

О.В. ДУБРОВНАЯ, Е.Н. ТИЩЕНКО

Институт физиологии растений и генетики  
НАН Украины, Киев

## ГЕНОМНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ МОРФОГЕННОГО И НЕМОРФОГЕННОГО КАЛЛУСА КОРМОВОЙ СВЕКЛЫ



*Исследовали цитологические особенности и уровень метилирования ДНК каллусных культур кормовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) с различной способностью к морфогенезу, полученных из одного и того же листового экспланта. Показано, что для неморфогенного каллуса в сравнении с морфогенным характерен более высокий уровень пloidности клеток и частоты хромосомных aberrаций уже на первых этапах культивирования. В полиплоидных клетках неморфогенного каллуса наблюдается сверхспирализация хромосом и образование конденсированного хроматина. Параллельно этому осуществляется гиперметилирование цитозина в сайт-специфичных CpCpGpG-мотивах ДНК, в связи с чем предполагается участие этой модификации ДНК в процессах преобразования генома.*

© О.В. ДУБРОВНАЯ, Е.Н. ТИЩЕНКО, 2003

**Введение.** Дедифференциация и каллусообразование *in vitro* сопровождаются существенными изменениями структурно-функционального состояния клетки [1]. При этом наблюдается широкий спектр геномных преобразований, которые проявляются в изменении числа и морфологии хромосом, их структурных перестройках, точковых мутациях, дифференциальной репликации различных последовательностей ДНК, а также изменении уровня метилирования нуклеиновых кислот [2–6]. Индуцируемая в культуре геномная изменчивость по своей природе в целом не отличается от мутаций, происходящих в ходе нормального онтогенеза, однако разнообразие и вероятность ее появления значительно выше [4, 7]. Количество и спектр этих геномных изменений зависят от многих факторов — особенностей генотипа растения, его возраста, условий культивирования, типа ткани и уровня специализации клеток [8].

Установлено, что генетические изменения, происходящие как на уровне числа и структуры хромосом, так и на уровне отдельных генов, могут существенно влиять на морфогенетический потенциал каллусных культур. Показано, что с увеличением возраста каллуса нередко наблюдается их полиплоидизация и возрастание частоты хромосомных aberrаций, вследствие чего значительно снижается или полностью утрачивается способность к регенерации [9, 10].

При выяснении молекулярных механизмов, в результате которых повышается частота мутагенеза *in vitro*, принципиальная роль отводится вариациям в уровне метилирования генома [4, 11, 12]. Одна из возможностей обусловлена взаимосвязью этой ферментативной модификации с модуляцией хроматина, что может приводить, например, к эктопической экспрессии генов, поздней репликации гетерохроматина и, как следствие, к хромосомным разрывам [11, 13]. Однако ферментативная модификация цитозина в ДНК рассматривается и как эпигенетический фактор в процессах органогенеза [12]. В условиях культивирования, где после дедифференцировки и каллусообразования происходит редифференцировка с последующим органогенезом, наблюдаются изменения уровней метилирования ДНК в структурных генах, рДНК, повторяющихся последовательностях [14–17].

Каллус разного регенерационного потенциала, полученный из одного и того же экспланта, является удобной моделью для выяснения внутренних факторов и путей передачи сигналов, ведущих к необратимым изменениям генетических программ органогенеза *in vitro*. В этой связи представляет интерес сравнительный анализ хромосомной изменчивости и состояния метилирования цитозина как одного из факторов, принимающих участие в различных геномных преобразованиях в ходе органогенеза. В настоящей работе проводили сопоставление ряда цитологических характеристик и уровня метилирования CpCpGpG-сайтов ДНК морфогенного и неморфогенного каллуса кормовой свеклы на первых этапах культивирования. Интерес к этим последовательностям генома вызван тем, что они наиболее часто подвергаются дифференциальному метилированию в промоторных и кодирующих участках генов и мобильных генетических элементов эукариот, а также нередко представлены в центромерных областях хромосом растений.

**Материалы и методы.** Материалом исследований служили каллусные культуры, индуцированные из листового экспланта диплоидного растения кормовой свеклы мужскостерильной формы 10–29 селекции фирмы KWS (Германия). Исходное растение трехмесячного возраста культивировалось на питательной среде DS-2 [18] без регуляторов роста и сниженным в два раза содержанием макросолей. Экспланты вычленили и переносили на среду DS, дополненную 0,5 мг/л БАП. Через 4 нед их субкультивировали на ту же среду без фитогормона, на которой наблюдалось образование каллуса в течение 2–3 нед. Полученный каллус в дальнейшем пассировался на безгормональной среде. Абсолютный возраст каллусных вариантов — три пассажа.

Цитологический анализ проводили, исключая предфиксационное влияние на митоз, с использованием стандартной методики фиксации (этиловый спирт : уксусная кислота — 3:1). Каллусы анализировали в период наибольшей митотической активности — на 6–7-е сутки пассажа (длительность пассажа 20 дней). Каллусные культуры окрашивали 2%-ным ацетоорсеином и готовили временные препараты по стандартной методике [19].

ДНК выделяли по модифицированному нами методу Деллапорта [17]. Для связывания полифенолов в замороженную жидким азотом ткань вносили 6 % Polyclar AT. Буфер для экстракции содержал 0,1 М Трис-НСl, рН 8,2 и 0,05 М ЭДТА, 0,5 М NaCl, 0,1 М аскорбиновую кислоту, 5 % парааминосалициловую кислоту, 1 % β-меркаптоэтанол и 1 % диэтилдитиокарбомат. В гомогенную суспензию вносили ДСН до 1 %, инкубировали гомогенат при 65 °С в течение 10 мин, добавляли калий ацетат до конечной концентрации 1,2 М и выдерживали при 0 °С в течение 30 мин. Нуклеиновые кислоты осаждали 0,6–1 объемами изопропилового спирта, растворяли их в ТЕ-буфере [20], вносили 60 мкг/мл РНКазы А, инкубировали при 37 °С в течение 1 ч и депротеинизировали хлороформом. После центрифугирования к супернатанту добавляли последовательно ДСН и калий ацетат до конечных концентраций 1,0 % и 1,2 М соответственно и выдерживали при 0 °С в течение 30 мин. Затем дважды центрифугировали на микрофуге™ («Beckman», США) при 10 000 g. ДНК осаждали изопропанолом. Осадок ДНК промывали три раза 70%-ным этанолом и растворяли в ТЕ-буфере.

Для определения характера метилирования ДНК кормовой свеклы суммарные препараты ДНК, концентрация которых составляла 0,8–3,5 мкг/мкл, обрабатывали рестриктазами *MspI* («Fermentas», Литва) и *HpaII* («BioLabs», Англия). Каждую партию очищенной ДНК тестировали на присутствие ингибиторов ферментов рестрикции путем совместного гидролиза с ДНК бактериофага λ. Предварительно подбирали условия, достаточные для полного гидролиза ДНК каждой рестриктазой. На 1 мкг ДНК брали 4–10 единиц активности рестриктаз и инкубировали в течение 16 ч при 37 °С. Реакцию рестрикции останавливали замораживанием и/или инкубацией при 65 °С 5 мин.

Электрофорез гидролизованной ферментами рестрикции ДНК проводили в 0,8 %- и 2 %-ном агарозных гелях, содержащих 0,5 мкг/мл бромистого этидия в 1 × TBE при напряжении 3–4 В/см в течение 4–8 ч [20].

В работе использовали РНКазу А, протеиназу К, Polyclar AT, агарозу, бромистый этидий, трис, ЭДТА, β-меркаптоэтанол, ДСН, агар («Serva», Германия), ацетат К («Fluka»,

Швейцария), остальные реактивы отечественного производства.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Известно, что культивируемые *in vitro* каллусные ткани растений характеризуются высокой степенью гетерогенности даже в тех случаях, если они получены от одних и тех же донорных генотипов, эксплантов и в одинаковых условиях культивирования [21]. Нами из листового экспланта мужскостерильной формы 10–29 были получены два типа каллусов. Один из них образовывался на центральной жилке листа и представлял собой рыхлые глобулярные структуры светло-желтого цвета, легко разделяющиеся на отдельные фрагменты. Данный каллус в дальнейшем характеризовался нами как морфогенный, так как уже в первых пассажах наблюдалось образование вегетативных почек. Другой тип каллуса появлялся по краям листовой поверхности и состоял из достаточно рыхлых образований белого или светло-салатного цвета, который при дальнейшем пассировании на безгормональную среду приобретал светло-коричневую окраску. Из данного типа каллусов получена пассируемая культура. При последующем культивировании процессов морфогенеза у таких каллусов не наблюдалось, и он отнесен нами к неморфогенному типу.

Цитологический анализ первичного каллуса морфогенного типа показал, что основное число клеток (~90 %) имели диплоидный набор хромосом (табл. 1). Кроме них, отмечены

тетраплоидные и анеуплоидные клетки с околодиплоидным числом хромосом. Большинство клеток первичного каллуса, не обладающего способностью к регенерации, также были диплоидными. Вместе с тем выявлено статистически достоверное ( $t_d = 2,2$ ) отличие в количестве тетраплоидных клеток между каллусами разного типа. Таким образом, индуцированные каллусы были исходно гетерогенными по пloidности. Отличия в числе наборов хромосом можно объяснить происхождением первичного каллуса из клеток с различной степенью дифференцировки, находящихся в разных участках листа.

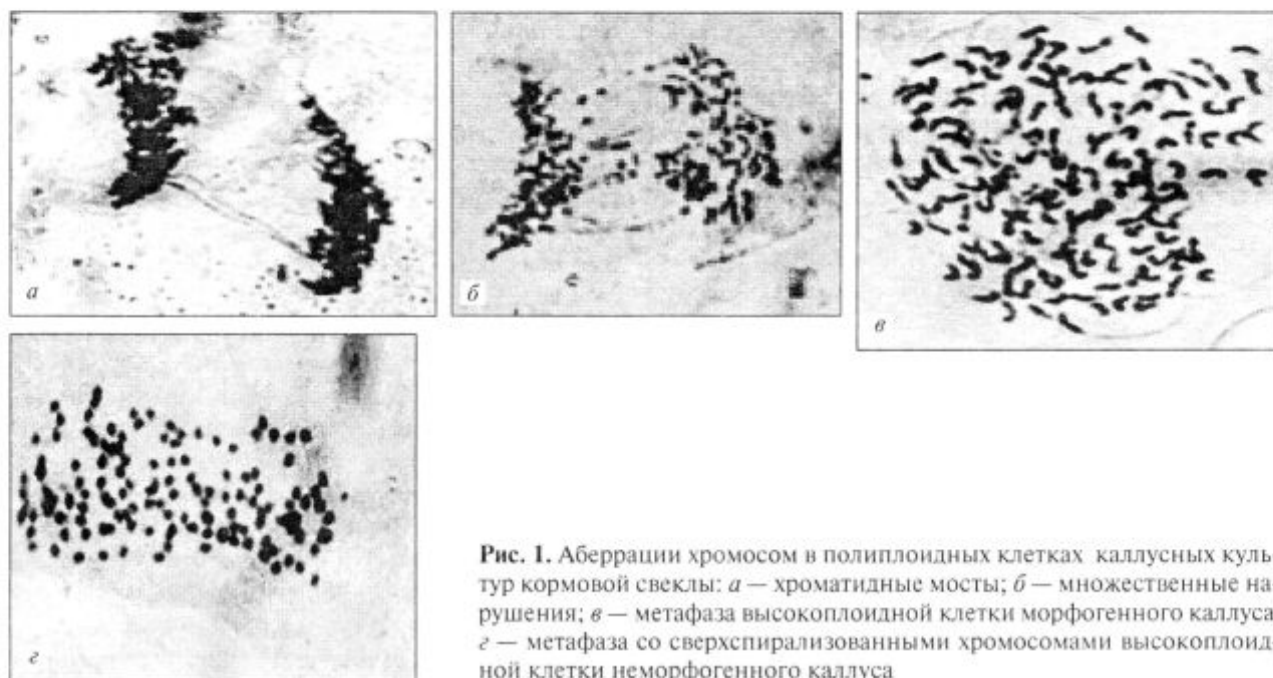
Анализ пloidности клеточных популяций первого пассажа, культивировавшихся на безгормональной среде, свидетельствует о значительной миксопloidности каллусных культур. В морфогенном каллусе наблюдается изменчивость числа хромосом от  $2x$  до  $6x$ , при наличии анеуплоидных клеток с околодиплоидным числом хромосом. У неморфогенного каллуса наряду с диплоидными клетками основную массу составляли полиплоидные клетки. Вместе с полиплоидизацией наблюдается тенденция к возрастанию количества анеуплоидных клеток, появление которых является результатом отставания части хромосом в анафазе митоза и их потери вследствие нарушения механизма клеточного деления.

В клеточных популяциях каллусов разного типа отмечены клетки с хромосомными абер-

Таблица 1  
Распределение по числу хромосом в клетках морфогенного и неморфогенного каллусов кормовой свеклы

Номер пассажа	Всего изучено метафаз, шт.	Количество клеток с числом хромосом, %					
		1x	2x	3x	4x	>4x	анеуплоидные
Морфогенный							
0	71	—	88,7 ± 3,8	—	8,5 ± 3,3*	—	2,8 ± 2,0
1	84	—	72,6 ± 4,9	—	14,3 ± 3,8	8,3 ± 3,0	4,8 ± 2,3
2	91	—	58,2 ± 5,2	3,3 ± 1,9	20,9 ± 4,3	11,0 ± 3,3	6,6 ± 2,6
Неморфогенный							
0	63	—	68,3 ± 5,9	—	22,2 ± 5,2*	6,3 ± 3,0	3,2 ± 2,2
1	78	—	32,0 ± 5,3	3,8 ± 2,2	32,0 ± 5,3	24,4 ± 4,9	7,8 ± 3,0
2	88	2,3 ± 1,6	23,9 ± 4,4	6,8 ± 2,7	25,0 ± 4,6	31,8 ± 4,9	10,2 ± 3,2

\* Разница между показателями достоверна при  $p \leq 0,05$ .



**Рис. 1.** Аберрации хромосом в полиплоидных клетках каллусных культур кормовой свеклы: *a* — хроматидные мосты; *b* — множественные нарушения; *v* — метафаза высокоплоидной клетки морфогенного каллуса; *z* — метафаза со сверхспирализованными хромосомами высокоплоидной клетки неморфогенного каллуса

рациями. В анафазах в основном полиплоидных клеток выявлены хроматидные и хромосомные мосты, фрагменты (рис. 1, *a*, *b*). Количество таких клеток у морфогенного каллуса было на уровне 3 %, в то время как у неморфогенного отмечено относительно большее их число (табл. 2).

Каллусные штаммы второго пассажа как морфогенного, так и неморфогенного типа харак-

теризовались значительной вариабельностью клеток по числу хромосом. У морфогенного каллуса спектр плоидности варьирует от 2х до 8х, у неморфогенного — от 1х до 12х. Уже во втором пассаже на культуральной среде (рис. 1, *v*), у неморфогенных каллусов в сравнении с клетками морфогенного каллуса отмечено появление высокоплоидных метафаз с сильно спирализованными хромосомами (рис. 1, *z*). Наряду с этим выявлены интерфазные ядра с конденсированным хроматином. Наличие в клеточных культурах таких явлений, как конденсация хроматина и сверхспирализация хромосом, по-видимому, свидетельствует о взаимосвязи этих явлений.

Следует отметить, что частота структурных перестроек хромосом во втором пассаже по сравнению с первым достоверно не изменялась и составляла около 4 % у морфогенного каллуса и соответственно 12,5 % у неморфогенного. Вместе с тем отличия между каллусами разного типа по числу хромосомных аберраций становятся статистически значимыми ( $t_d = 1,98$ ). Кроме того, у неморфогенного каллуса второго пассажа достоверно увеличивается ( $t_d = 2,3$ ) количество клеток с аберрациями хромосом в сравнении с клеточной культурой нулевого пассажа. Спектр аберра-

Таблица 2  
Частота хромосомных аберраций в морфогенных и неморфогенных каллусных культурах кормовой свеклы

Номер пассажа	Количество, шт.		Частота, %
	изученных анафаз	анафаз с аберрациями	
Морфогенный			
0	59	—	—
1	71	2	2,8 ± 2,0
2	78	3	3,8 ± 2,1*
Неморфогенный			
0	77	2	2,6 ± 1,8
1	65	7	10,8 ± 3,8
2	72	9	12,5 ± 3,9*

\* Разница между показателями достоверна при  $p \leq 0,05$ .



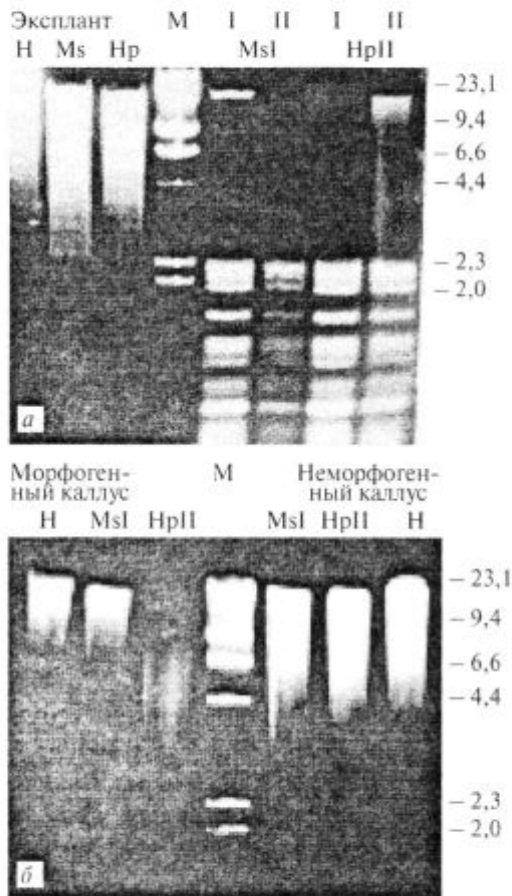


Рис. 2. Электрофореграмма в 0,8%-ном агарозном геле продуктов гидролиза ДНК листового экспланта (а), морфогенного и неморфогенного каллуса (б) кормовой свеклы ферментами рестрикции *MspI* (*Ms*) и *HpaII* (*Hp*): Н — нативная ДНК; I — ДНК бактериофага λ; II — ДНК бактериофага λ в присутствии ДНК листового экспланта; М — маркер молекулярных масс — ДНК бактериофага λ, гидролизованная *HindIII*. На каждую дорожку геля количество вносимой ДНК листового экспланта и неморфогенного каллуса составляло 4,5 мкг, морфогенного каллуса — 3 мкг

ций хромосом был одинаковым у разных типов каллусов. У неморфогенного типа в полиплоидных клетках выявлялись в основном одиночные мосты, которые составляли более 70 % перестроек.

В целом, уже на первых пассажах культивирования установлены существенные отличия как по хромосомному составу клеточных популяций, так и по частоте aberrаций хромосом между клеточными культурами разного типа. В сравнении с морфогенным каллусом у неморфогенного и степень полиплоидизации, и

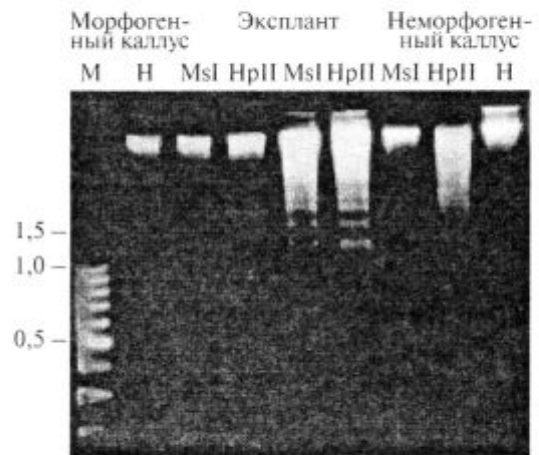


Рис. 3. Электрофореграмма в 2%-ном агарозном геле продуктов гидролиза ДНК листового экспланта, морфогенного и неморфогенного каллуса кормовой свеклы ферментами рестрикции *MspI* (*Ms*) и *HpaII* (*Hp*): Н — нативная ДНК морфогенного каллуса; М — маркер молекулярных масс — 100bp DNA Ladder («Promega», США). На каждую дорожку геля количество вносимой ДНК морфогенного и неморфогенного каллуса составляло 2,5 мкг, листового экспланта — 4 мкг

частота структурных перестроек хромосом значительно выше.

Поскольку при изменении структурно-функционального состояния хромосом значительная роль отводится ферментативной модификации генома [4, 11], был проведен сравнительный анализ уровней метилирования цитозина в ДНК у морфогенного и неморфогенного каллусов кормовой свеклы на ранних этапах их культивирования. Для этого использовали пару изоизомеров — рестриктазы *MspI* и *HpaII*, которые узнают один и тот же CpCpGpG-сайт, но по-разному его гидролизуют при наличии метильных групп в остатках цитозина. *HpaII* не расщепляет ДНК, если хотя бы одно из этих оснований метилировано в обеих полинуклеотидных цепочках, но гидролизует полуметилированные нити ДНК, тогда как *MspI* не расщепляет ДНК, если метилирован только внешний остаток цитозина [22].

Выделение ДНК каллусных тканей кормовой свеклы осложнено присутствием в них фенольных соединений, углеводов и активных полифенолоксидаз. Модифицированным нами методом Деллапорта [17] получены высокомолекулярные препараты ДНК первичного экспланта и каллусов удовлетворительной чистоты.

ты. Спектральные показатели (отношение оптических плотностей при  $\lambda_{260}$  нм к  $\lambda_{230}$  и  $\lambda_{280}$ ) составляли 2,1–2,3 и 1,8–1,9 соответственно. Тем не менее каждую партию очищенной ДНК тестировали на наличие ингибиторов ферментов рестрикции путем совместного гидролиза с ДНК бактериофага  $\lambda$ , которая образует типичные для применяемых рестриктаз продукты расщепления (рис. 2, а). В качестве стандарта использовали нативные ДНК кормовой свеклы, которые инкубировались в одних и тех же условиях с ферментами рестрикции ДНК.

На рис. 2, а и 3 представлены электрофореграммы продуктов расщепления суммарной ДНК первичного экспланта — листовой пластинки растений кормовой свеклы, выращенных в условиях *in vitro*. Рестриктазы *MspI* и *HpaII* эффективно гидролизуют ДНК экспланта кормовой свеклы на большое количество фрагментов широкого диапазона молекулярных масс, причем в области ниже 4 000 пар нуклеотидов (п.н.) отчетливо видны фрагменты ДНК различного размера. Это указывает на присутствие ряда регулярно расположенных неметилированных остатков цитозина в СрСрGrG-сайтах вдоль полинуклеотидных последовательностей ДНК. Следует подчеркнуть, что электрофоретические подвижности фрагментов ДНК, образованные в результате гидролиза нативной ДНК рестриктазами *MspI* и *HpaII*, в целом не отличались. Поэтому в ДНК первичного экспланта осуществляется интенсивное гипометилирование как внешних, так и внутренних остатков цитозина в многократно повторяющихся СрСрGrG-последовательностях.

Из рис. 2, б и 3 видно, что продукты гидролиза ДНК морфогенного каллуса используемой пары изошизомеров имеют различные электрофоретические подвижности в 0,8- и 2,0%-ных агарозных гелях. *HpaII* интенсивно гидролизует ДНК, в результате чего образуется непрерывный спектр фрагментов, тогда как *MspI* в значительно меньшей степени рестриктирует ДНК. Различия профилей расщепления ДНК морфогенного каллуса могут быть следствием метилирования внешнего остатка цитозина СрСрGrG-мотивов только в одной из полинуклеотидных цепочек ДНК. Можно пред-

положить, что образование полуметилированных последовательностей морфогенного каллуса является результатом или их недометилирования при репликации ДНК, которая в первичном каллусе была ферментативно модифицирована в обеих цепочках, или, наоборот, их метилирования *de novo*. Появление полуметилированных мотивов ДНК отмечено также в культуре *in vitro* яблони [5].

Между электрофоретическими подвижностями нативной ДНК неморфогенного каллуса и продуктами ее гидролиза рестриктазами *MspI* и *HpaII* наблюдаются незначительные различия (рис. 2, б и 3). Вследствие этого СрСрGrG-последовательности практически полностью ферментативно модифицированы, т.е. уровень метилирования этих сайтов существенно превышает аналогичный показатель не только экспланта, но и морфогенного каллуса.

Повышение количества ферментативно модифицированных остатков цитозина в СрСрGrG-последовательностях ДНК в процессе культивирования каллуса свидетельствует об их метилировании *de novo*. Механизмы как гипер-, так и гипометилирования симметричных и асимметричных мотивов ДНК эукариот на сегодняшний день не известны. Однако переменность ферментативной модификации ДНК является неотъемлемым свойством процесса морфогенеза *in vivo* и *in vitro*, причем для растений наблюдается тенденция к повышению уровня метилирования в меристематических тканях и первичных каллусах [11, 17, 23].

Тот факт, что при пассировании неморфогенного каллуса, где уровень геномной нестабильности выше по сравнению с морфогенным каллусом, происходит практически полное метилирование сайт-специфических последовательностей ДНК, свидетельствует о том, что эта ферментативная модификация цитозина является одним из факторов, принимающих участие в образовании структурных изменений хромосом. Взаимосвязь этих явлений установлена для клеток животных, где показано участие метилирования в образовании неактивного хроматина посредством деацетилазного косупрессорного комплекса [24, 25]. Особо следует обратить внимание на появление в высокоплоидных клетках неморфогенного каллуса сверхспирализованных хромосом и кон-

денсированного хроматина, что не характерно для клеток морфогенного каллуса. Роль метилирования в этих процессах, возможно, обусловлена его способностью изменять В-форму ДНК в Z-форму [26].

Кроме того, 5-метилцитозин может превращаться в тимидин и приводить к ряду мутационных эффектов. По интегральному показателю — изменению уровня метилирования многократно повторяющихся специфических последовательностей ДНК — трудно оценить вклад эпигенетических и мутационных эффектов этой модификации генома. По-видимому, оба этих фактора участвуют в генетически детерминированных процессах морфогенеза *in vitro*, и немаловажная роль при этом отводится определенному уровню метилирования.

Таким образом, на фоне повышенного уровня геномной изменчивости особенностью неморфогенного каллуса является образование сверхспирализованных хромосом и конденсированного хроматина в высокоплоидных клетках, что сопровождается повышением уровня метилирования генома. Это предполагает участие ферментативной модификации цитозина в конформационных модуляциях ДНК при реализации генетических программ органогенеза *in vitro*.

**SUMMARY.** Cytogenetic characters and the level of DNA methylation were studied in sugarbeet callus cultures with different morphogenic potential which were obtained from the same leaf explant. It was shown that non-morphogenic callus in comparison with the morphogenic one was characterized by the higher level of cell ploidy and of the frequency of chromosome structural rearrangements even at the early stages of cultivation. Overspiralization of chromosomes and formation of condensed chromatin were observed in polyploid cells of non-morphogenic callus. At the same time cytosine hypermethylation occurs in site-specific CpCpGpG-sequences of DNA indicating the possible role of this DNA modification in the processes of genome rearrangements.

**РЕЗЮМЕ.** Досліджували цитологічні особливості та рівень метилювання ДНК калусних культур кормових буряків з різною здатністю до морфогенезу, отриманих від одного листового експланта. Показано, що для неморфогенного калуса в порівнянні з морфогенним характерний більш високий рівень плоїдності клітин та частоти структурних перебудов хромосом вже на перших етапах культивування. Поряд з цим у поліплоїдних клітинах неморфогенного калуса спостерігається надспіралізація хромосом та утворення

конденсованого хроматину. Паралельно цьому здійснюється гіперметилювання цитозину в сайт-специфічних CpCpGpG-мотивах ДНК, в зв'язку з чим передбачається участь цієї модифікації ДНК у процесах перетворення генома.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кордюм Е.Л., Недуха Е.М., Сидоренко П.Г. Структурно-функциональная характеристика растительной клетки в процессе дифференцировки и дедифференцировки. — К.: Наук. думка, 1980. — 116 с.
2. D'Amato F. Spontaneous mutations and somaclonal variation // Nucl. Techn. And in vitro Cult.Plant Improv.: Proc. Int. Symp. (Vienna, 19-23 Aug., 1985). — Vienna, 1986. — P. 3-10.
3. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 6. Изменчивость и отбор в процессе адаптации к условиям выращивания *in vitro* // Биополимеры и клетка. — 2000. — 16, № 3. — С. 159-185.
4. Phillips R.L., Kaepler S.M., Olhoft P. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1994. — 91. — P. 5222-5226.
5. Xiangqian Li, Mingliang Xu, Schuyler S., Korban D. DNA methylation profiles differ between field- and in vitro-grown leaves of apple // J. Plant Physiol. — 2002. — 159. — P. 1229-1234.
6. Quiroz-Figueroa F., Mendez-Zeel M., Sanchez-Teyer F., Rojas-Herrera R., Loyola-Vargas V. Differential gene expression in embryogenic and non-embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea arabica* // J. Plant Physiol. — 2002. — 159. — P. 1267-1270.
7. Orton T.J. Genetic variation: theoretical and practical consideration // Gene Manipul. Plant Improv.: 16<sup>th</sup> Stadler Genet. Symp. — New York; London, 1984. — P. 427-468.
8. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 4. Изменчивость в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* // Биополимеры и клетка. — 1998. — 14, № 4. — С. 298-319.
9. Gonsales A.I., Pelaez M.I., Ruiz M.L. Cytogenetic variation in somatic tissue cultures and regenerated plants of barley // Euphytica. — 1996. — 91, № 1. — P. 37-43.
10. Mukherjee A., Debata B.K., Naskar S.K. Cytology of callus and regenerated plants of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) // Cytobios. — 1998. — 96, № 382. — С. 109-118.
11. 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.
12. Тищенко Е.Н., Куниевич В.И. Метилирование ДНК и экспрессия генов растений // Физиология и биохимия культур. растений. — 2002. — 34, № 3. — С. 213-226.
13. Kaepler S.M., Phillips R.L. Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1993. — 90. — P. 8773-8776.

14. Хвылева И.Д., Рыжик М.В., Ананьев Е.В., Гапоненко А.К., Исаков А.Р., Созинов А.А. Деметилирование рДНК в каллусной ткани ячменя, культивируемой in vitro // Докл. АН СССР. — 1986. — **290**, № 5. — С. 1249–1251.
15. Lo Schiavo F., Pitto L., Giuliano G., Torti G. Nuri-Ronchi V., Marazziti D., Vergana R., Orselli S., Terzi M. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs // Theor. Appl. Genet. — 1989. — **77**, № 3. — P. 5–331.
16. Morrish F.M., Vasil I.K. DNA methylation and embryogenic competence in leaf and callus of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) // Plant Physiol. — 1989. — **90**, № 1. — P. 37–40.
17. Тищенко Е.Н., Корж Л.П. Гипометилирование ДНК побегов подсолнечника // Биополимеры и клетка. — 2001. — **17**, № 2. — С. 140–146.
18. Doley W.P., Sawnders G.W. Hormone — free medium will support callus production and subsequent shoot regeneration from whole leaf explants in some sugar beet (*Beta vulgaris* L.) population // Plant Cell Rep. — 1989. — **8**, № 4. — P. 222–225.
19. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1980. — С. 168–170.
20. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
21. Кучеренко Л.А. Морфологическая разнокачественность каллусных тканей риса и ее связь с регенерационной способностью // Физиология растений. — 1993. — **40**, № 5 — С. 797–801.
22. McClelland M., Nelson M., Rascheke E. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases // Nucl. Acids Res. — 1994. — **22**, № 17. — P. 3640–3659.
23. Zluvova J., Janousek B., Vyskot B. Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development // J. Exp. Bot. — 2001. — **52**, № 365. — P. 2265–2273.
24. Ng H.-H., Bird A. DNA methylation and chromatin modification // Curr. Opin. Genetic & Development. — 1999. — **9**. — P. 158–163.
25. Houchins K., O'Dell M., Flavell R.B., Custavson J.P. Cytosine methylation and nucleolar dominance in cereal hybrids // Mol. Gen. Genet. — 1997. — **225**. — P. 294–301.
26. Льюин Б. Гены. — М.: Мир, 1987. — 465 с.

Поступила 30.05.03