

## Геномна мінливість у калюсних культурах кукурудзи лінії Р346 і отриманих від неї соматоклональних ліній

Д. М. Майданюк, І. О. Андрєєв, К. В. Спірідінова, В. А. Кунах

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна  
kunakh@imbg.org.ua

---

*Методом RAPD-аналізу досліджено калюсні тканини індивідуальних рослин кукурудзи лінії Р346 і отриманих від неї через культуру тканин in vitro соматоклональних ліній з підвищеною регенераційною здатністю. Геномні зміни в культивованих тканинах спостерігали вже в двомісячних калюсах, але після чотирьох місяців культивування їхній рівень знижувався майже вдвічі. Відмічено появу одностипних змін ДНК в калюсах, отриманих від різних рослин окремих ліній, що свідчить про можливість існування в геномі кукурудзи «гарячих точок» мінливості. Показано, що соматоклональні лінії відрізняються за рівнем генетичної мінливості в культурі in vitro.*

*Ключові слова:* кукурудза, культура тканин рослин, соматоклональні лінії, RAPD-аналіз, геномні перебудови.

---

**Вступ.** Використання культури тканин і клітин *in vitro* як один із напрямків біотехнології знайшло широке розповсюдження у наукових дослідженнях і практичних розробках. Поряд з методами традиційної селекції цей підхід застосовують для прискорення отримання нових генотипів традиційних сільськогосподарських культур із заданими характеристиками. В його основу покладено явище соматоклональної варіабельності, а саме – мінливість рослинних клітин у культурі *in vitro* за фізіологічними, біохімічними та генетичними показниками [1].

Цей феномен використано для одержання нових соматоклональних ліній кукурудзи з підвищеною здатністю до утворення тотипотентного калюсу та регенераційним потенціалом методом спрямованої

селекції калюсів з відповідними характеристиками. Нові лінії кукурудзи УКЧ-5, УКЧ-6, УКЧ-7, УКЧ-8, УКЧ-9 з підвищеною регенераційною здатністю створено в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України (Т. М. Чеченевою) штучним добором з калюсних культур інбредної лінії кукурудзи Р346 для подальшого використання в біотехнологічних розробках [2, 3]. Аналіз, проведений в Інституті рослинництва ім. В. Я. Юр'єва УААН (Харків), виявив генетичні відмінності цих соматоклональних ліній від вихідної інбредної лінії Р346 за різними агрономічними показниками (І. А. Гур'єва, неопубліковані дані).

У попередньому дослідженні нами виявлено молекулярно-генетичні відмінності між інбредною лінією Р346 та її соматоклонами. Показано також, що соматоклональні лінії відрізняються між собою як за

ступенем відмінностей від вихідної лінії Р346, так і за рівнем внутрішньолінійної гетерогенності [4].

У представлений роботі для оцінки біотехнологічного потенціалу створених соматоклональних ліній досліджено їхню генетичну стабільність у культурі *in vitro* із застосуванням методу ПЛР з довільними праймерами (RAPD-аналіз),

**Матеріали і методи.** В експериментах використано насіння інбредних ліній кукурудзи Р346, УКЧ-5, УКЧ-6, УКЧ-7, УКЧ-8, УКЧ-9, отримане з Національного центру генетичних ресурсів рослин України (НЦГРРУ) при Інституті рослинництва ім. В. Я. Юр'єва (Харків). Зазначені лінії зареєстровано в НЦГРРУ відповідно за такими номерами: UB0102873, UB0103498, UB0103499, UB0103500, UB0103501, UB0103359.

Насіння стерилізували 70 %-м розчином етилового спирту протягом 2 хв, потім 20 %-м розчином «Domestos» упродовж 20 хв. Далі шість разів промивали стерильною дистильованою водою і прощували на агаризованому середовищі з половиною вмістом солей за Мурасіге і Скугом [5]. Калюсні культури отримували від окремих рослин, кожній з яких присвоювали індивідуальний номер. Як експланти використано 1–2-денні проростки довжиною 2–5 мм (рослини ліній УКЧ-5 № 2, 3, 14; УКЧ-6 № 4, 7, 8; УКЧ-7 № 13; УКЧ-8 № 6, 9; УКЧ-9 № 4) або повітряні корінці на 14-й день після проростання (рослини ліній УКЧ-6 № 12; УКЧ-7 № 4, 8, 9, 19; УКЧ-8 № 21; УКЧ-9 № 16). Для індукції калюсогенезу експланти поміщали на живильне середовище такого складу: солі за Мурасіге і Скугом [5], 7,7 мг/л гліцину, 1,25 мг/л нікотинаміду, 0,25 мг/л тіаміну, 0,25 мг/л піридоксину, 0,25 мг/л пантотенату кальцію, 2 мг/л 2,4-Д, 30 г/л сахарози, 100 мг/л мезоінозиту, 1 г/л аспарагіну, 8 г/л агару, величина рН до автоклавування становила 5,7. Отримані калюсні тканини переносили на свіже середовище через кожні 30 діб і вирощували в темряві за температури 25 °С.

ДНК виділяли за методикою [6] з індивідуальних проростків віком 14 діб (для цього використовували ті ж рослини, що були донорами експлантів для одержання калюсних культур), а також з калюсних тканин після дво- і чотиримісячного культивування в умовах *in vitro*.

Концентрацію препаратів оцінювали візуально за інтенсивністю флуоресценції комплексів бромистого етидію з ДНК в ультрафіолетових променях після електрофорезу в 1,5 %-му агарозному гелі відносно контролю з відомою концентрацією (ДНК бактеріофага ).

*RAPD.* Реакційна суміш для ПЛР об'ємом 20 мкл містила 1 ПЛР-буфер, 2 мМ MgCl<sub>2</sub> («Медбіо-сервіс», Україна), dNTP у концентрації 0,2 мМ кожний, 1 од. *Taq*-полімерази («Амплісенс», Росія), 0,25 мкМ праймер («Літех», Росія), 20 нг ДНК. На реакційну суміш нашаровували 20 мкл мінеральної олії. Для проведення ПЛР використано таку програму: денатурація (94 °С/2 хв); п'ять циклів – денатурація (94 °С/30 с), ренатурація (38 °С/30 с), елонгація (72 °С/1 хв); 35 циклів – денатурація (94 °С/20 с), ренатурація (38 °С/20 с), елонгація (72 °С/40 с); елонгація (72 °С/2,5 хв). Продукти реакції розділяли у 2 %-му агарозному гелі з бромистим етидієм у 1 ТВЕ-буфері при напрузі електричного поля 2 В/см. Реакцію з кожним праймером повторювали двічі.

ДНК гідролізували ферментами рестрикції за умов, рекомендованих фірмою-виробником («Fermentas», Литва), протягом 3 год. Реакційна суміш об'ємом 30 мкл містила 10 мкг досліджуваної ДНК і 20 од. рестриктази. Гідролізовану ДНК розділяли в 1 %-му агарозному гелі в 1 ТАЕ-буфері при напрузі електричного поля 2 В/см.

Блотинг за Саузерном проводили методом капілярного переносу за [7]. Зондами слугували поліморфні амплікони, виділені з агарозного гелю адсорбцією на силікагелі за допомогою набору «DNA extraction kit» («Fermentas»). ДНК мітили [ <sup>32</sup>P]-dCTP («GE Healthcare», Велика Британія) методом розсіяної затравки, гібридизацію здійснювали у стандартних умовах за [7].

Результати обробки електрофореграм RAPD-продуктів представлено у вигляді матриці бінарних ознак, де наявність чи відсутність амплікона позначено відповідно 1 або 0. Поліморфізм спектрів ампліконів оцінювали методом парного незваженого кластерування з арифметичним усередненням (UPGMA), використовуючи програму POPGENE 1.31 [8]. Дендрограму генетичних відстаней за Неем [9] між проаналізовани-

*Характеристика праймерів і поліморфних ампліконів, знайдених у геномах калюсних тканин лінії Р346 та отриманих від неї соматоклональних ліній*

Назва праймера	Послідовність нуклеотидів (5'-3')	Кількість ампліконів		Розмір амплікона, п. н.	Лінії кукурудзи і номери рослин, у калюсних тканинах яких виявлено поліморфні амплікони								
		Загальна*	Поліморфних		Р346 (n = 2)	УКЧ-5 (n = 3)	УКЧ-6 (n = 4)				УКЧ-8 (n = 3)		
					21	14	4	7	8	12	6	9	
A-01	CAGGCCCTTC	6											
A-12	ATCGCACACT	8											
Ag-01	AGGTCACTGA	11											
АН-30	TGGTCACTGT	4											
B-01	GTTTCGCTCC	4											
M-06	CTGGGCAACT	7	1	1600	-			(+)	+	+			
M-07	CCGTGACTCA	16	4	600				(+)					
				680				(+)					
				770								+	+
				800								(-)	(-)
OPA-02	TGCCGAGCTG	9											
OPA-04	AGTCAGCCAC	9	1	800		(+)	(+)		(+)			+	(+)
340	GAGAGGCACC	3											
Загалом		77	6		1	1	4				3		

Примітка. \*Вказано загальну кількість ампліконів, утворених при використанні даного праймера, для всіх досліджених об'єктів; n – кількість проаналізованих індивідуальних рослин; «+» або «-» – наявність або відсутність амплікона відповідного розміру, (+) – поліморфні ПЛР-фрагменти, які виявлено лише у двомісячних калюсних культурах.

ми об'єктами побудовано з використанням програми MEGA 3.1 [10].

**Результати і обговорення.** Для вивчення генетичної стабільності *in vitro* соматоклональних ліній кукурудзи, а також вихідної інбредної лінії Р346 проводили порівняльний аналіз індивідуальних рослин цих ліній і отриманих з них двомісячних калюсних тканин. Всього проаналізовано ДНК 19 рослин і їхніх калюсних тканин, зокрема, лінії Р346 (кількість індивідуальних рослин n = 2); УКЧ-5 (n = 3); УКЧ-6 (n = 4); УКЧ-7 (n = 5); УКЧ-8 (n = 3); УКЧ-9 (n = 2). Генетичний аналіз здійснювали за допомогою методу ПЛР з довільними 10-нуклеотидними праймерами – RAPD-ПЛР [11]. Для аналізу відбирали праймери, які раніше успішно за-

стосовували в дослідженні генетичного поліморфізму кукурудзи [12, 13]. Використано 10 праймерів. Обрані праймери забезпечували утворення чітких продуктів ампліфікації (ампліконів), кількість яких варіювала від двох до 12 залежно від праймера. Характеристики праймерів та їхніх продуктів наведено в таблиці. Всього враховано 77 ампліконів, шість із яких (7,7 % від загальної кількості) виявили відмінності культивованих тканин від рослин – донорів експланта (таблиця). Поліморфні амплікони спостерігали в спектрах лише трьох з 10 використаних праймерів, а саме – М-07 (чотири амплікони), М-06 і ОРА-04 (по одному амплікону). Поліморфізм RAPD-спектрів проявлявся як відмінності у наявності окремих фраг-

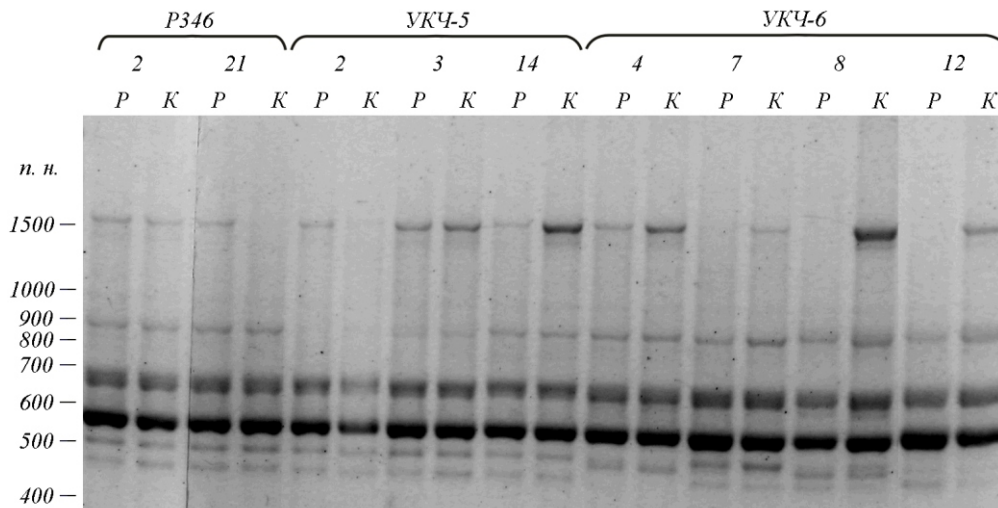


Рис. 1. Спектри продуктів ампліфікації ДНК інтактних рослин (P) і двомісячних калюсних тканин (K) інбредних ліній кукурудзи з праймером М-06. Цифрами позначено номери рослин. Стрілка вказує на поліморфний фрагмент, що відрізняє калюсні тканини від рослини – донора експланта

ментів, а також у варіаціях інтенсивності деяких гомологічних фрагментів (у більшості випадків). При порівнянні спектрів кількісні варіації враховували як «наявність–відсутність фрагмента» лише за умови значних відмінностей (3–4 рази) в інтенсивності флуоресценції ампліконів. Спектри RAPD-фрагментів інтактних рослин і двомісячних калюсів ліній Р346, УКЧ-5 і УКЧ-6, отриманих з використанням праймера М-06, які демонструють генетичні відмінності культивованих тканин від рослин – донорів експлантів, наведено на рис. 1.

За допомогою RAPD-аналізу визначено наявність мінливості геному, індукованої культивуванням *in vitro*, як у соматоклональних лініях кукурудзи, так і у вихідної лінії Р346. Соматоклональні лінії кукурудзи відрізнялися за ступенем мінливості в культурі тканин віком два місяці, а саме – за кількістю калюсів індивідуальних рослин, у яких знайдено поліморфні амплікони, а також за кількістю поліморфних ампліконів у спектрах калюсних тканин рослин однієї лінії (таблиця). Так, у калюсах ліній УКЧ-7 та УКЧ-9 поліморфізму ПЛР-фрагментів не спостерігали взагалі. У лінії Р346 лише в калюсі однієї з двох рослин виявлено відсутність одного амплікона. Подібну за рівнем мінливості відмічено для соматоклональної лінії УКЧ-5, де в калюсі однієї з трьох рослин знайдено додатковий фрагмент, відсутній у спектрі донора експланта. В калюсних культурах двох із трьох рослин соматоклональної лінії УКЧ-8 виявлено три поліморфних фрагменти. Найбільший ступінь

поліморфізму властивий лінії УКЧ-6: варіабельні амплікони в кількості від одного до трьох спостерігали у двомісячних калюсах усіх чотирьох досліджених рослин.

Деякі з поліморфних ампліконів були присутніми одночасно в калюсних тканинах рослин різних ліній (таблиця). Наприклад, амплікований з праймером ОРА-04 поліморфний фрагмент довжиною ~800 п. н., відсутній у рослин-донорів, виявлено в двомісячних калюсах кількох рослин ліній УКЧ-5, УКЧ-6 та УКЧ-8. За фрагментом розміром близько 1600 п. н. (праймер М-06) знайдено відмінності між калюсами і рослинами ліній Р346 та УКЧ-6. Однак у спектрі калюсних тканин лінії Р346 цей фрагмент зникав, а в спектрах культивованих тканин трьох рослин УКЧ-6, навпаки, – з'являвся. Варто зазначити, що лінія УКЧ-6 є соматоклональним варіантом лінії Р346, отриманим добором з культури *in vitro*. У геномі лінії УКЧ-6 цей амплікон був втрачений (див. попередню публікацію [4]). Тут ми знову спостерігаємо його втрату в калюсі однієї з рослин лінії Р346. З іншого боку, в калюсах кількох рослин лінії УКЧ-6 відбулося його відновлення. Така невідповідність мінливості поліморфних RAPD-фрагментів дозволяє припустити існування певних механізмів, які обумовлюють зміни нестабільних ділянок геному, виявлених за допомогою зазначених ампліконів у культурі тканин *in vitro*.

Для вивчення впливу тривалості культивування на генетичну мінливість досліджуваних ліній куку-

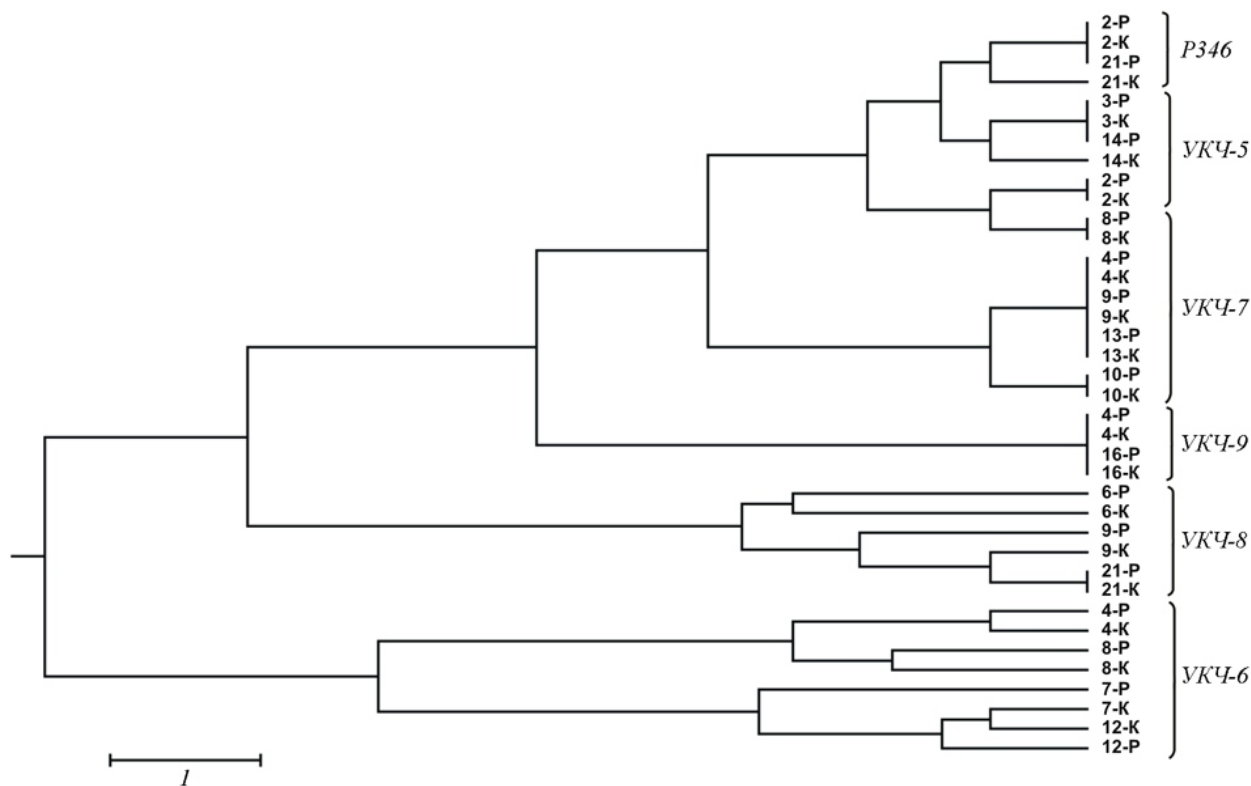


Рис. 2. Дендрограма, побудована методом UPGMA на основі генетичних відстаней за Неєм [9] між інтактними рослинами (P) і двомісячними калюсами (K) досліджених ліній кукурудзи

рудзи в культурі тканин *in vitro* повторно проаналізовано отримані калюсні культури після чотирьох місяців вирощування. Аналіз показав, що в більшості випадків (9 з 15 проявів поліморфізму) відмінності, знайдені між рослинами-донорами та їхніми двомісячними калюсами, зникли за подальшого культивування. Такі «нестабільні» поліморфні фрагменти у таблиці взято в дужки. Після чотирьох місяців вирощування відмінності рослина-калюс зберігалися в однієї рослини лінії P346, двох рослин УКЧ-6 та двох рослин УКЧ-8, а кількість поліморфних ампліконів знизилася до трьох (3,9 %).

На основі результатів проведеного RAPD-аналізу розраховано генетичні відстані за Неєм [9] і побудовано дендрограму відношень між досліджуваними об'єктами. За допомогою програми POPGENE 1.31 [8] об'єкти на дендрограмі згруповано в окремі для кожної лінії кластери (рис. 2). Винятком є інтактні рослини і калюсні тканини лінії УКЧ-5 № 2 і УКЧ-7 № 8, які утворили окремий

субкластер, ближчий до кластера лінії УКЧ-5. Загалом, найближчою до вихідної лінії P346 виявилася лінія УКЧ-5, далі йдуть УКЧ-7, УКЧ-9, найвіддаленіші – УКЧ-8 і УКЧ-6. Слід зазначити, що за рівнем відмінностей між культивованими тканинами і рослинами-донорами соматоклональні лінії розташовані приблизно в такій самій послідовності. У культурі тканин рослин ліній УКЧ-7 та УКЧ-9 перебудов не виявлено взагалі; у лінії УКЧ-5 знайдено один поліморфний фрагмент у калюсі однієї рослини з трьох досліджених. Найвищий рівень поліморфізму у двомісячних культурах тканин властивий рослинам ліній УКЧ-6 і УКЧ-8. Незважаючи на те, що калюсні тканини отримано з різних типів експлантів (проростки і повітряні корінці), залежності між типом експланта і мінливістю в культурі *in vitro* не встановлено.

Окремі поліморфні амплікони, а саме – RAPD-фрагменти розміром ~1600 п. н. (отриманий з праймером M-06) та ~800 п. н. (праймер OPA-04), варіабельність яких спостерігали в калюсних тка-



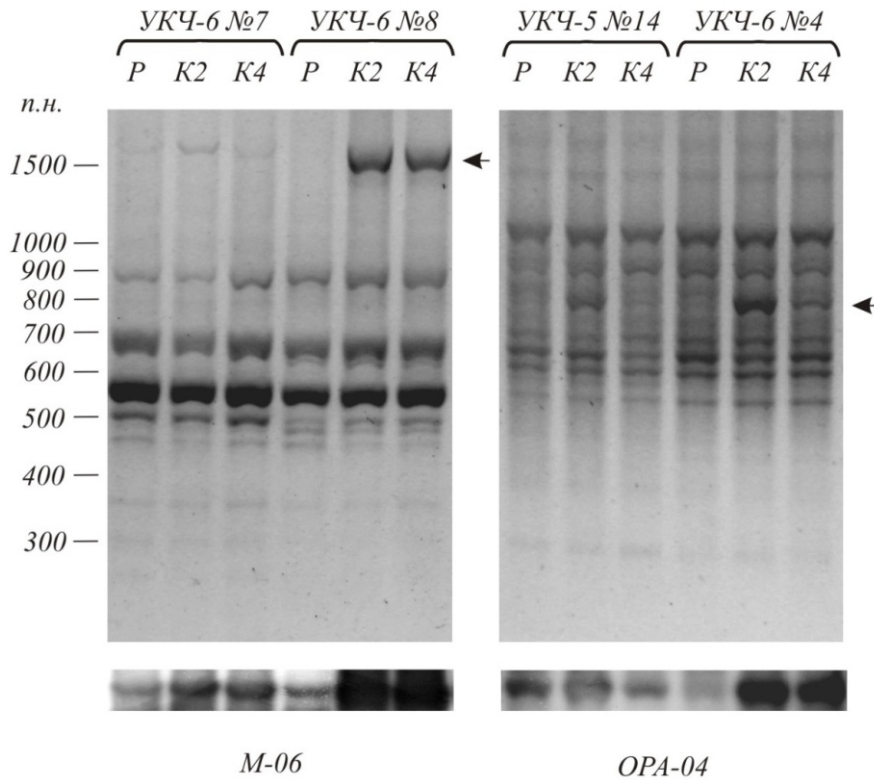


Рис. 3. Зміни поліморфних ампліконів у культурі тканин соматональних ліній кукурудзи: верхня панель – результати електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації ДНК рослин (P) та їхніх культивованих тканин віком два та чотири місяці (K2 та K4 відповідно); нижня панель – гібридизація за Саузерном з послідовностями відповідних варіабельних ампліконів (позначено стрілкою на верхній панелі). Внизу вказано назви використаних у ПЛР праймерів

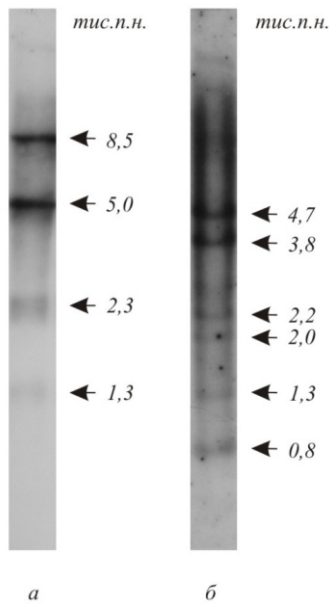


Рис. 4. Вміст та організація послідовностей досліджених поліморфних ампліконів у складі геному кукурудзи лінії Р346: а – гібридизація ДНК рослини, гідролізованої *Bam*HI, з поліморфним ампліконом ~1600 п. н. (двомісячний калюс рослини № 8, соматональна лінія УКЧ-6, праймер М-06); б – гібридизація ДНК рослини, гідролізованої ендонуклеазою *Hind*III, з поліморфним ампліконом ~800 п. н. (інтактна рослина № 4, соматональна лінія УКЧ-6, праймер ОРА-04)

нинах рослин кількох ліній, використано як зонди для додаткових досліджень методом блот-гібридизації за Саузерном. Ці фрагменти виділили з ПЛР-спектрів двомісячного калюсу рослини № 8 лінії УКЧ-6 та двомісячного калюсу рослини № 4 УКЧ-6 відповідно. Блот-гібридизацією поліморфних RAPD-спектрів з відповідними ампліконами визначено наявність гомологічних до зонда послідовностей на всіх доріжках, навіть там, де продуктів ПЛР не спостерігали після забарвлення бромистим етидієм (рис. 3). Отже, в даному разі поліморфізм досліджених ампліконів, скоріш за все, полягає у значних варіаціях кількості продуктів ПЛР, а не в їхньому утворенні заново. Наскільки такі зміни пов'язані з реальними генетичними перебудовами, на основі отриманих даних впевнено стверджувати не можна. Серед найвірогідніших причин – зміна кількості амплікованої послідовності ДНК в геномі клітин після введення в культуру *in vitro* або ж точкові мутації в ділянці гібридизації праймера, наслідком яких є підвищення її гомології до послідовності праймера.

Крім того, проведено блот-гібридизацію вищезгаданих поліморфних ампліконів з геномною

ДНК лінії Р346, гідролізованою ендонуклеазами рестрикції, щоб проаналізувати вміст і організацію послідовностей досліджуваних поліморфних ампліконів у складі геному кукурудзи. Результати цього досліджу, наведені на рис. 4, а саме – наявність у гібридизаційних спектрах кількох фрагментів значного розміру, свідчать про помірну або високу копійність послідовностей досліджених ампліконів.

Таким чином, нами проаналізовано генетичну мінливість у культурі тканин *in vitro* п'яти соматональних ліній кукурудзи з підвищеною здатністю до утворення тотипотентного калосу та регенераційним потенціалом. Необхідність проведення такого дослідження пов'язана з можливою дестабілізацією геному внаслідок культивування рослинних клітин та тканин *in vitro*, що, власне, і є однією з причин соматональної мінливості.

Для досліджень обрано RAPD-аналіз, який поряд з відносною простотою має достатню ефективність. Цей метод успішно використовували при вивченні геномних змін, індукованих культивуванням рослинних тканин *in vitro*. Наприклад, Осипова та ін. [12] знайшли зміни в RAPD-спектрах рослин-регенерантів, отриманих від лінії кукурудзи А188, Годвін та ін. – у спектрах ампліконів регенерантів рису [14], Лінасера та ін. [15] – у спектрах продуктів амплікації рослин-регенерантів жита. Застосовуючи RAPD-ПЛР, визначено геномні зміни в калюсних тканинах кактусу *Cereus peruvianus* [16] та томатів [17], що зростали на різних за складом живильних середовищах. У той же час у деяких випадках змін виявлено не було [18, 19].

У даній роботі геномні перебудови знайдено в калюсних тканинах рослин кукурудзи лінії Р346 та її соматональних варіантів. Потрібно відмітити, що зміни спостерігали вже після двох місяців культивування *in vitro*. На цей час перебудови детектовано в калюсах більш ніж половини досліджуваних рослин – у 10 з 19. Зміни проявлялися переважно в появі додаткових фрагментів у спектрах ампліконів калюсних тканин. При подальшому культивуванні (після чотирьох місяців росту *in vitro*) рівень відмінностей рослина–калюс знижувався майже вдвічі: зменшувалася кількість як поліморфних

фрагментів, так і калюсів з поліморфними спектрами. Причинами цього можуть бути кількісні зміни ампліфикованих послідовностей у клітинному геномі або ж клітин, які несуть в своєму геномі ці послідовності. В обох випадках це явище, скоріш за все, має фізіологічний характер і або відбиває епігенетичні зміни, що відбуваються при індукції калюсоутворення, або пов'язане з різницею у швидкості проліферації різних типів клітин у складі експланта на різних етапах росту в культурі *in vitro*.

Привертає до себе увагу подібність виявлених геномних змін у культивованих тканинах кукурудзи досліджених ліній. Зокрема, поліморфізм деяких ПЛР-фрагментів спостерігали одночасно в калюсах декількох рослин (від двох до п'яти, таблиця). В окремих випадках (фрагмент ~1600 п. н., праймер М-06, фрагмент ~800 п. н., праймер ОРА-04) це відбувалося у рослин різних ліній. Появу фрагментів, не знайдених у калюсах інших рослин, відмічено в спектрі ампліконів лише однієї рослини – УКЧ-6 № 7. Ці дані свідчать про можливість існування в геномі кукурудзи ділянок з підвищеною мінливістю. Такі «гарячі точки» нестабільності геному спостерігали в культурі *in vitro* й інших видів рослин, зокрема, рису [20], жита [15], тополі *Populus deltoides* [21] та арабідопсису [22].

В цілому, проведені дослідження показали, що соматональні лінії відрізняються за рівнем генетичної мінливості в культурі *in vitro*. У калюсах ліній УКЧ-7 та УКЧ-9 поліморфізму RAPD-фрагментів не спостерігали взагалі, найвищий рівень поліморфізму виявлено в культурі тканин рослин ліній УКЧ-6 і УКЧ-8. Використання ліній УКЧ-7 та УКЧ-9 у генно-інженерних розробках забезпечить зниження рівня небажаних мутацій на етапі культури *in vitro*, пов'язаних з нестабільністю геному експланта. З іншого боку, лінії з підвищеним рівнем генетичної мінливості – УКЧ-6 та УКЧ-8 – можуть бути використані в класичній селекційній практиці для створення нових сортів.

Раніше нами проведено молекулярно-генетичний аналіз рослин досліджених ліній і встановлено, що соматональні варіанти відрізняються між собою за значеннями генетичних відстаней від лінії Р346, а також за рівнем внутрішньолінійної гетерогенності [4]. Найбільшою внутрішньолінійною ге-

терогенністю характеризуються лінії УКЧ-6 та УКЧ-8, найменшою – УКЧ-5. Генетично найвіддаленішими від вихідної лінії P346 виявилися лінії УКЧ-6 та УКЧ-8, найменш віддаленою – УКЧ-5. Лінії УКЧ-7 та УКЧ-9 займають проміжне положення за значенням генетичних відстаней від P346. Таким чином, можна припустити, що між цими трьома показниками, а саме – за рівнем генетичної мінливості *in vitro*, внутрішньолінійною гетерогенністю та генетичною відстанню від вихідної лінії існує позитивний взаємозв'язок. Але для його остаточного підтвердження, а також для з'ясування механізмів, що лежать у його основі, потрібні поглиблені дослідження на більшій вибірці об'єктів.

**Висновки.** Аналіз калюсних тканин, отриманих від індивідуальних рослин інбредних ліній кукурудзи, методом RAPD-ПЛР виявив генетичні зміни, індуковані культивуванням *in vitro*. Поліморфізм RAPD-спектрів спостерігали вже у двомісячних калюсних культурах, але після чотирьох місяців культивування його рівень знижувався майже вдвічі. Відмічено появу однотипних змін ДНК у калюсах різних рослин окремих ліній, що свідчить про можливість існування в геномі кукурудзи «гарячих точок» мінливості. Встановлено, що серед соматоклональних ліній з підвищеною регенераційною здатністю є такі, що характеризуються високою генетичною стабільністю в культурі *in vitro*, – УКЧ-7 та УКЧ-9.

Автори висловлюють щире подяку Т. М. Чеченевій (Інститут фізіології рослин і генетики НАН України) та І. А. Гур'євій (Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва, Харків) за наданий насінневий матеріал. Роботу виконано за часткової фінансової підтримки ДНТП Міністерства освіти і науки України в рамках проекту № 03.02.03/0014128.

*D. M. Maidanyuk, I. O. Andreev, K. V. Spiridonova, V. A. Kunakh*

Genomic variability in maize callus cultures of lines P346 and its derivative somaclonal lines

Summary

*Callus tissues from individual maize plants of line P346 and derived from it through in vitro tissue culture of somaclonal variants showing increased regeneration capacity have been analyzed by RAPD. As early as after two months in culture maize calli exhibited genome changes but following four months their level decreased almost twice. The emergence of homotypic DNA changes in calli*

*obtained from different plants of individual lines was registered thus suggesting the existence of variability hot-spots within the maize genome. The somaclonal lines were shown to vary by the level of the genetic changes in culture in vitro.*

*Keywords: maize, plant tissue culture, somaclonal lines, RAPD analysis, genome rearrangements.*

*D. H. Maidanyuk, I. O. Andreev, E. V. Spiridonova, V. A. Kunakh*

Геномная изменчивость в каллусных культурах кукурузы линии P346 и полученных от нее соматоклональных линий

Резюме

*Методом RAPD-анализа исследованы каллусные ткани индивидуальных растений кукурузы линии P346 и полученных от нее через культуру тканей in vitro соматоклональных линий с повышенной регенерационной способностью. Геномные изменения в культивируемых тканях наблюдали уже в двухмесячных каллусах, но после четырех месяцев культивирования их уровень снижился почти вдвое. Отмечено появление однотипных изменений ДНК в каллусах, полученных от разных растений отдельных линий, что свидетельствует о возможности существования в геноме кукурузы «горячих точек» изменчивости. Показано, что соматоклональные линии отличаются по уровню генетической изменчивости в культуре in vitro.*

*Ключевые слова: кукуруза, культура тканей растений, соматоклональные линии, RAPD-анализ, геномные перестройки.*

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Jain S. M. Tissue culture-derived variation in crop improvement // *Euphytica*.–2004.–**118**.– P. 153–166.
2. 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.
3. Чеченева Т. Н. Спонтанная и индуцированная изменчивость кукурузы *in vitro*: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.15 / Институт физиологии растений и генетики НАН Украины.–К., 2003.–302 с.
4. Майданюк Д. М., Андреев І. О., Спирідонова К. В., Кунах В. А. Генетичний поліморфізм соматоклональних ліній кукурудзи, отриманих від лінії P346 // *Біополімери і клітина*.–2007.–**23**, № 4.–С. 324–331.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*.–1962.–**15**.–P. 473–497.
6. Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of field plant tissues // *Plant Mol. Biol*.–1985.–**5**.–P. 69–76.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.–М.: Мир, 1984.–480 с.
8. Yeh F. C., Rongcai Y., Boyle T. POPGENE. Version 1.31.–Edmonton: Univ. Alberta, 1999.
9. Nei M. Genetic distance between populations // *Amer. Naturalist*.–1972.–**106**.– P. 283–292.



10. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolution genetics analysis and sequences alignment // Briefin. Bioinf.–2004.–5.–P. 150–163.
11. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res.–1990.–18.–P. 6531–6535.
12. Осипова Е. С., Ковеза О. В., Троицкий А. В., Долгих Ю. И., Шамина З. Б., Гостимский С. А. Выявление специфических фрагментов у соматклонов кукурузы и создание на их основе SCAR-маркеров // Генетика.–2003.–39, № 12.–С. 1664–1672.
13. Майданюк Д. Н., Андреев И. О., Спиридонова Е. В., Чеченева Т. Н., Кунах В. А. 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.
14. Godwin I. D., Sangduen N., Kunanuvatchaidach R., Piperidis G., Adkins S. W. RAPD polymorphisms among variant and phenotypically normal rice (*Oryza sativa* var. *indica*) somaclonal progenies // Plant Cell Rep.–1997.–16.–P. 320–324.
15. Linacero R., Freitas Alves E., Vazquez A. M. Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye // Theor. and Appl. Genet.–2000.–100.–P. 506–511.
16. Mangolin C. A., Ottoboni L. M. M., Machado M. F. P. S. RAPD markers to evaluate callus tissue of *Cereus peruvianus* Mill. (*Cactaceae*) maintained in different growth regulator combinations // Biochem. Genet.–2002.–40.–P. 351–358.
17. Bogani P., Simoni A., Lio P., Scialpi A., Buiatti M. Genome flux in tomato cell clones cultured *in vitro* in different physiological equilibria. II. A RAPD analysis of variability // Genome.–1996.–9.–P. 846–853.
18. Fourre J. L., Berger P., Niquet L., Andre P. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches // Theor. and Appl. Genet.–1997.–94.–P. 159–169.
19. Gallego J., Martinez I., Celestino C., Toribio M. Somaclonal variation using RAPDs in *Quercus suber* L. Somatic embryos // Int. J. Plant Sci.–1997.–158.–P. 563–567.
20. Xie Q. J., Oard J. H., Rush M. C. Genetic analysis of a purple-red hull rice mutation derived from tissue culture // J. Hered.–1995.–86.–P. 154–156.
21. Rani V., Parida A., Raina S. N. Random polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. // Plant Cell Rep.–1995.–14.–P. 459–462.
22. Polanco C., Ruiz M. L. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants // Plant Sci.–2002.–162.–P. 817–824.

УДК 575.22:633.15+581.143.6

Надійшла до редакції 18.06.07