

УДК 601.4:[602.3:57.086.83]

## ПРОЯВЛЕНИЕ СОМАКЛОНАЛЬНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ У МИКРОРАЗМНОЖЕННЫХ И ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

В.Г. ЛЕБЕДЕВ<sup>1</sup>, А.Б. АЗАРОВА<sup>1</sup>, КА. ШЕСТИБРАТОВ<sup>1</sup>, В.И. ДЕМЕНКО<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Филиал Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова;  
<sup>2</sup> Кафедра плодородия РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

**Соматическая изменчивость является одной из основных проблем при клональном микроразмножении ценных генотипов растений. Мы оценивали уровень и природу соматических изменений у микроразмноженных и трансгенных растений плодовых, ягодных, декоративных и лесных культур в условиях *in vitro*, теплицы и открытого грунта. Показано влияние генотипа, эпигенетический характер ряда изменений, проявление ювенильных признаков, расщепление химерного генотипа в процессе микроразмножения, а также изменение уровня плоидности у трансгенных растений.**

*Ключевые слова:* соматическая изменчивость, *in vitro*, трансгенные растения, земляника, яблоня, сирень, ясень, груша, осина, береза.

Термин «соматическая изменчивость», означающий изменчивость, возникающую в культуре клеток или тканей, впервые появился в 1981 г. [11], хотя об этом явлении неоднократно сообщалось и ранее. Соматические изменения могут иметь генетическую или эпигенетическую природу. Генетические отклонения наследуются и часто представляют собой проявление уже существующих изменений в клетках экспланта, хотя возможно и возникновение новых мутаций. Одним из наиболее важных проявлений таких изменений являются хромосомные нарушения. Хотя увеличение плоидности может возникать и при делении эндополиплоидных клеток исходного экспланта [22], все же большинство полиплоидов и анеуплоидов возникает в процессе культивирования [5]. Эти изменения следует отличать от морфозов, ненаследуемых эпигенетических изменений, которые часто обратимы и происходят в результате воздействия культивирования в условиях *in vitro*. Морфозы обычно проявляются в увеличении силы роста и ветвления, способности к укоренению и цветению, задержке вступления в плодоношение, т.е. признаков, характерных для ювенильной фазы развития. Для выяснения природы наблюдаемых изменений у видов с половым способом размножения необходимо произвести соответствующее скрещивание. Для видов, размножаемых бесполом путем, сохранение признака, по крайней мере, в двух последовательных циклах клонального микроразмножения, обеспечивает подтверждение генетической причины данного изменения [2]. Для обнаружения соматических изменений применяются различные методы: морфологическая оценка, цитологические исследования (кариотипирование, проточная цитометрия), анализы с использованием молекулярных маркеров. Следует учитывать, что исследований *in vitro* и в теплице недостаточно для полного выявления отклонений и требуется проверка в полевых условиях.

Проявление соматклональной изменчивости может быть и преимуществом, и недостатком. С одной стороны, она увеличивает генетическое разнообразие и тем самым способствует выведению новых сортов. Например, таким образом были получены сорт нетемнеющего картофеля White Baron и сорт бесшипной ежевики Lincoln Logan [7]. С другой стороны, при клональном размножении садовых и лесных культур, когда целью является получение однородного посадочного материала от ценных генотипов, ее появление нежелательно. Особое внимание следует уделять культуре *in vitro* химерных сортов, которые содержат клетки разных генотипов, так как известно, что химеры можно разделять путем микроразмножения [25] или адвентивной регенерации [3]. По этим причинам очень важно понимать механизмы, которые порождают нестабильность и соматклональную изменчивость *in vitro*, с целью управления частотой ее встречаемости в зависимости от поставленных целей. Исследования показали, что на частоту соматклональной изменчивости в культуре *in vitro* могут влиять такие факторы, как генотип [23], источник эксплантов [19], регуляторы роста [21, 9], а также состав среды, продолжительность и условия культивирования и другие. Вероятность соматклональной изменчивости возрастает, если в ходе культивирования растений присутствует стадия каллуса [19, 21]. Образование каллуса характерно для процессов адвентивной регенерации или соматического эмбриогенеза растений. По этой причине соматклональные отклонения особенно важно контролировать при криосохранении соматических эмбрионов и их использовании в качестве искусственных семян.

Свои особенности имеет соматклональная изменчивость, наблюдаемая у генетически модифицированных (трансгенных) растений. Эти растения иногда показывают изменения в фенотипе, не связанные с экспрессией перенесенных генов. Хотя в ряде исследований было продемонстрировано, что частота соматклональной изменчивости не различается между трансгенными и нетрансгенными регенерантами [6], однако в некоторых случаях она увеличивалась [4]. Причинами такой дополнительной изменчивости могут быть стресс, связанный с методикой проведения трансформации или встраивание переносимых генов, а также других нецелевых последовательностей ДНК (вставочный мутагенез). Методика генетической трансформации растений сопровождается такими стрессовыми воздействиями, как длительная экспозиция эксплантов с высокими концентрациями регуляторов роста для регенерации растений, а также с антибиотиками или гербицидами, которые необходимы для селекции трансформированных клеток и элиминации агробактерий. Было показано, что частота изменений ДНК у трансгенных растений коррелировала со степенью стрессовых воздействий *in vitro* [10]. Проявление полиплоидности у трансгенных растений может быть связано с миксоплоидной природой исходных эксплантов. Например, в листьях проростках томата было обнаружено 16% тетраплоидных клеток и 2% октоплоидных, а в семядолях — уже 39 и 9% [26]. Вместе с тем семядоли часто используются для трансформации растений, в особенности древесных, так как частота регенерации из них в силу ювенильной природы выше, чем из тканей несемennого происхождения, например, листьев. Таким образом, для снижения вероятности соматклональных изменений у трансгенных растений следует обращать внимание на плоидность исходных эксплантов, а также ослаблять стрессовое воздействие: например, исключить селекцию на антибиотиках или гербицидах и использовать прямую регенерацию без стадии каллуса.

Целью нашей работы являлась оценка уровня и природы соматклональных изменений, возникающих при клональном микроразмножении и генетической трансформации ряда плодовых, ягодных, декоративных и лесных культур.

## Методика

Оценку соматической изменчивости по морфологическим признакам проводили на растениях земляники (*Fragaria ananassa* Duch.), яблони (*Malus domestica* Borkh), сирени (*Syringa vulgaris* L.) и ясеня обыкновенного (*Fraxinus excelsior* L.), полученных путем клонального микроразмножения. Мультипликацию земляники проводили на среде MS с добавлением 0,3-0,5 мг/л 6-БАП, яблони — на среде MS с 2 мг/л 6-БАП, сирени — на среде MS с 3 мг/л 6-БАП, ясеня — как описано у Лебедева и Шестибратова [1]. Растения земляники оценивали *in vitro* (4 генотипа) и в полевых условиях (7 генотипов), растения яблони (спуровая форма и подвой) — в поле в двухлетнем возрасте. В полевых условиях также оценивали микроразмноженные растения ясеня в возрасте двух лет (Нижегородская обл.) и сирени сорта Сенсация в возрасте 5 лет (Ленинградская обл.).

Уровень плоидности определяли у трансгенных растений груши (*Pyrus communis* L.), березы пушистой (*Betula pubescens* Ehrh.) и осины (*Populus tremula* L.), полученных авторами в ФИБХ РАН. Трансформацию груши сорта Бураковка геном растительного дефензина *Rs-AFP2* проводили, как описано в работе [13]. Трансформацию осины и березы генами глутаминсинтетазы *GS* и ксиланглюканазы *Xeg* проводили, как описано в работе [14]. Уровень плоидности трансгенных растений оценивали путем подсчета хромосом в клетках побеговой и корневой меристем.

## Результаты и их обсуждение

Вегетативный способ размножения садовых растений, в отличие от семенного, позволяет сохранять сортовые признаки. Размножение *in vitro* является наиболее интенсивным методом вегетативного размножения и поэтому контроль генетической стабильности растений, полученных таким способом, имеет большое значение. Условия выращивания растений *in vitro* могут оказывать существенное влияние на рост и развитие полученных растений. В ходе исследований нами было проследовано свыше 10 тыс. растений земляники и среди них были отмечены растения с ярко выраженными аномалиями (табл. 1). Следует отметить, что доля таких растений была незначительной благодаря использованию разработанных нами составов питательных сред и небольшому количеству пассажей.

Таблица 1

Фенотипические отклонения у растений земляники *in vitro*

Сорт	Количество растений с отклонениями, %				
	морщинистость	аномалии листьев	карликовость	альбиносы	хлороз
Надежда	0,5	0	0	0	1,0
Редгонтлит	7,5	3,4	4,9	0	0
Фестивальная	1,0	0	0	0	0
Холидей	0	0	0	0	0

Данные таблицы 1 показывают сильное влияние генотипа на проявление соматической изменчивости. Растений с отклонениями не наблюдалось у сорта Холидей, тогда как у сорта Редгонтлит изменения отмечались у 15,8% растений. У сортов Надежда и Фестивальная частота изменений была незначительной — 1-1,5%. За-

висимость соматональных изменений от генотипа отмечали и в других работах по землянике [23]. Большая часть полученных нами растений с отклонениями погибла после высадки в нестерильные условия. Для того чтобы определить причины таких аномалий (затронут геном растений или это морфозы), меристематические верхушки с признаками отклонений вводили повторно в культуру на питательную среду содержащую 0,1 мг/л 6-БАП. После второго пассажа побеги укореняли на среде с крезацином и переводили в нестерильные условия. Мы не замечали отклонений в развитии растений и поэтому можно считать, что эти изменения имели эпигенетическую природу.

Таблица 2

**Коэффициент размножения земляники в зависимости от происхождения маточного растения и способа выращивания (сорт Надежда)**

Происхождение маточного растения и способ выращивания	Общий выход, шт./маточное растение
Контроль, мульчпленка	112
F <sub>0</sub> <i>in vitro</i> , укоренение на месте	192
F <sub>0</sub> <i>in vitro</i> , мульчпленка	205
F <sub>1</sub> , <i>in vitro</i> , укоренение на месте	165
F <sub>1</sub> , <i>in vitro</i> , мульчпленка	130

HCP<sub>05</sub>

36,5

известно. Последствие выращивания *in vitro* сохранялось также у растений F<sub>j</sub> *in vitro*, которые представляли собой укорененные розетки первого порядка растений F<sub>0</sub>. Это связано с тем, что первые усюплети маточного растения развиваются из почек, заложенных *in vitro*.

Повышенный коэффициент размножения у растений земляники после культуры *in vitro* зависел от генотипа (табл. 3). На конец июня количество розеток у сорта Заря, размноженных *in vitro*, превышало показатель контрольных растений в 2,1 раза, Редгонтлит — в 3,2 раза, Зенга-Зенгана — в 5,4 раза. С течением времени преимущество микроразмноженных растений еще больше возросло: в конце августа сорт Зенга-Зенгана превосходил контроль в 5,7 раза, а Редгонтлит — в 6,8 раз. Подобный

Таблица 3

**Влияние способа получения маточных растений на выход розеток земляники (посадка в начале марта)**

Сорт	Количество розеток от растений, полученных <i>in vitro</i> , шт.		Количество розеток от растений, полученных через пикировку, шт.	
	конец июня	начало августа	конец июня	начало августа
Редгонтлит	76	178	24	26
Зенга-Зенгана	54	80	10	14

F<sub>φ</sub> > F<sub>T</sub>

С целью оценки влияния культивирования *in vitro* на последующее размножение растения нескольких сортов земляники, полученных методом клонального микроразмножения, были высажены в пленочные теплицы. Сравнение двух способов размножения маточных растений земляники (по мульчпленке и укоренение розеток на месте) показало, что коэффициент размножения зависит от происхождения маточного растения и способа выращивания (табл. 2). Растения F<sub>0</sub> *in vitro*, полученные непосредственно в культуре ткани, по коэффициенту размножения существенно превосходили контрольные растения, полученные традиционным способом — 205 и 112 соот-

эффект культуры *in vitro* наблюдали и другие авторы. Например, исследования, проведенные в поле на растениях земляники сорта Teresa, полученных методом *in vitro*, показали их превосходство над размноженными традиционным способом по количеству листьев, усов и урожайности [27].

Подобное преимущество культивирования *in vitro* мы наблюдали и на древесном растении — яблоне. Растения клонового подвоя 62-396, переведенные в нестерильные условия в марте и высаженные в открытый грунт в мае, на второй год достигли необходимого развития для окулировки. Приживаемость при окулировке вприклад не отличалась от контроля и составила 100%. Однако укореняемость зеленых черенков с растений, полученных через культуру ткани, на 24% превышала показатели контроля (98 и 74% соответственно). Ранее сообщалось, что укореняемость черенков трудноукореняемых подвоев яблони, сливы и груши увеличилась при использовании маточников, заложенных растениями, полученными *in vitro* [8]. Такое фенотипическое изменение, ювенилизация, возникающая как ответная реакция на культивирование *in vitro*, является положительным явлением и должна использоваться в практике питомниководства для трудноукореняемых видов.

Мы также оценивали влияние исходного экспланта на рост и развитие спуровой формы яблони в открытом грунте после клонального микроразмножения. Растения, полученные из двух различных меристем после 10 субкультивирований, после прохождения периода покоя по фенотипическим характеристикам существенно не отличались между собой, что подтвердила статистическая обработка данных (табл. 4).

Т а б л и ц а 4

**Влияние исходного экспланта спуровой формы яблони 267 на рост и развитие в открытом грунте (возраст 2 года)**

Исходная меристема	Высота саженца, см	Длина прироста, см	Толщина штамба, мм	Угол отхождения побегов, °	Количество боковых ветвей, шт.
С	100,1	40,0	11,5	50,3	1,0
Т	89,1	32,1	11,4	55,2	1,1

$F_{\Phi} > F_T$

Оценку соматоклональной изменчивости мы проводили также и на лесных культурах. Около 5 тыс. растений ясеня обыкновенного *in vitro* были акклиматизированы в теплице и не показали никаких фенотипических отклонений. Так как для выявления соматоклональной изменчивости только наблюдений *in vitro* и в теплице недостаточно, то в поле для закладки лесных плантаций было высажено более тысячи растений ясеня. Оценка через два сезона также не обнаружила каких-либо признаков соматоклональных изменений. Наши результаты вполне согласуются с данными других исследователей, которые в полевых испытаниях не наблюдали отклонений у растений, полученных путем микроразмножения или регенерации [18, 20].

Особое внимание следует уделять клональному микроразмножению химерных растений. Мы размножали *in vitro* растения сирени сорта Сенсация с двухцветными цветками, которые затем были высажены для дорастивания в поле. Через 5 лет они зацвели и выяснилось, что из двух тысяч растений около 10% имеют белые цветки, а на пяти растениях присутствовали и белые, и цветки с нормальной окраской (рис. 1). Известно, что этот популярный сорт, обладающий пурпурно-красными



**Рис. 1.** Расщепление признака окраски цветка у сирени сорта Сенсация после клонального микроразмножения (а — растение, б — цветки)

цветками с серебристо-белой каймой, является периклинальной химерой — он был получен в 1938 г. как мутация сорта Hugo de Vries с красновато-лиловым цветками. Данные о поведении химерных генотипов в культуре *in vitro* противоречивы. С одной стороны, химеры можно разделять различными методами *in vitro*. Например, химеры банана (миксоплоиды) разделяли с использованием трех систем микроразмножения [25]. Адвентивную регенерацию с успехом применяли для разделения на генетические компоненты двух химерных сортов груш: Louise Bonne Panachee с пестрыми листьями и плодами и Red Hardy с красными плодами [3]. С другой стороны, Rosati [24] обнаружил, что микроразмноженные растения бесшипного химерного сорта Loganberry остаются генетически стабильными после 3 лет выращивания в поле. Наконец, микроразмножение химер даже может обладать преимуществом над традиционным размножением. Химерная фиалка Pinwheel Flowering с двухцветными цветками при размножении листьями сохраняла этот признак только у 30% растений (70% — одноцветные), а размножение ее методом *in vitro* обеспечивало получение 96% растений с двухцветными цветками [12]. Наши результаты показывают, что размножение *in vitro* приводит к расщеплению признака окраски цветка у химерного сорта сирени Сенсация, но частота такого расщепления относительно невелика.

В своей работе мы также проводили оценку соматоклональных изменений на трансгенных растениях. После трансформации груши геном растительного дефензина было получено 70 трансгенных линий сорта Бураковка [13]. При клональном микроразмножении полученных линий выяснилось, что у некоторых из них имеет-

ся ряд отличий: утолщенный стебель, более крупные листья, некроз верхушечной почки. Цитологический анализ показал, что эти линии являются тетраплоидами. Из 70 линий всего 9 оказались тетраплоидами (12,9%), причем одна линия являлась химерой: клетки из двух побеговых меристем оказались тетраплоидными (68 хромосом), а из одной — диплоидными (34 хромосомы). Другими исследователями также было показано изменение пloidности груши после трансформации, причем, по-видимому, присутствовало влияние генотипа: при трансформации сорта Passe Crassane было обнаружено 12% [15] и 15% [16] тетраплоидов, а при трансформации сорта Conference — всего 0-4% [17]. Полиплоидные генотипы являются ценным исходным материалом для дальнейшей селекции и одним из методов их получения можно считать трансформацию и/или регенерацию.

Причин изменения пloidности при культивировании *in vitro* может быть несколько. Одной из них является наличие полиплоидных клеток в исходном экспланте. Например, было обнаружено, что ткань семядолей гвоздики содержала около 60% тетраплоидных клеток [22]. В связи с этим использование эксплантов несемennого происхождения, например, листьев, предпочтительнее, так как уровень пloidности клеток у них более стабилен. Мы для трансформации груши использовали именно листья с растений *in vitro*. Однако известно, что ювенильные органы, такие как семядоли, обычно обладают более высокой частотой регенерации и часто используются для регенерации и трансформации растений, особенно древесных видов. С другой стороны, использование таких эксплантов может привести к повышению уровня соматоклональных изменений. Вместе с тем, несмотря на роль исходного материала, большинство полиплоидов и анеуплоидов возникает в процессе культивирования. Проточная цитометрия показала, что 14% растений папайи, полученных через соматический эмбриогенез из каллуса, имеют измененную пloidность [5]. Известно, что вероятность отклонений возрастает, если в процессе культивирования *in vitro* присутствует стадия каллуса. Например, изменения в уровне пloidности были ниже в стеблевых эксплантах спаржи, чем в каллусе, полученном из этих эксплантов [19]. Между тем большинство трансгенных растений, в т.ч. и трансформанты груши в нашем эксперименте, получают именно через каллус, который образуется из выживших на селективной среде трансформированных клеток. Кроме того, для регенерации трансгенных растений характерно использование высоких концентраций регуляторов роста, в частности, цитокининов. Для регенерации побегов груши после трансформации мы использовали среду с добавлением 3 мг/л ТДЗ. Эта концентрация в десятки раз выше тех, которые обычно используются для пролиферации побегов растений *in vitro*. Роль концентрации регуляторов роста в индукции соматоклональных изменений неоднократно отмечалась исследователями. Добавление 6-БАП и НУК и увеличение их концентрации привело к двукратному увеличению доли тетраплоидных и октоплоидных клеток в каллусе гороха, а также к появлению триплоидных и анеуплоидных клеток, которых ранее не наблюдали [9]. Увеличение концентрации БАП и 2,4-Д с 10 до 20 мкМ индуцировало появление до 10% карликов среди регенерантов из каллуса земляники [21]. Также и длительное нахождение эксплантов и каллуса на питательных средах способно повысить частоту отклонений, что подтверждалось рядом исследований. Например, растения из 8-недельного каллуса земляники не показали каких-либо морфологических изменений, тогда как у растений, регенерированных из 16- и 24-недельного каллуса, отмечалась деформация (6-13%) и пожелтение листьев (21-29%) [21]. В наших же экспериментах трансформанты груши регенерировали, начиная с первого пассажа после трансформации, но полиплоидные появлялись только с шестого пассажа, т.е. после нескольких меся-

цев культивирования каллуса, что и могло способствовать изменению ploидности. Все эти вместе взятые факторы и могли привести к появлению полиплоидных трансгенных линий груши.

Уровень ploидности также был определен в трансгенных растениях генотипа березы бп3ф1, полученных после трансформации геном глутамининтазы. Исходный генотип является миксоploидом с преобладанием тетраploидных клеток с 56 хромосомами (72,8%) и также содержит 15,2% триploидных (42 хромосомы) и по 6,0% диплоидных (28 хромосом) и анеуплоидных клеток. В процессе регенерации произошло разделение клеток с различными хромосомными наборами и анализ 6 трансгенных линий показал, что у трех из них преобладают тетраploидные клетки (100,0, 93,3 и 86,7%), у двух — триploидные (85,7 и 82,1%) и у одной — диплоидные (66,7%). Таким образом, нам удалось получить трансгенные растения березы с различными хромосомными наборами, которые в дальнейшем могут быть использованы в селекционных целях. Разделение клеток по ploидности в ходе регенерации из исходных химерных эксплантов уже наблюдали ранее [22]. Однако в этих работах доля полиploидных регенерантов была значительно ниже, чем доля полиploидных клеток в исходных эксплантах и авторы связывают это с повышенной способностью диплоидных клеток к регенерации по сравнению с тетраploидными. В нашей же работе среднее количество полиploидных клеток в трансформантах составило 81,3%, что существенно не отличается от 88% в исходном генотипе. Отсюда можно сделать вывод, что диплоидные и полиploидные клетки березы обладают примерно равным потенциалом к регенерации.

Кроме трансформантов березы, мы также проанализировали 28 клонов осины, полученных трансформацией диплоидного генотипа геном *GS*, и не выявили никаких изменений ploидности. Известно, что процесс трансформации не всегда способствует возникновению соматклональной изменчивости. Например, количество диплоидов у регенерантов дыни составило 83% и практически не изменилось у трансформан-

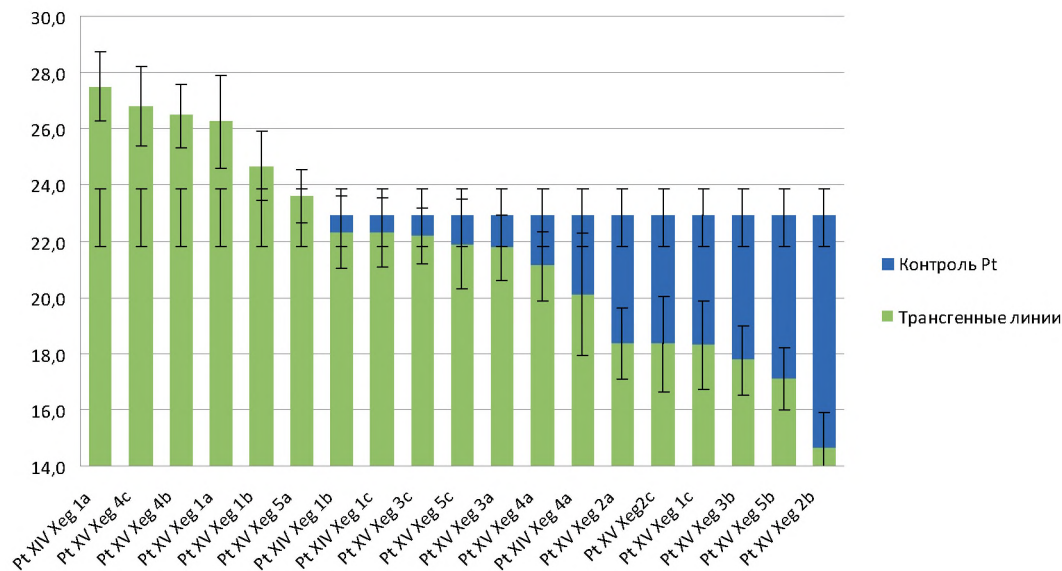


Рис. 2. Длина черешка у контрольных и трансгенных растений осины с геном ксилоглюканазы



тов — 82-84% [6]. Вероятнее всего, причина возникающих изменений заключается не столько в самом факте переноса генов, сколько в стрессовых условиях, сопровождающих этот перенос и последующую регенерацию: осмотический шок, длительное воздействие высоких концентраций регуляторов роста, присутствие селективных агентов — антибиотиков или гербицидов. Корреляция между частотой изменений ДНК и степенью стрессовых воздействий *in vitro* наблюдалась при трансформации риса: уровень отклонений от исходного генотипа был максимальным в случае трансформации протопластов (самое длительное культивирование *in vitro*), промежуточным в случае агробактериальной трансформации (необходима индукция каллуса) и самым низким при баллистической трансформации (короткий период клеточной культуры) [10]. Также со стрессовым воздействием связывают увеличение доли тетраплоидов у трансформантов риса по сравнению с регенерантами [4]. В своей работе мы наблюдали различия в длине черешка, одного из биометрических показателей листовой пластинки, у трансгенных растений осины. Всего было проанализировано 19 линий, трансформированных геном ксилотрансферазы (рис. 2). В результате было показано, что у 9 линий длина существенно не отличается от контроля, у 4 линий существенно превышает (на 15-20%) и у 6 линий черешки существенно короче (на 20-36%). Такие отклонения представляют собой явление межклоновой изменчивости, возникающее у трансгенных растений, но не связанное с экспрессией перенесенного гена.

### Заключение

Соматоклональная изменчивость часто рассматривается как нежелательное явление, присущее культивированию растений *in vitro*. Частота ее проявления может зависеть от генотипа, концентрации регуляторов роста в среде, продолжительности культивирования. Вместе с тем вероятность ее возникновения при клональном микроразмножении достаточно низка и часто носит эпигенетический, т.е. ненаследуемый характер. Изменчивость может оказывать положительный эффект на рост и развитие благодаря ювенилизации растений, способствовать выделению чистых генотипов из химерных сортов. Полиплоидизация исходных генотипов, возникающая в ходе генетической трансформации, приводит к получению ценного материала для дальнейшей селекции. Такого рода изменения у трансгенных растений имеют генетическую природу и передаются следующим поколениям.

Результаты по генетической трансформации осины получены в рамках выполнения Госконтракта № 14.740.11.0795 от 30.11.2010 г. Министерства образования и науки РФ.

### Библиографический список

1. Лебедев В.Г., Шестибратов К.А. Эффективный способ получения посадочного материала ясеня обыкновенного *in vitro* // Вестник Московского государственного университета леса. Лесной вестник, 2010. № 3. С. 112-118.
2. Хон Б. Мобильность генома растений / Хон Б., Денис Э.М.: Агропромиздат, 1990. 271 с.
3. Ihu-Qaoucl II., Skin'in R.M., Chevreau E. *In vitro* separation of chimeral pears into their component genotypes // Euphytica, 1990. V. 48. P. 189-196.
4. Choi H. II', Lem a ux P. G., ChoM.-J. Increased chromosomal variation in transgenic versus nontransgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) // Crop Science, 2000. V 40. P. 524-533.
5. Clarindo W.R., de Can'valho C.R., Araujo F.S. et al. Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry // Plant Cell Tissue Organ Culture, 2008. V 92. P. 207-214.

6. *Guis M., Ben Amor M., Latche A. et al.* A reliable system for the transformation of cantaloupe charentais melon (*Cucumis melo* L. var. *cantalupensis*) leading to a majority of diploid regenerants // *Scientia Horticulturae*, 2000. V. 84. P. 91-99.

1. *Jain S.M.* Tissue culture-derived variation in crop improvement // *Euphytica*, 2001. V. 118. P. 153-166.

8. *Jones O.P.* Propagation of apple in vitro. In: M.R. Ahuja (ed), *Micropropagation of Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1993. P. 169-186.

9. *Kumar P.S., Mathur V.L.* Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum* // *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2004. V. 78. P. 267-271.

10. *Labra M., Savini C., Bracale M. et al.* Genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced by infecting calli with *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Cell Reports*, 2001. V. 20. P. 325-330.

11. *Larkin P.J., Scowcroft W.R.* Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // *Theoretical and Applied Genetics*, 1981. V. 60. P. 197-214.

12. *Larson R.A.* African violet chimeras a practical use of micropropagation // *Growers Bulletin*, 1985. V. 29. P. 9-10.

13. *Lebedev K.G., Lavrova N., Lunin K.G. et al.* Plant-defensin genes introduction for improvement of pear phytopathogene resistance // *Acta Horticulturae*, 2002. V. 596. P. 167-172.

14. *Lebedev K.G., Shestibratov K.A., Shadrina T.E. et al.* Cotransformation of aspen and birch with three T-DNA regions from two different replicons in one *Agrobacterium tumefaciens* strain // *Russian Journal of Genetics*, 2010. V. 46. P. 1282-1289.

15. *Malnov M., Faize M., Kenisse J.-S. et al.* Expression of viral EPS-depolymerase reduces fire blight susceptibility in transgenic pear // *Plant Cell Reports*, 2005. V. 23. P. 632-638.

16. *Malnov M., Kenisse J.S., Chevreau E.* Expression of a bacterial effector, harp in N, causes increased resistance to fire blight in *Pyrus communis* // *Tree Genetics and Genomes*, 2005. V. 1. P. 41-49.

17. *Malnov M., Kenisse J.-S., Revnoird J.P., Chevreau E.* Activation of three pathogen-inducible promoters of tobacco in transgenic pear (*Pyrus communis* L.) after abiotic and biotic elicitation // *Planta*, 2003. V. 216. P. 802-814.

18. *McMeans O., Skin'in R.M., Otterbacher A., Mitiku G.* Assessment of tissue culture-derived 'Gala' and 'Royal Gala' apples (*Malus domestica* Borkh.) for somaclonal variation // *Euphytica*, 1998. V. 103. P. 251-257.

19. *Mishiba K.-L., Tawada K.-L., Mii M.* Ploidy distribution in the explant tissue and the calluses induced during the initial stage of internode segment culture of *Asparagus officinalis* L. // *In Vitro Cellular and Developmental Biology — Plant*, 2006. V. 42. P. 83-88.

20. *Navak S., Kaur T., Mohan tv S. et al.* In vitro and ex vitro evaluation of long-term micropropagated turmeric as analyzed through cytophotometry, phytoconstituents, biochemical and molecular markers // *Plant Growth Regulation*, 2011. V. 64. P. 91-98.

21. *Nehra N.S., Kartha K.K., Stushnott C., Giles K.L.* The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry // *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1992. V. 29. P. 257-268.

22. *Nontaswatsri C., Fukai S.* Regenerative callus of *Dianthus* 'Telstar Scarlet' showing mixoploidy produce diploid plants // *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2005. V. 83. P. 351-355.

23. *Popescu A.N., Lsac K.S., Coman M.S., Radulescu M.S.* Somaclonal variation in plants regenerated by organogenesis from callus culture of strawberry (*Fragaria x ananassa*) // *Acta Horticulturae*, 1997. V. 439. P. 89-96.

24. *Rosati P.* Genetic stability of micropropagated loganberry plants // *Journal of Horticultural Science*, 1986. V. 61. P. 33-41.

25. *Roux N., Dolezel J., Swennen R., Zapata-Arias F.J.* Effectiveness of three micropropagation techniques to dissociate cytochimeras in *Musa* spp. // *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2001. V. 66. P. 189-197.

26. *Smulders M.J.M., Rus-Kortekaas W., Gilissen L.J.W.* Natural variation in patterns of polysomaty among individual tomato plants and their regenerated progeny // *Plant Science*, 1995. V. 106. P. 129-139.

27. Zebrowska J.I., Czernas J, Gawronski J., Hortynski J.A. Suitability of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) microplants to the field cultivation // Food, Agriculture and Environment, 2003. V. 1. P. 190-193.

Рецензент — д. б. н. Е.А. Калашникова

#### SUMMARY

Somaclonal variation is one of the main problems when clonal micro-propagating valuable plant genotypes. Both frequency and nature of somaclonal variants in fruit, ornamental and forest plants, under *in vitro*, green house and field conditions have been evaluated. Effect of genotype, epigenetic changes, rejuvenation, separation of chimera during micro-propagation and polyploidization in transgenic plants are discovered.

**Key words:** somaclonal variation *in vitro*, transgenic plants, strawberry, apple, lilac, common ash, pear, aspen, birch.

**Лебедев Вадим Георгиевич** — к. б. н., ст. н. с. Филиала Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (тел. (4967) 33-09-66; e-mail: vglebedev@mail.ru).

**Азарова Анна Борисовна** — асп. Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (тел. (4967) 33-09-66; e-mail: anytkaa1987@mail.m).

**Шестибратов Константин Александрович** — к. б. н., ст. н. с., руководитель группы лесной биотехнологии Филиала Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (тел. (4967) 33-09-66; e-mail: schestibratov@fibkh.serpukhov.su).

**Деменко Василий Иванович** — д. с.-х. н., профессор кафедры плодоводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 976-21-98; e-mail: Plodovod2009@gmail.com).