетичні елементи. Це в свою чергу призводить до виникнення мутацій. МГЕ індукують генетичну мінливість у широкому діапазоні – від структурних перебудов хромосом до незначних змін експресії генів [61, 62]. Однак слід зазначити, що навіть на сучасному етапі досліджень питання ступеня впливу МГЕ на генетичну мінливість до кінця не з'ясовано. Незважаючи на значний вклад у структуру геному цих елементів, їхній вплив на експресію суміжних та віддалених генів також до кінця не вивчений.

Одними з найбільш досліджених МГЕ у рослин, що здатні активізуватися за умов культивування *in vitro* (культури тканин та протопластів), є LTR-вмісні ретротранспозони (підгрупа *Tu1-soria*). Аналіз нуклеотидних послідовностей (секвенування) показав, що значне число ретротранспозонів підгрупи *Tu1-soria* характеризуються змінами в послідовностях та, як наслідок цього, зміщеними рамками зчитування. Це розглядається як можливе пояснення зниження експресії генів, розташованих поряд з МГЕ. За допомогою RT-PCR у геномі пшениці також були знайдені ретротранспозони групи *Tu1-soria*. Дослідження показали, що ця група МГЕ досить гетерогенна. На даний момент виявлено чотири типи таких ретротранспозонів – *TaRT-1–TaRT-4* [63]. Встановлено, що *TaRT-1* представлені в геномі пшениці численними копіями (30000/гексаплоїдний геном), але за нормальних умов з низьким рівнем експресії. Однак в умовах біотичного/абіотичного стресу (дія жасмонової або саліцилової кислоти; присутність збудника борошнистої роси) рівень експресії ділянок *TaRT-1* надзвичайно зростає. Це наштовхнуло авторів на думку про значну роль ретротранспозонів групи *TaRT-1* у формуванні відповіді на дію стресових чинників, за якої відзначається не тільки підвищення рівня транскрипції зазначеної ділянки, а й активація транспозиції, що може призводити до виникнення мутацій або зміни рівня експресії інших генів.

У пшениці також знайдено ретротранспозон *Wis2-1A* [64]. Показано, що він може впливати на транскрипцію певних ділянок ДНК, внаслідок чого змінюється експресія відповідних

генів. Той факт, що ретротранспозони надзвичайно широко представлені в геномі рослин та здатні активізуватися за дії стресового чинника, на думку дослідників, свідчить про їхню потенційну роль як контролюючих елементів геному.

Таким чином, наведені факти свідчать про значну роль МГЕ у виникненні соматоклональної мінливості та очевидний зв'язок цих елементів з імунними системами.

Метилування ДНК

Значна увага при вивченні процесів генетичної нестабільності клітин рослин в культурі *in vitro* приділяється ферментативному метилуванню цитозинових та аденінових залишків як можливого фактору, що приймає участь не лише в епігенетичних змінах активності генів, а й при функціонуванні геному на рівні репарації, рекомбінації та реплікації. Такі припущення ґрунтуються на даних про зміну рівня метилування цитозинових та аденінових залишків в окремих локусах та у геномі в цілому (були досліджені унікальні й повторювані послідовності, ділянки геному, що активно експресуються, та випадкові PstI-послідовності). Злакові були одними з перших об'єктів, у яких показано, що культивування *in vitro* призводить до зміни рівня метилування цитозинових та аденінових залишків ДНК [65]. Перші ж дослідження виявили, що такі зміни зберігаються у рослин-регенерантів та стабільно успадковуються у наступних поколіннях. Однак питання про загальну тенденцію зміни рівня метилування геному в цілому та окремих локусів до цього часу залишається дискусійним. Дослідження інтегрального та локального (окремих локусів) рівня метилування ДНК, індуковане культивуванням *in vitro*, що проводились на різних видах рослин, показало наявність значних змін. Дослідники вказують на те, що за умов культивування *in vitro* рівень метилування геному в цілому підвищується, тоді як для окремих генів, навпаки, знижується [66]. Можливими причинами такої невідповідності може бути посилення метилування повторюваних послідовностей та/або збільшення розміру геному за рахунок ампліфікації генів або активації ретротранспозонів. Підтвердженням цього є численні роботи зі секвенування по-

слідовностей ДНК, які зазнавали змін метилування в культурі *in vitro*. Таким змінам можуть піддаватися, зокрема, відомі структурні гени, мобільні генетичні елементи та послідовності хлоропластної ДНК [67, 68], однак відомі також роботи, у яких дослідники не знайшли відмінностей за рівнем метилування між ДНК, виділеної з калюсів, та ДНК вихідного експланту.

Кеплер та ін. [66] висунули гіпотезу про те, що у рослин зміна метилування ДНК є основою виникнення соматоклональної мінливості, індукуючи активацію транспозонів, «гетерохроматин-залежну ламкість хромосом» і зміни на рівні окремих нуклеотидів. Можливим механізмом виникнення генетичних змін є наступний: фізіологічні зміни, які відбуваються в клітинах за умов *in vitro*, призводять до зниження рівня метилування ДНК певних локусів, що в свою чергу активує мобільні генетичні елементи і викликає генетичні зміни типу дуплікацій, делецій і транслокацій певних ділянок ДНК. Повного експериментального підтвердження цієї гіпотези поки що не отримано, однак доведено тісну кореляцію між рівнем метилування ДНК та активністю мобільних генетичних елементів [68]. Філліпс та ін. [33] на підтвердження цієї гіпотези приводять дані, відповідно до яких зміни в метилуванні ДНК обумовлюють модуляції хроматину, які зрештою призводять до змін на цитологічному рівні, а також замінам азотистих основ через процеси, аналогічні явищу RIP (repeat-induced point mutation) у грибів. Автори вважають, що пізніша реплікація гетерохроматину є одним з механізмів, які призводять до розривів хромосом та утворення хромосомних мостів. Крім того, останні можуть бути результатом порушення контролю клітинного циклу, що перешкоджає клітинному поділу, уповільнюючи реплікацію ДНК. Оскільки збільшення відносної частки гетерохроматинових ділянок може супроводжуватися збільшенням рівня метилування ДНК, висловлюється думка, що хромосомні мости можуть індукуватися змінами ферментативної модифікації цитозину, однак такі гіпотетичні ефекти експериментально не підтверджені.

Сьогодні на молекулярному рівні соматоклональна мінливість вивчена недостатньо. Незважаючи на роботу, що продовжується у цьому

напрямку, ряд аспектів є не до кінця висвітленими, зокрема вплив компонентів живильного середовища та умов культивування на геном рослинної клітини, реорганізації геному, що супроводжують дедиференціювання клітин, та ін. Вивчення генетичних основ соматоклональної мінливості, її причин, механізмів, особливостей та розмаху 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 реакцію рослин на стрес та визначити клітинні механізми, що діють у процесі еволюції. З'ясування особливостей та механізмів генетичної мінливості клітинних культур і пошуки шляхів її регуляції дозволить з більшою ефективністю використовувати біотехнологічні методи для вирішення генетико-селекційних задач у пшениці та матимуть важливе значення не тільки для прикладних цілей, але й для спеціальної генетики цієї культури.

O.V. Dubrovna, A.V. Bavol

VARIABILITY OF WHEAT GENOME IN *IN VITRO* CULTURE

Results of researches of wheat genome variability *in vitro* and survey at various levels of its organization are generalized in the review. Data concerning the changes detected at karyotype level and in nuclear, chloroplast and mitochondrial DNAs of cultured cells and regenerated plant are presented.

O.V. Dubrovna, A.V. Bavol

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОМА ПШЕНИЦЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Приведены результаты исследований изменчивости генома пшеницы, которая возникает в культуре *in vitro* и наблюдается на различных уровнях его организации. Представлены сведения об изменениях, выявляющихся при изучении кариотипа и последовательностей ядерной, хлоропластной и митохондриальной ДНК клеточных культур и растений-регенерантов.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Zair I., Chlyah F., Sabounji K., Titahsen M., Chlyah H. Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of *in vitro* selection pressure // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. — 2003. — 73, № 3. — P. 237–244.
2. Svabova S., Lebeda L. *In Vitro* selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens // J. Phytopathol. — 2005. — 153. — P. 52–64.
3. Franzone P.M., Suarez E.Y., Solari R.M., Favert E.A., Rios R.D., Diaz-Paleo A.H. Somaclonal variation in three Argentinean varieties of *Triticum aestivum* with different karyotype variability // Plant Breed. — 1996. — 115. — P. 89–93.
4. Altpeter F., Vasil V., Srivastava V., Sæger E., Vasil I. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants // Plant Cell Rep. — 1996. — 16. — P. 12–17.
5. Winfield M., Schmitt M., Lorz H., Devery M. Nonrandom chromosome variation and morphogenic potential in cell lines of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Genome. — 1995. — 38. — P. 869–878.
6. Wang L., Yen Y. Molecular basis of somaclonal variation in wheat // Mol. Plant Breed. — 2005. — 3. — P. 857–863.
7. Tuveesson I., Pedersen S., Anderson S. Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. — 1989. — 78. — P. 879–883.
8. Hartmann C., Henry Y., De Buyser J., Aubry C., Rode A. Identification of new mitochondrial genome organization in wheat plants regenerated from somatic tissue culture // Theor. Appl. Genet. — 1989. — 77. — P. 169–175.
9. Henry Y., Marcotte J., De Buyser J. The effect of aneuploidy on karyotype abnormality in wheat plants regenerated from short and long-term somatic embryogenesis // Plant Sci. — 1996. — 114. — P. 101–109.
10. Li S., Zhang Y. Chromosome variations of the calli and regenerated plants in common wheat // Acta Genet. Sin. — 1991. — 18. — P. 332–338.
11. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
12. Li H., Guo J., Li Y., Du L., Jia X., Chu C. Molecular cytogenetic analysis of intergeneric chromosomal translocations between wheat (*Triticum aestivum* L.) and *Dasyphyrum villosum* arising from tissue culture // Genome. — 2000. — 43, № 5. — P. 756–762.
13. Jain S.M., Brar D.S., Ahloowalia B.S. Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. — Kluwer: Acad. Publ., 1998. — 353 p.
14. Li L.H., Dong Y.S. Somaclonal variation in tissue culture of *Triticum aestivum*. *Agropyron desertorum* F₁ hybrid // Plant Breed. — 1994. — 112, № 2. — P. 160–166.
15. Zorinyants S.E., Nosov A.V., Badaeva E.D., Smolenskaya I.N., Badaev N.S. Cytogenetic analysis of a long-term *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhul. cell suspension culture // Plant Breed. — 1995. — 114. — P. 219–225.
16. Lee M., Phillips R. The chromosomal basis of somaclonal variation // Annual Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. — 1988. — 39. — P. 413–437.
17. Hashim Z., Campbell W., Carman J. Normalization of

- the DNA content of telophase cells from wheat calli by nutrient modifications // *Theor. Appl. Genet.* – 1991. – **82**. – P. 413–416.
18. Van Staden J.J., Fennell C.W., Taylor N.J. Plant stress *in vitro* : The role of phytohormones // *Acta Hort.* – 2006. – **1**, № 725. – P. 55–61.
 19. 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. – **78**, № 4. – P. 521–524.
 20. Karp A., Wu Q., Steele S., Jones M. Chromosome variation in dividing protoplasts and cell suspensions of wheat // *Theor. Appl. Genet.* – 1987. – **74**. – P. 140–146.
 21. Henry Y., Nato A., De Buyser J. Genetic fidelity of plants from somatic embryos of cereals // *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement* / Eds S.M. Jain, D.S. Brar, B.S. Ahloowalia. – Kluwer : Acad. Publ., 1998. – P. 65–80.
 22. Gupta P.K. Chromosomal basis of somaclonal variation in plants // *Ibid.* – P. 149–168.
 23. Winfield M., Davey M., Karp A. A comparison of chromosome instability in cell suspensions of diploid, tetraploid and hexaploid wheats // *Heredity.* – 1993. – **70**. – P. 187–194.
 24. Joubes J., Chevalier C. Endoreduplication in higher plants // *Plant Mol Biol.* – 2000. – **43**, № 5/6. – P. 735–745.
 25. Karp A., Maddock S. Chromosome variation in wheat plants regenerated from cultured immature embryos // *Theor. Appl. Genet.* – 1984. – **67**, № 2/3. – P. 249–255.
 26. Бабаева С.А., Петрова Т.Ф., Гапоненко А.К. Полиплоидия и политения в культивируемых *in vitro* клетках злаков // *Генетика.* – 1995. – **31**, № 5. – С. 678–683.
 27. Buchowicz J. Nuclear extrachromosomal DNA of higher plants // *Acta Biochim. Pol.* – 1997. – **44**, № 1. – P. 13–20.
 28. Shang X.M., Wang W.C. DNA amplification, chromatin variation and polytene chromosomes in differentiating cells of common wheat *in vitro* and roots of regenerated plants *in vivo* // *Genome.* – 1991. – **34**. – P. 799–809.
 29. Peschke V.M., Phillips R.L. Genetic implications of somaclonal variation in plants // *Adv. Genet.* – 1992. – **30**. – P. 41–75.
 30. 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.
 31. Viuff D., Greve T., Avery B., Hyttel P., Brockhoff B., Thomsen P. Chromosome aberrations in *in vitro*-produced ovine embryos at days 2–5 post-insemination // *Biol. Rep.* – 2000. – **63**, № 4. – P. 1143–1148.
 32. Kim K.M., Baenziger P.S., Rybczynski J.J., Arumuganathan K. Characterization of ploidy levels of wheat microspore-derived plants using laser flow cytometry // *In Vitro Cell. Develop. Biol. – Plant.* – 2003. – **39**, № 6. – P. 663–668.
 33. Phillips R.L., Kaeppler S.M., Olhoft P. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1994. – **91**. – P. 5222–5226.
 34. Corre F., Henry Y., Rode A., Hartmann C. *Em* gene expression during somatic embryogenesis of monocot *Triticum aestivum* L. // *Plant Sci.* – 1996. – **117**. – P. 139–149.
 35. Finnegan R.J., Genger R.K., Peacock W.J., Dennis E.S. DNA methylation in plants // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1998. – **49**. – P. 223–247.
 36. Chowdhury M., Vasil V., Vasil I. Molecular analysis of plants regenerated from embryogenic cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* – 1994. – **87**, № 7. – P. 821–828.
 37. Brown P., Lange F., Kranz E., Lörz H. Analysis of single protoplasts and regenerated plants of wheat by PCR and RAPD technology // *Mol. and Gen. Genet.* – 1992. – **237**, № 3. – P. 311–317.
 38. Leroy X., Leon K., Hily J., Chaumeil P., Branchard M. Detection of *in vitro* culture-induced instability through inter-simple sequence repeat analysis // *Theor. Appl. Genet.* – 2001. – **102**, № 6/7. – P. 885–891.
 39. Gerashchenkov G., Gorbunova V., Zarianova L., Rozhnova N., Bal V. RAPD-PCR analysis of the variability of spring common wheat cultivar genomes and their androclinal double haploid form // *Genetika.* – 2000. – **36**, № 8. – P. 1081–1087.
 40. Leroy X., Leon K., Branchard M. Plant genomic instability detected by microsatellite primers // *Electron. J. Biotechnol.* – 2000. – **3**. – P. 140–148.
 41. Nagaoka T., Ogihara Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers // *Theor. Appl. Genet.* – 1997. – **94**. – P. 597–602.
 42. Lapitan N.L.V., Sears R.G., Gill B.S. Amplification of repeated DNA sequences in wheat × rye hybrids regenerated from tissue culture // *Theor. Appl. Genet.* – 1991. – **75**. – P. 381–388.
 43. Leitch A., Schwarzacher T., Wang M., Leitch I., Surlan-Momirovich G., Moore G., Heslop-Harrison J. Molecular cytogenetic analysis of repeated sequences in a long term wheat suspension culture // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 1993. – **33**. – P. 287–296.
 44. Salina E.A., Numerova O.M., Ozkan H., Feldman M. Alterations in subtelomeric tandem repeats during early stages of allopolyploidy in wheat // *Genome.* – 2004. – **47**. – P. 860–867.
 45. Куприянова Н.С. Консервативность и изменчивость рибосомной ДНК эукариот // *Молекуляр. биология.* – 2000. – **34**, № 5. – С. 753–765.

46. Chowdhury M.K.U., Vasil I., Vasil I.K. Molecular analysis of plants regenerated from embryogenic cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. – 1991. – **87**. – P. 821–828.
47. Shaked H., Kashkush K., Ozkan H., Feldman M., Levy A. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat // Plant Cell. – 2001. – **13**. – P. 1749–1759.
48. Brasileiro-Vidal A.C., Cuadrado A.S., Brammer S.P., Zanatta A.C.A., Prestes A.M., Moraes-Fernandes M.I.B., Guerra M. Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum* (*Triticeae*, *Poaceae*) using *in situ* hybridization with different DNA sequences // Genet. Mol. Biol. – 2003. – **26**, № 4. – P. 505–510.
49. Morere-Le Paven M.C., De Buyser J., Henry Y., Harmann C., Rode A. Unusual inheritance of the mitochondrial genome organization in the progeny of reciprocal crosses between alloplasmic hexaploid wheat regenerants // Theor. Appl. Genet. – 1994. – **89**. – P. 572–576.
50. Nizeki M., Lu Z. Somaclonal variation as a tool for plant breeding and genetics // Bull. Fac. Agric. & Life Sci. Hirosaki Univ. – 2003. – № 6. – P. 1–17.
51. Morere-Le Paven M. C., De Buyser J., Henry Y., Corre E., Hartmann C., Rode A. Multiple pattern of mtDNA reorganization in plants regenerated from different *in vitro* cultured explants of a single wheat variety // Theor. Appl. Genet. – 1992. – **85**. – P. 9–14.
52. Moieni A., Sarrafi A. Genetic analysis for haploid regeneration responses of hexaploid wheat // Plant Breed. – 1995. – **114**. – P. 247–249.
53. Rode A., Harmann C., De Buyser J., Henry Y. Evidence for a direct relationship between mitochondrial genome organization and regeneration ability in hexaploid wheat somatic tissue culture // Curr. Genet. – 1988. – **14**. – P. 387–394.
54. Aubry C., De Buyser J., Hartmann C., Henry Y., Rode A. Changes in the molecular organization of mitochondrial genome in albino tissue cultures derived from wheat pollen embryos and in plants regenerated from tissue culture // Plant Sci. – 1989. – **65**. – P. 103–110.
55. Morere-Le Paven M.C., De Buyser J., Henry Y., Hartmann C., Rode A. Unusual inheritance of the mitochondrial genome organization in the progeny of reciprocal crosses between alloplasmic hexaploid wheat regenerants // Theor. Appl. Genet. – 1994. – **89**. – P. 572–576.
56. Tuveesson I., Perderson S., Anderson S. Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. – 1989. – **78**. – P. 879–883.
57. Dogramaci-Altuntepe M., Peterson T., Jauhar P. Anther culture-derived regenerants of durum wheat and their cytological characterization // J. Hered. – 2001. – **92**, № 1. – P. 56–64.
58. Gaspar T., Franck T., Bisbis B., Kevers C., Jouve L., Hausman J.F., Dommes J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures // Plant Growth Regul. – 2002. – **37**. – P. 263–285.
59. Cassells A.C., Curry R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers // Plant Cell, Tissue Organ Culture. – 2001. – **64**. – P. 145–157.
60. Grandbastien M.A. Activation of plant retrotransposons under stress conditions // Trends Plant Sci. – 1998. – **3**. – P. 181–187.
61. Martin T., Hellman H., Schmidt R., Willmitzer L., Frommer W.B. Identification of mutants in metabolically regulated gene expression // Plant J. – 1997. – **11**, № 1. – P. 53–62.
62. Tang Y.M., Ma Y.Z., Li L.C., Ye X.G. Identification and characterization of reverse transcriptase domain of transcriptionally active retrotransposons in wheat genomes // J. Integr. Plant Biol. – 2006. – **47**, № 5. – P. 604–612.
63. Todorovska E. Retrotransposons and their role in plant genome evolution // Biotechnol. & Biotechnol. Eq. – 2007. – **3**. – P. 294–305.
64. Kashkush K., Feldman M., Levy A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat // Nature Genet. – 2003. – **33**. – P. 102–106.
65. Brown P.T.H. DNA methylation in plants and its role in tissue culture // Genome. – 1989. – **31**. – P. 717–729.
66. Kaeppler S.M., Kaeppler H.F., Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants // Plant Mol. Biol. – 2000. – **43**. – P. 179–188.
67. Li X., Yu X., Wang N. Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link) // Plant Cell, Tissue Organ Culture. – 2007. – **90**, № 2. – P. 153–168.
68. Slotkin R.K., Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome // Nat. Rev. Genet. – 2007. – **8**, № 4. – P. 272–285.