

Перебудови рослинного геному в культурі клітин *in vitro*

І. О. Андрєєв, К. В. Спірідонова, В. А. Кунах

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

*Підсумовано результати багаторічних досліджень геному рослинних клітин у культурі *in vitro* — одного з напрямків наукової роботи відділу генетики клітинних популяцій ІМБіГ НАН України. Отримані результати свідчать про наявність спільних рис перебудов геному в рослинних клітинах *in vitro* та при еволюції рослин у природі при видоутворенні. Зокрема, геномна гетерогенність клітинних популяцій в культурі *in vitro* на цитологічному рівні визначається особливостями формування геному в процесі еволюції. З іншого боку, виявлено кореляцію між перебудовами окремих послідовностей ДНК в культурі клітин та їхньою міжвидовою варіабельністю в інтактних рослинах. Все це дозволяє припустити існування певних загальних закономірностей, які визначають характер і спрямованість перебудов рослинного геному в культурі клітин *in vitro* та в процесі видоутворення. Використання культури рослинних клітин, зважаючи на значні темпи мутацій у порівнянні з інтактними рослинами, відкриває нові перспективи для вивчення еволюції геному.*

Ще наприкінці XIX століття вчені робили спроби штучно вирощувати окремі частини рослин. Але сплинуло чимало часу, поки було відпрацьовано умови для ізолюваного росту рослинних тканин та окремих клітин *in vitro*. Лише в 30-х роках XX ст. Філіп Уайт у США [1] та Роже Готре у Франції [2] довели можливість необмеженого в часі культивування ізолюваних рослинних тканин на штучних живильних середовищах. Цим дослідникам належить пальма першості в розробці живильних середовищ (класичних), придатних для тривалого культивування (деякі з них використовуються ще й нині), та в отриманні пасивованих культур. Саме з того часу почався стрімкий розвиток нового напрямку в експериментальній біології — культури ізолюваних тканин і клітин рослин.

Подібні дослідження спочатку були спрямовані переважно на розробку оптимального складу живильних середовищ та умов культивування, пошук речовин — регуляторів росту і розвитку. З іншого боку, розвиток методів культури ізолюваних органів, тканин та клітин поступово відкривав нові можливості використання цих об'єктів для фундаментальних досліджень, зокрема, моделювання

процесів, що відбуваються в інтактних рослинах, а також для створення нових біотехнологій. На даний час культуру клітин та тканин рослин вивчають у трьох напрямках: для визначення особливостей розвитку культури як унікального біологічного об'єкта; як модель у фізіології і біохімії рослин та як інструмент для різноманітних біотехнологій.

Історія розвитку досліджень у нашому відділі — відділі генетики клітинних популяцій — здебільшого відбиває особливості розвитку напряму в цілому. Зацікавленість культурою тканин була обумовлена, в першу чергу, новими можливостями, які відкривав цей новий унікальний об'єкт, принципово відмінний від інтактноі рослини. Ізоляція клітин і перенесення в умови *in vitro* призводить до їхнього виходу з-під контролю організму, до складу якого вони входили раніше. Умови і характер живлення клітин також зазнають істотних змін. Ці впливи є стресовими і спричиняють кардинальні перебудови функцій і метаболізму клітин, значне підвищення рівня геномної мінливості. Таким чином, в результаті введення клітин вищих рослин в умови *in vitro* утворюється нова біологічна система. Її особливостями є часткова або повна відсутність контролю організму за ростом і розвитком клітин.

Крім того, певна частина генетичного матеріалу внаслідок зміни умов існування виявляється незалученою і перебудови, які в ній відбуваються, можуть накопичуватися в геномах культивованих клітин, оскільки вони не впливають на їхню життєздатність *in vitro*.

Дослідження особливостей розвитку клітин та тканин в умовах ізолюваного росту на штучних живильних середовищах і стало основним напрямком наукової діяльності відділу. Крім того, продовжувалася активна робота, спрямована на пошук оптимальних умов для введення клітин у культуру *in vitro*, отримання пасивованих калюсних культур та регенерації з них рослин. Поряд з цим у відділі розвивався і біотехнологічний аспект використання культивованих рослинних клітин — проведено досліді із створення на основі калюсних тканин лікарських рослин високопродуктивних штамів — продуцентів цінних біологічних речовин.

Особливості геномної мінливості культивованих клітин на хромосомному рівні вивчали із залученням широкого спектра видів вищих рослин — представників різних родин. Серед об'єктів вивчення були, зокрема, гаплопапус, скереда, тютюн, томат, горох, кукурудза, а також лікарські рослини: раувольфія зміїна, женьшень, родіола розева, мак приквітниковий, рута запашна, угернія Віктора, арнебія барвна та ін. Крім того, на молекулярному рівні досліджували перебудови ДНК у різних клітинних штамів скереда (*Crepis capillaris*) та раувольфії (*Rauwolfia serpentina* та *R. verticillata*). Узагальнення, зроблені на основі отриманих результатів, дозволили виявити головні риси адаптації рослинних тканин та клітин до умов ізолюваного росту *in vitro*.

При введенні рослинних клітин у культуру *in vitro* на перших етапах культивування експланта на штучних живильних середовищах відбувається індукція первинного калюсу, для клітин якого не характерні ознаки диференціації та риси тканинної організації, властиві вихідній тканині. Первинний калюс вирізняється неорганізованим типом росту. Гетерогенність клітин у культурі, яка виявляється в цей час, обумовлена переважно варіабельністю вихідних клітин експланта за гістологічними, генетичними (наприклад, за рівнем плідності) та фізіологічними (фаза клітинного циклу) показниками. Її можна пояснити характером диференціації кожної окремої клітини, а також її взаємодією з довкіллям, включаючи інші клітини та компоненти живильного середовища [3].

У процесі тривалого культивування клітин в умовах *in vitro* формується клонова популяція, у якій роль організмів виконують окремі клітини [4].

Вихідні клітини інтактних багатоклітинних організмів не запрограмовані на виконання цих функцій. Таким чином, культивовані клітини вищих рослин є штучно створеними популяціями, головною особливістю яких є висока гетерогенність та мінливість на анатомогістологічному, цитоморфологічному, цитогенетичному, біохімічному рівнях. Конкретні чинники, механізми, рівень та особливості цієї мінливості досить різноманітні. Геномні реорганізації, які спостерігаються у сформованих (культивованих більше року) клітинних штамів, часто мають переважно каналізований характер, що може свідчити про певну спільність механізмів еволюції геному рослин у природі в процесі видоутворення і в культурі *in vitro* протягом адаптації клітин до умов ізолюваного росту [5].

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 плідності (рис. 1). Якщо ж взяти види роду *Crepis*, то вони відрізняються переважно морфологією хромосом, а поліплоїдія тут зустрічається рідше. Проведений у відділі аналіз каріотипічної мінливості культивованих *in vitro* біля 10 років клітин *C. capillaris* показав, що їхня геномна мінливість — це, перш за все, зміна морфології хромосом. В результаті, завдяки головним чином перманентному існуванню циклу мостів, каріотип переважаючої кількості клітин невідомо змінюється. Однак серед перебудованих каріотипів переважали такі, що нагадували 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. (рис. 2) [5].

Крім того, певний внесок у гетерогенність популяцій культивованих клітин на цитологічному рівні роблять тип і рівень диференціації тканини, використаної в ролі експланта: від особливостей диференціації протягом онтогенезу рослини залежать рівень та спектр геномних перебудов у клітинах вихідного експланта [6, 7].

Дослідження ДНК, виділеної з культури рослинних клітин, дозволили виявити, які саме ділянки геному в першу чергу піддаються перебудовам *in vitro* на молекулярному рівні. Суттєві результати отримано при вивченні ДНК штамів культивованих клітин і інтактних рослин *R. serpentina* та *C. capillaris* [8, 9]. При дослідженні кінетики реасоціації ДНК калюсів і рослини *R. serpentina* виявлено, що в геномах клітинних штамів, культивованих *in vitro* близько 20 років, має місце зміна

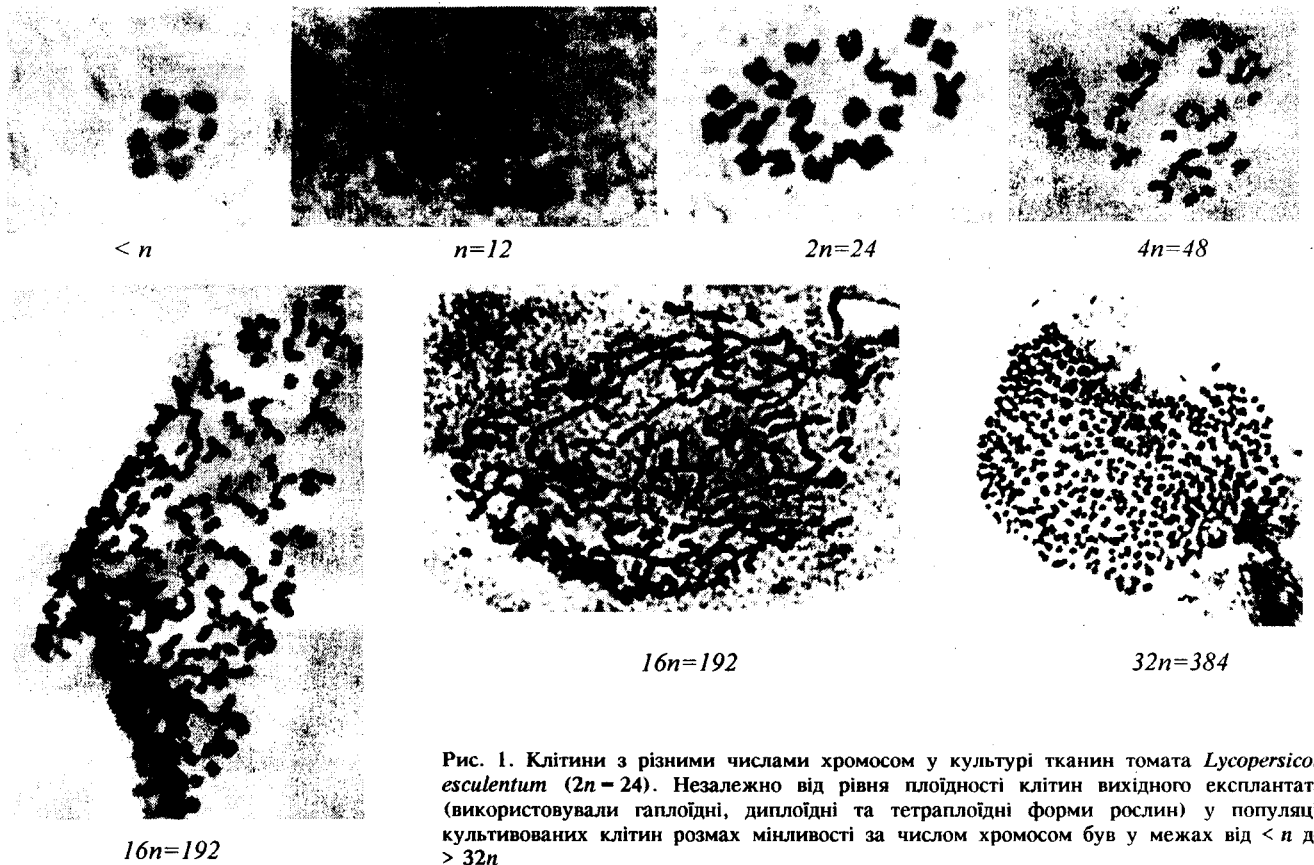


Рис. 1. Клітини з різними числами хромосом у культурі тканин томата *Lycopersicon esculentum* ($2n = 24$). Незалежно від рівня плоідності клітин вихідного експлантата (використовували гаплоїдні, диплоїдні та тетраплоїдні форми рослин) у популяції культивованих клітин розмах мінливості за числом хромосом був у межах від $< n$ до $> 32n$



Рис. 2. Культивовані клітини скереди *Crepis capillaris* з нормальним (а) та перебудованими каріотипами (б—е)

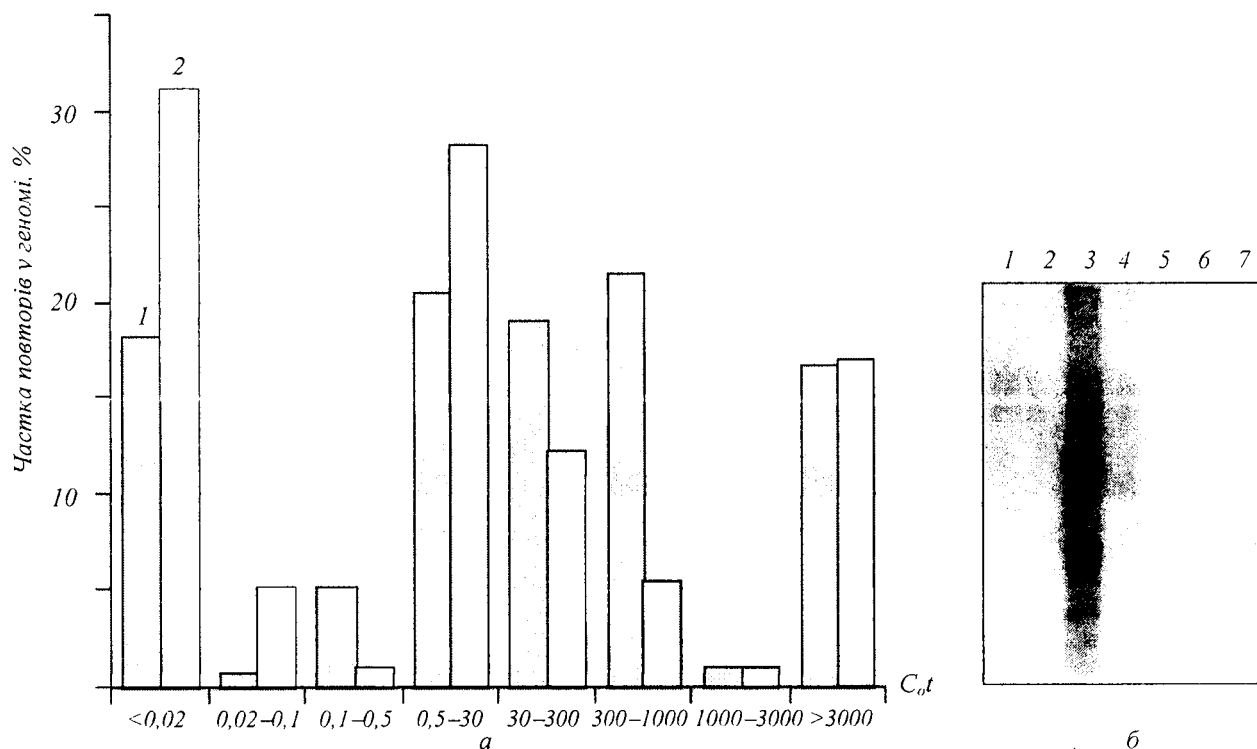


Рис. 3. Зміни різних фракцій повторюваних послідовностей у клітинах *R. serpentina in vitro*: а — розподіл ДНК інтактної рослини та культивованих клітин по фракціях залежно від швидкості реасоціації (C_0t) (1 — інтактна рослина; 2 — культивовані клітини); б — блот-гібридизація ДНК інтактних рослин *R. verticillata* (1); *R. serpentina* (2); *R. caffra* (4); *R. vomitoria* (5); *R. canescens* (6); *R. chinensis* (7) та тривало культивованих клітин *R. serpentina* (3), гідролізованих *HindIII*, з ^{32}P -міченою фракцією ДНК, яка миттєво реасоціює, культивованих *in vitro* близько 20 років клітин *R. serpentina*. Кількість ДНК, нанесеної на доріжку, становить 10 мкг

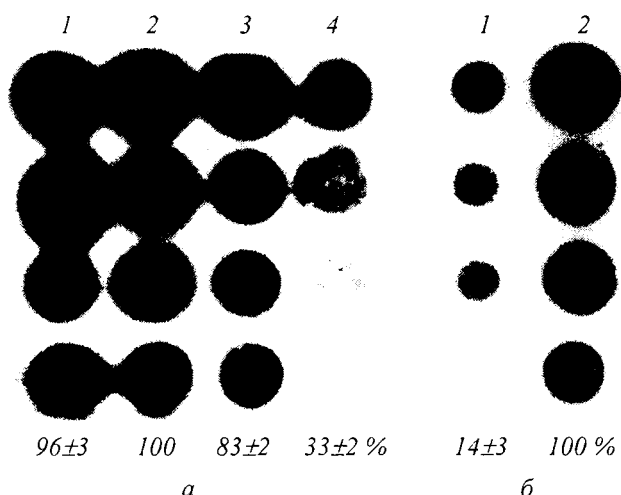


Рис. 4. Перебудови фракції помірних повторів у культивованих клітинах *R. serpentina*: а — дот-гібридизація ДНК інтактних рослин *R. verticillata* (1); *R. serpentina* (2) та культивованих клітин *R. serpentina* (первинний (3) і культивованих понад 20 років (4) калюси) з фракцією ^{32}P -мічених повторів інтактної рослини *R. serpentina*; б — дот-гібридизація ДНК інтактної рослини та культивованих понад 7 років клітин *Crepis capillaris* з фракцією ^{32}P -мічених повторів культивованих клітин *C. capillaris*

копійності окремих фракцій повторюваних послідовностей, зокрема, збільшення частки повторів, які швидко реасоціюють ($C_0t < 0,1$) (рис. 3, а).

Блот-гібридизація фракції повторів, які миттєво реасоціюють ($C_0t < 0,001$), виділених з тривало культивованого штаму клітин *R. serpentina*, з ДНК інтактних рослин різних видів роду *Rauwolfia* виявила суттєві перебудови, які виражаються у появі якісно нових, відмінних від наявних у геномі інтактних рослин, повторюваних послідовностей [8] (рис. 3, б). Отримані дані можна пояснити ампліфікацією в культурі *in vitro* певної частини послідовностей, наявних в інтактній рослині в незначній кількості, хоча не виключаються й інші типи перебудов.

Порівняльний аналіз повторюваних послідовностей (фракція помірних повторів $C_0t < 100$) методом дот-гібридизації у клітинних штамах *R. serpentina*, відмінних за тривалістю культивування *in vitro*, і інтактних рослинах двох видів *R. serpentina* і *R. verticillata* показав зміни у складі цього класу повторів *in vitro* [8, 9]. Ступінь виявлених змін корелював із тривалістю культивування (рис. 4, а). Слід відмітити, що спорідненість між повторами у

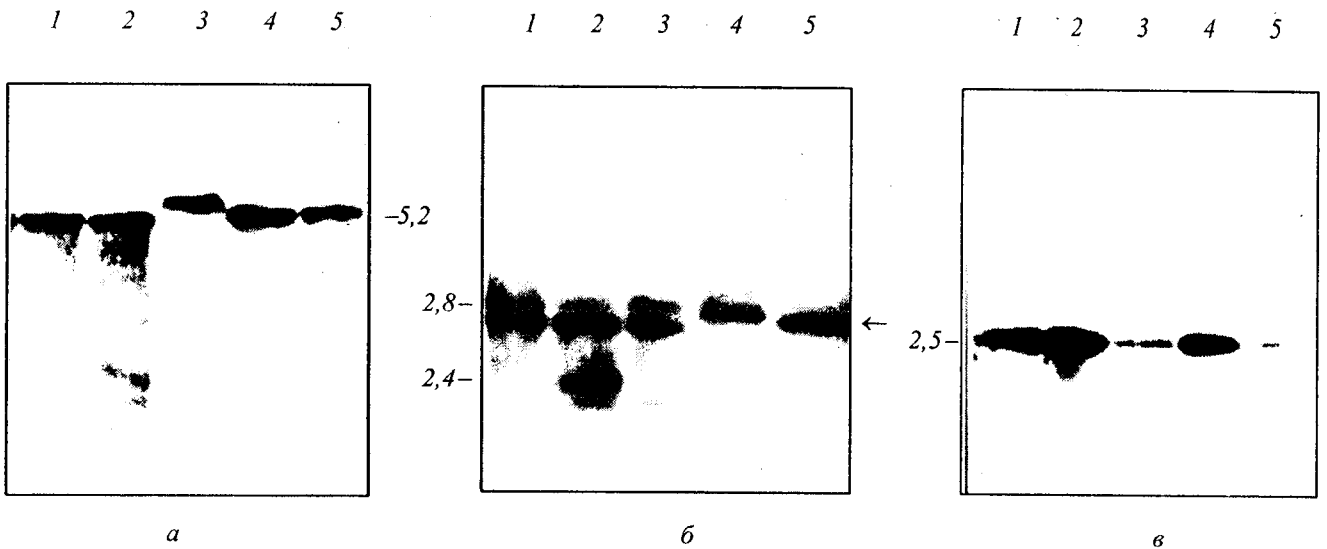


Рис. 5. Перебудови анонімних послідовностей ДНК, виділені з інтактних рослин, у культивованих *in vitro* близько 20 років калюсних клітин: *a*, *б* — блот-гібридизація ДНК інтактних рослин видів роду *Rauwolfia* та культивованих клітин *R. serpentina*, гідролізованих *AluI* рестриктазою, з ^{32}P -міченими «родоспецифічним» (*a*) та «видоспецифічним» (*б*) *AluI* фрагментами з інтактною рослини *R. caffra*; *в* — блот-гібридизація ДНК інтактних рослин видів роду *Rauwolfia* та культивованих клітин *R. serpentina*, гідролізованих *BamHI* рестриктазою, з ^{32}P -міченою анонімною послідовністю з бібліотеки *BamHI* фрагментів геномної ДНК інтактною рослини *R. serpentina* (1 — *R. verticillata*; 2 — *R. serpentina*; 3 — культивовані клітини; 4 — *R. caffra*; 5 — *R. vomitoria*). Стрілками позначено перебудовані фрагменти ДНК

представників двох видів становить 96 % і перевищує таку між калюсами і інтактною рослиною вихідного виду (ступінь гомології повторів тривало культивованих клітин дорівнює 33 %, первинного калюсу — значно вищий і сягає 83 %). Подібні дані було отримано і для культивованих клітин скереди (*C. capillaris* Walr.) [10] (рис. 4, б). Відмінності між рослиною і тривало культованими клітинами за складом фракції помірних повторюваних послідовностей можна порівняти з розбіжностями між віддаленими видами однієї родини (наприклад, між пшеницею і вівсом у злакових, див. [11, 12]).

Поряд з аналізом ДНК інтактних рослин та штамів їхніх культивованих клітин вивчали поліморфізм послідовностей ДНК серед споріднених видів. Дослідження з використанням як зондів для гібридизації клонуваних фрагментів ДНК, виділені з культури клітин та інтактних рослин роду *Rauwolfia*, дозволили виявити деякі особливості перебудов рослинного геному в культурі *in vitro* [13—15].

Оскільки повторювані послідовності ДНК є найваріабельнішою фракцією геному, яка до того ж становить суттєву його частку, об'єктами для дослідження ми обрали рестрикційні фрагменти ДНК, які виразно представлені на електрофоретич-

них профілях, що з великою вірогідністю свідчить про їхню приналежність до повторюваних послідовностей.

На електрофоретичних профілях продуктів гідролізу *AluI* рестриктазою ДНК інтактних рослин різних видів раувольфії та тривало культивованих клітин (штам М) *R. serpentina* виявлено два типи фрагментів. Один з них характеризувався однако-вим розміром (~5,2 тис. п. н.) в інтактних рослинах усіх досліджуваних видів раувольфії і не спостерігався в культивованих клітинах. Він отримав умовну назву «родоспецифічного». Другий, розміром ~3,0 тис. п. н. — виявляв міжвидову варіабельність за довжиною і тому був названий «видоспецифічним». Ці *AluI*-фрагменти, виділені з інтактною рослини *R. caffra*, і використано як зонди для гібридизації. В культивованих клітинах *R. serpentina* спостерігали зміни розміру «родоспецифічного» фрагмента, поряд з тим міжвидового поліморфізму виявлено не було (рис. 5, *a*). «Видоспецифічний» фрагмент виявився варіабельним як у культурі *in vitro*, так і в інтактних рослинах різних видів [15] (рис. 5, *б*).

Інший тип перебудов знайдено при використанні в ролі зонда для блот-гібридизації анонімною послідовності із сконструйованої нами бібліотеки *BamHI* фрагментів геномної ДНК інтактною росли-

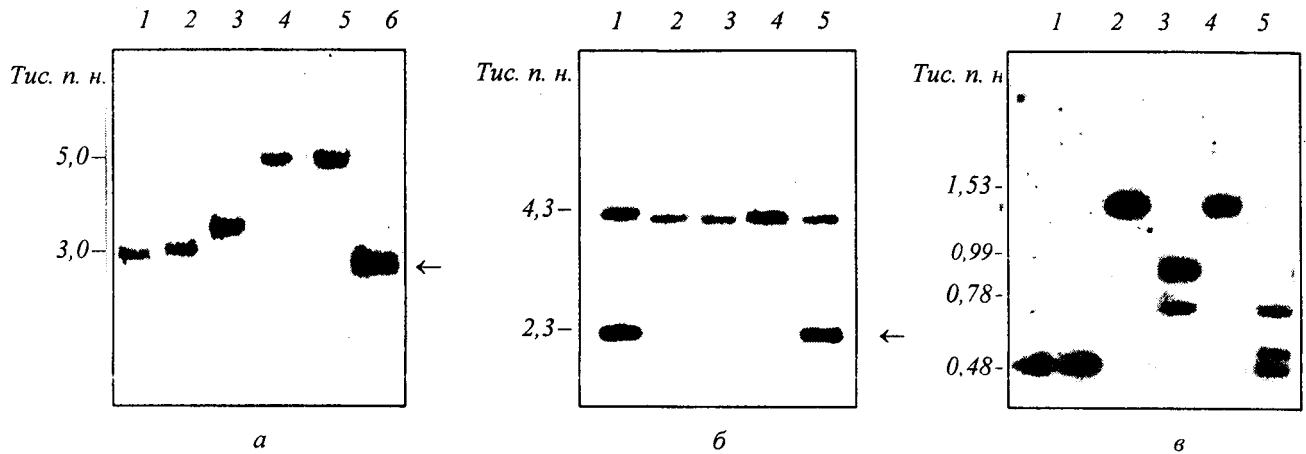


Рис. 6. Невипадковий характер змін анонімної лабільної послідовності, виділеної з культивованих *in vitro* понад 20 років клітин *R. serpentina*. Блот-гібридизація ^{32}P -міченого *EcoRI*-фрагмента культивованих клітин *R. serpentina* з ДНК інтактних рослин роду *Rauwolfia* та тривало культивованих клітин *R. serpentina*, гідролізованих *EcoRI* (а: 1 — *R. canescens*; 2 — *R. vomitoria*; 3 — *R. caffra*; 4 — *R. verticillata*; 5 — *R. serpentina*; 6 — культивовані клітини); *HindIII* (б: 1 — *R. caffra*; 2 — *R. canescens*; 3 — *R. vomitoria*; 4 — *R. serpentina*; 5 — культивовані клітини) та *TaqI* (в: 1 — *R. vomitoria*; 2 — *R. canescens*; 3 — *R. caffra*; 4 — *R. verticillata*; 5 — *R. serpentina*; 6 — культивовані клітини) рестриктазами. Стрілками позначено перебудовані фрагменти ДНК

ни *R. serpentina*. Незважаючи на те, що довжина досліджуваного фрагмента залишається незмінною в усіх вивчених геномах, у культивованих клітинах *R. serpentina* відбувається зменшення копійності цієї послідовності. Поряд з цим вона характеризується міжвидовою варіабельністю за кількістю копій [14, 15] (рис. 5, в).

При аналізі спектрів *EcoRI* фрагментів у ДНК трьох різних штамів клітин *R. serpentina*, культивованих *in vitro* близько 20 років, виявлено мажорний яскраво виражений фрагмент, нехарактерний для інтактних рослин роду *Rauwolfia*. Визначено, що послідовність даного фрагмента ДНК зазнає змін у культурі клітин *R. serpentina*, а також характеризується міжвидовим поліморфізмом довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ) за сайтами впізнавання *EcoRI*, *HindIII* і *TaqI* ендонуклеаз (рис. 6). При цьому не спостерігали відмінностей за даною послідовністю між молодими культурами (тривалість культивування 2—3 місяці) *R. serpentina* і *R. verticillata* та інтактними рослинами відповідних видів [15].

Крім перебудов повторюваних послідовностей, знайдено також зміни в ділянках геному, які містять кодуєчі послідовності (гени). Так, для гена *CoxI* (ген ферменту основного дихального шляху — окисно-відновлювального циклу Кребса) в культурі *in vitro* спостерігали зміни *HindIII* рестрикційних фрагментів, поряд з цим відмічено і міжвидовий поліморфізм [14] (рис. 7, а).

В умовах *in vitro* зареєстровано зменшення копійності послідовностей рДНК та гена малої

субодиниці *Rubisco* (ген темної фази фотосинтезу) [16]. Крім того, виявлено ПДРФ 18S—25S рДНК: окремі ділянки послідовності рДНК є варіабельними у різних видів, а також зазнають змін в культурі *in vitro* *R. serpentina* (рис. 7, б).

Таким чином нами визначено, що культивування рослинних клітин в умовах *in vitro* супроводжується помітними реорганізаціями геному різноманітного характеру, які зачіпають різні його ділянки. На цитологічному рівні клітинні популяції в культурі *in vitro* характеризуються геномною гетерогенністю, зокрема, за плоідністю, кількістю та морфологією хромосом. Характер мінливості культивованих клітин за цитогенетичними показниками, очевидно, обумовлений особливостями формування геному в процесі еволюції. Так, у видів родів *Nicotiana*, *Solanum*, *Lycopersicon*, які виникли шляхом поліплоїдизації, в культурі клітин у більшості випадків спостерігається мінливість числа хромосом, яка має широкий розмах і сягає високих рівнів плоідності. З іншого боку, в культивованих клітинах *C. capillaris* — представника роду, види якого різняться переважно за морфологією хромосом, — геномна мінливість проявляється, перш за все, у вигляді змін морфології хромосом.

На молекулярному рівні перебудови рослинного геному в культурі *in vitro* виявляються як зміни якісного складу різних фракцій повторюваних послідовностей, зміни послідовностей окремих повторів (мова йде про клоновані нами анонімні послідовності), а також деяких генів. Масштабність перебудов зростає із збільшенням тривалості куль-

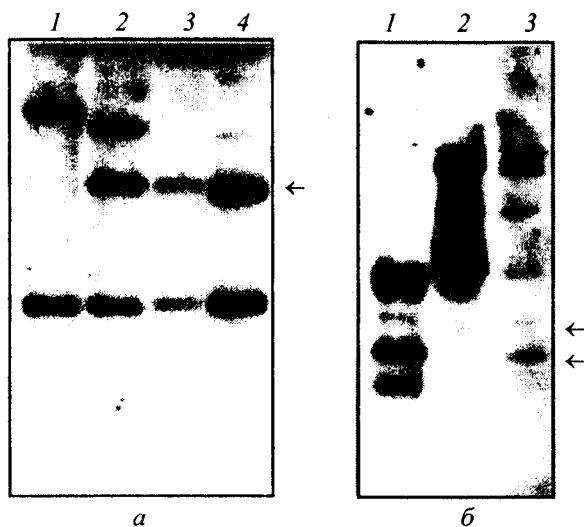


Рис. 7. Особливості змін послідовностей деяких генів в культивованих *in vitro* понад 20 років клітинах *R. serpentina*. Блот-гібридизація ^{32}P -мічених послідовностей генів *CoxI* (а: 1 — *R. serpentina*; 2 — культивовані клітини; 3 — *R. caffra*; 4 — *R. vomitoria*) та 18S—25S рРНК (б: 1 — *R. caffra*; 2 — *R. serpentina*; 3 — культивовані клітини) з ДНК інтактних рослин роду *Rauwolfia* та культивованих клітин *R. serpentina*, гідролізованих *HindIII* (а) та *MspI* (б) рестриктазами. Кількість ДНК, нанесеної на доріжку, становить 10 мкг. Стрілками позначено перебудовані фрагменти ДНК

тивування. В окремих випадках відмінності між каліусною тканиною та інтактною рослиною вихідного виду перевищували такі між різними видами одного роду. Характер згаданих перебудов свідчить про різноманітні механізми, що лежать в їхній основі. Це можуть бути делеції, ампліфікації, мікромутації. Цілком можливо, що частина перебудов пов'язана з активацією в умовах ізолюваного росту мобільних елементів, наявність яких є характерною ознакою будь-якого рослинного геному. Відомо, що стрес індукуює їхню активність [17, 18].

Аналіз отриманих даних дозволив встановити деякі риси геномних перебудов у культурі. Зокрема, було виявлено, що *in vitro* перебудовуються, як правило, ті послідовності, які характеризуються міжвидовим поліморфізмом (наприклад, «видоспецифічний» *AluI* фрагмент). У той же час імовірність перебудов у культивованих клітинах відносно стабільних повторюваних послідовностей, які не мають міжвидового ПДРФ, набагато нижча (наприклад, *VamHI* фрагмент), хоча у випадку «родоспецифічного» *AluI* фрагмента в культурі *in vitro* перебудови за своїм розмахом перевищують міжвидову мінливість. З іншого боку, повторювані послідовності, виявлені завдяки їхнім перебудовам у культурі (*EcoRI* фрагмент), характеризувалися міжвидовим поліморфізмом. Отже, можна припу-

стити, що геном *in vitro* перебудовується не випадковим чином, а саме — змінюються ті варіабельні ділянки, які зазнали змін у процесі видоутворення.

Невипадковість виявлених перебудов проявляється також у подібності за розміром рестрикційних фрагментів перебудованих послідовностей геномів культивованих клітин і інтактних рослин, що належать до різних видів. Наприклад, у випадку «видоспецифічного» *AluI* фрагмента за характером гібридизації (розподілом і довжиною рестрикційних фрагментів) культивовані клітини *R. serpentina* подібні до інтактної рослини *R. verticillata*. При блот-гібридизації послідовності *EcoRI* фрагмента виявилось, що за характером розподілу продуктів *EcoRI* гідролізу культивовані клітини *R. serpentina* подібні до інтактної рослини *R. canescens*, *HindIII* гідролізу — до рослини іншого виду — *R. caffra*, у випадку *TaqI* рестриктази в культивованих клітинах спостерігали низькомолекулярні фрагменти, аналогічні до таких у *R. vomitoria*, *R. canescens*, та більш високомолекулярний, наявний в інтактній рослині *R. caffra*. Невипадковість перебудов характерна і для послідовностей досліджених генів. У культивованих клітинах *R. serpentina* з'являється додатковий фрагмент *CoxI* гена розміром 2,5 тис. п. н., характерний для інтактних рослин *R. caffra* та *R. vomitoria*. При дослідженні генів 18S—25S рРНК у культивованих клітинах були виявлені низькомолекулярні *MspI* фрагменти, подібні за розміром до таких в інтактній рослині іншого виду, *R. caffra*.

Таким чином, отримані результати свідчать про наявність спільних рис перебудов геному в рослинних клітинах *in vitro* та при еволюції рослин у природі при видоутворенні. Зокрема, геномна гетерогенність клітинних популяцій в культурі *in vitro* на цитологічному рівні визначається особливостями формування геному в процесі еволюції. З іншого боку, знайдено певний взаємозв'язок між перебудовами окремих послідовностей ДНК у культурі клітин та їхньою міжвидовою варіабельністю в інтактних рослинах. По-перше, ділянки геному, які зазнали перебудов *in vitro*, характеризуються також міжвидовим поліморфізмом, у той же час існують консервативні ділянки, що не виявляють міжвидової варіабельності і стабільні в культурі клітин. По-друге, виявлено невідповідність у характері перебудов варіабельних ділянок геному: для змінених *in vitro* фрагментів ДНК можна знайти подібні за розміром фрагменти в геномах інтактних рослин іншого виду.

Все це дозволяє припустити існування певних загальних закономірностей, які визначають характер і спрямованість перебудов рослинного геному в

культури клітин *in vitro* та в процесі видоутворення. Отже, досліді з культурою рослинних клітин, зважаючи на значні темпи мутацій в порівнянні з інтактними рослинами, відкривають нові перспективи для вивчення еволюції геному. Це надає нові можливості для використання культивованих клітин рослин у фундаментальних дослідженнях поряд із вже традиційними напрямками застосування їх як моделі для фізіологічних досліджень, а також як інструмента при вирішенні різноманітних біотехнологічних завдань.

I. O. Andreev, K. V. Spiridonova, V. A. Kunakh

Plant genome rearrangements in cell culture *in vitro*

Summary

The paper summarizes the results of long-term investigation *in vitro* on the plant cells genome, which is the focus of research in the Department of Cell Population Genetics of IMBG NASU. The data obtained evidence the common features in the genome rearrangement pattern exhibited by plant cells *in vitro* and during natural speciation. In particular, the genome heterogeneity of cell populations in culture at the cytological level seems to be determined by the peculiarities of genome formation in the course of evolution. On the other hand, the correlation between rearrangements of specific DNA sequences in cell culture and their interspecies variations in intact plants has been found. Altogether the data allow to suggest that there are common principles determining the pattern and trends of the plant genome rearrangements in cell culture *in vitro* and during speciation. Therefore, given considerable mutation rate as against the intact plants, plant cell culture open new vistas for genome evolution research.

И. О. Андреев, Е. В. Спиридонова, В. А. Кунах

Перестройки растительного генома в культуре клеток *in vitro*

Резюме

Подведены итоги многолетних исследований генома растительных клеток *in vitro* — одного из направлений научной работы отдела генетики клеточных популяций ИМБГ НАН Украины. Полученные результаты свидетельствуют о наличии общих черт в перестройках генома растительных клеток *in vitro* и при эволюции растений в природе при видообразовании. В частности, геномная гетерогенность клеточных популяций в культуре *in vitro* на цитологическом уровне обусловлена особенностями формирования генома в процессе эволюции. С другой стороны, обнаружена корреляция между перестройками отдельных последовательностей ДНК в культуре клеток и их межвидовой вариабельностью в интактных растениях. Все это позволяет предположить существование определенных общих закономерностей, определяющих характер и направленность перестроек растительного генома в культуре клеток *in vitro* и в процессе видообразования. Использование культуры растительных клеток, учитывая значительные темпы мутаций по сравнению с интактными растениями, открывает новые перспективы для изучения эволюции генома.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. White P. R. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient // Amer. J. Bot.—1939.—26.—P. 59—64.

2. Gautheret R. J. Sur la possibilite de realiser la culture indefinie des tissus de tubercules de carote // C. r. Acad. Sci.—1939.—208.—P. 218—220.
3. Terzi M., Sung R. S. Somatic cell genetics of plants // Crit. Rev. Biotechnol.—1986.—3, N 4.—P. 303—330.
4. Кунах В. А. Геномна мінливість соматичних клітин рослин. 7. Мінливість популяційно-генетичних параметрів у культурі *in vitro* // Біополімери і клітина.—2002.—18, № 5.—С. 377—393.
5. Кунах В. А. Еволюція геному рослин в культурі клітин *in vitro*. Особливості, причини, механізми, наслідки // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть.—К.: Логос, 2001.—Т. 1.—С. 53—67.
6. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 1. Изменчивость в онтогенезе // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 6.—С. 5—35.
7. Кунах В. А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* // Физиология растений.—1999.—46, № 6.—С. 919—930.
8. Соловьян В. Т., Костенюк И. А., Кунах В. А. Изменения генома культивируемых *in vitro* клеток раувольфии змеиной // Генетика.—1987.—23, № 7.—С. 1200—1207.
9. Соловьян В. Т., Кунах В. А., Вершинин А. В., Шумный В. К. Сравнение степени гомологии и количества повторяющихся последовательностей у интактного растения и культивируемых клеток раувольфии змеиной // ДАН СССР.—1986.—278, № 4.—С. 998—1000.
10. Соловьян В. Т., Попович В. А., Кунах В. А. Переустройство генома культивируемых клеток *Crepis capillaris* L. (Wallr.) // Генетика.—1989.—25, № 6.—С. 1768—1775.
11. Flawell R., O'Dell M., Smith D. Repeated sequence DNA comparisons between *Triticum* and *Aegilops* species // Heredity.—1979.—42.—P. 309—322.
12. Salina E. A., Timofeeva L. L., Vershinin A. V. Interspecies variability in the organization of repeated sequenced of the genus *Hordeum* // Genetica.—1989.—25, N 4.—P. 595—604.
13. Соловьян В. Т., Спиридонова Е. В., Кунах В. А. Геномные перестройки в культивируемых клетках *Raiuwolfia serpentina*. I. Множественный характер геномных изменений // Генетика.—1994.—30, № 2.—С. 250—254.
14. Соловьян В. Т., Спиридонова Е. В., Кунах В. А. Геномные перестройки в культивируемых клетках *Raiuwolfia serpentina*. II. Связь с межвидовой изменчивостью // Генетика.—1994.—30, N 3.—С. 399—403.
15. Соловьян В. Т., Спиридонова Е. В., Кунах В. А. Особенности геномной изменчивости культивируемых клеток *Raiuwolfia serpentina* // Цитология и генетика.—1994.—28, № 5.—С. 21—25.
16. Спиридонова К. В., Андреев И. О., Соловьян В. Т., Кунах В. А. Особливості перебудови деяких генів в культурі клітин *in vitro* раувольфії зміїної *R. serpentina* Benth. // Доповіді НАН України.—2000.—№ 2.—С. 165—170.
17. Bennetzen J. L. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution // Plant Mol. Biol.—2000.—N 42.—P. 251—269.
18. Grandbastien M.-A. Activation of plant retrotransposons under stress conditions // Trends Plant Sci.—1998.—3, N 5.—P. 181—187.

УДК 575.2 + 577.113:576.5
Надійшла до редакції 24.11.03