ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2014, № 6, с. 565–572

ГЕНЕТИКА

УДК 575.2.084+581.1

УРОВЕНЬ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ КЛЕТОК В ДЛИТЕЛЬНО КУЛЬТИВИРУЕМОЙ СУСПЕНЗИИ *Arabidopsis thaliana*

© 2014 г. К. А. Седов, А. А. Фоменков, А. И. Соловьева, А. В. Носов, Ю. И. Долгих

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,
127276 Москва, ул. Ботаническая, 35
E-mail: gsc@ippras.ru

Поступила в редакцию 15.01.2014 г.

Определены уровни гетерогенности и генетической изменчивости клеток в суспензии *Arabidopsis thaliana*, культивируемой *in vitro* более 7 лет. Показана значительная гетерогенность суспензии по размеру клеток. С помощью цитофотометрического анализа количества ядерной ДНК выявлена миксоплоидность суспензионной культуры. С использованием ДНК-маркеров (шести RAPD- и четырех ISSR-праймеров и их внутригрупповых комбинаций) показана низкая степень вариабельности ДНК. Генетические отличия полученных из суспензионной культуры клонов от растения инбредной линии Col-0 составили 1.5%. Различия между клонами были выявлены только с одной парой праймеров (M3+M7). Отмечено, что вариации количества ДНК в клетках суспензионной культуры не сопровождаются существенными изменениями последовательности ДНК.

DOI: 10.7868/S0002332914060101

Arabidopsis thaliana – модельное растение, широко используемое для проведения генетических и молекулярно-биологических исследований. Во многих работах, особенно при получении трансгенных растений, применяется культура изолированных тканей *A. thaliana*. Известно, что культивирование *in vitro* индуцирует генетическую изменчивость, и растения, регенерированные из культивируемых клеток, нередко отличаются от исходных форм. Показано, что среди растений-регенерантов *A. thaliana* встречаются формы с изменениями морфологических признаков или сроков цветения (Jiang *et al.*, 2011), летальными и “хлорофильными” мутациями (Gaj, Maluszynska, 1987). Было показано, что введение в культуру тканей пыльников сопровождалось появлением полиплоидных и анеуплоидных каллусных клеток, среди регенерированных растений также встречались формы с измененным числом хромосом (Keathley, Scholl, 1983). Частота хромосомных вариаций в разных работах существенно изменяется. Например, в исследовании, проведенном Сангван с соавт., 95% полученных регенерантов *A. thaliana* были диплоидными и не имели морфологических аномалий (Sangwan *et al.*, 1992). В то же время Фрас и Малусзинска (Fras, Maluszynska, 2003) обнаружили высокую скорость полиплоидизации клеток после введения в культуру. Изменение числа хромосом проявилось и у части полученных из каллуса растений: ~25% регенерантов были три- и тетраплоидными, хотя исходные растения были диплоидными.

Определение уровня генетической изменчивости растений с помощью молекулярных методов дает возможность выявить изменения последовательности ДНК независимо от их фенотипического проявления. В ряде случаев такая оценка более информативна, чем результаты кариологических или фенотипических анализов. С помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с разными видами праймеров проанализирована изменчивость культивируемых тканей многих видов растений (Гостимский и др., 2005). Простой и информативный метод – анализ с помощью ПЦР с использованием RAPD-праймеров. К его достоинствам можно отнести небольшое количество ДНК для анализа, а также отсутствие необходимости сбора сведений о последовательности генома изучаемых клеток для создания праймеров. Не менее информативен ISSR-метод, основанный на амплификации участков ДНК, примыкающих к микросателлитным последовательностям, благодаря тому что микросателлиты широко распространены по всему геному. RAPD- и ISSR-маркеры были с успехом использованы для оценки генетического полиморфизма у многих видов растений (Soneli *et al.*, 2002; Bairu *et al.*, 2011).

Данные об изменчивости ДНК-маркеров в культурах клеток *A. thaliana* практически отсутствуют. Результаты анализа растений, регенерированных из культивируемых тканей, немногочисленны и довольно противоречивы (Polanco, Ruiz, 2002; Labra *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2011). Во всех случаях анализировали растения, получен-

Праймеры, использованные для RAPD- и ISSR-анализа

Праймер	Последовательность нуклеотидов (5'-3')	Температура отжига, °C
	RAPD-праймеры	
474	AGG-CGG-GAA-C	36
481	ACA-GGT-GCG-T	36
S97	ACG-ACC-GAC-A	34
S2055	CCA-GAC-TCC-A	32
S2056	CTG-GTG-CTC-A	32
QR-2	CGG-CCA-CTG-T	36
	ISSR-праймеры	
M3	$(AG)_8TA$	52
M4	$(AC)_9T$	56
M7	$(GA)_8CAG$	56
A4	$(ATG)_5$	56

ные из каллуса после кратковременного культивирования. Влияние на геном *A. thaliana* длительного пребывания в условиях *in vitro* до сих пор не исследовано.

Цель работы – определение уровня генетической изменчивости в культуре изолированных клеток *A. thaliana*, длительно поддерживаемых в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования была суспензионная культура *A. thaliana* (L.) Heynh. (экотип Columbia, инбредная линия Col-0), полученная из каллусной ткани, сформированной на эксплантах полностью развернувшихся розеточных листьев. Суспензионная культура клеток поддерживается *in vitro* более 7 лет на среде Шенка–Хильдебрандта (Shenk, Hildebrandt, 1972) с 1 мг/л 2,4-Д и 0.1 мг/л кинетина при 26°C в темноте на горизонтальном шейкере (110 об./мин). Суспензию субкультивировали каждые 10 сут, перенося 4-миллилитровый инокулят клеток в 50 мл свежей среды. Индекс роста по числу клеток составлял 15–18.

Размеры клеток суспензионной культуры определяли по диаметру протопластов, которые выделяли методом, описанным ранее (Носов и др., 2012). Анализировали 3000 протопластов.

Цитофотометрический анализ количества ядерной ДНК проводили на давленных постоянных препаратах, после окрашивания их методом Фельгена, с некоторыми изменениями классической методики. Препараты анализировали на микроскопе с цитофотометром Univar (Reichert-Jung, Австрия) двухволновым методом (Zoriniants *et al.*, 2003). Было проанализировано >3000 протопластов и >300 ядер.

Для расчета плоидности ядер клеток суспензионной культуры по количеству ДНК использовали стандарт – профазные (4*C*) ядра клеток апикальной меристемы корня *Vigna radiata* cv. Berkin, содержащие ~2.1 пг ДНК, а также данные о количестве ДНК в диплоидных ядрах клеток *A. thaliana* (2*C* = 0.32–0.4 пг), представленные в базе данных Kew Botanical garden (www.kew.org.uk/cvalues). За 1*C* принимали количество ДНК в нереплицированном гаплоидном наборе хромосом.

Для анализа генетической гетерогенности клеток из суспензии были выделены отдельные клоны. Для их получения использовали метод высева клеток на агаризованную питательную среду. Клетки распределяли по поверхности среды тонким слоем с помощью шпателя. Чашки Петри инкубировали при 26°C. Через 4 нед пересаживали на свежую питательную среду колонии диаметром >3 мм. Дальнейший учет и пересадку каждой колонии проводили отдельно.

ДНК выделяли по методике CTAB, описанной ранее (Moller *et al.*, 1992), из 100 мг каллусной ткани и листьев. Концентрацию ДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США). Целостность ДНК оценивали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле.

Синтез олигонуклеотидных RAPD- и ISSR-праймеров осуществляли в НПФ “Литех” (Россия). Были использованы шесть RAPD- и четыре ISSR-праймеров, а также их внутригрупповые комбинации. Ориентировочную температуру отжига для каждого праймера определяли по формуле

$$t = 4(G + C) + 2(A + T),$$

где t, °C – температура отжига; G, C, A, T – соответственно числа оснований гуанина, цитозина, аденина и тимина в последовательности праймера. Для комбинации праймеров рассчитывали среднее значение температуры.

Сочетание RAPD- и ISSR-праймеров в одной реакции не применяли, так как данные виды праймеров сильно отличаются по температуре отжига. Праймеры, с помощью которых проводили анализ генетической изменчивости, представлены в таблице.

Реакционная смесь для амплификации ДНК объемом 25 мкл содержала 70 мМ Tris-HCl (pH 8.6), 16.6 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 2.5 мМ $MgCl_2$, 0.0125% Cresol Red, 6.25% глицерина, 0.2 мМ каждого dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 0.25 мМ праймера, 2 ед. Taq-полимеразы (НПАО “Силекс М”, Россия), 40 нг ДНК. Для предотвращения изменения концентрации компонентов из-за образования

конденсата на реакционную смесь наслаивали 20 мкл минерального масла.

Амплификацию проводили в программируемом термоциклере MC2 (ЗАО "ДНК-технология", Россия) по следующей программе: денатурация 94°C/2 мин; 5 циклов: денатурация 94°C/20 с, отжиг *t*/10 с, элонгация 72°C/10 с; 35 циклов: денатурация 94°C/5 с, отжиг *t*/5 с, элонгация 72°C/5 сек; 1 цикл: элонгация 2 мин (*t* – температура отжига для RAPD- (32–36°C) и ISSR-праймеров (52–56°C)). Для уменьшения образования неспецифических продуктов амплификации применяли технологию "горячего старта" (Bassam, Caetano-Anolles, 1993).

Продукты реакции (15 мкл из реакционной смеси) разделяли электрофорезом в 2%-ном агарозном геле в трис-боратном буфере с последующим окрашиванием бромистым этидием. Для определения длины фрагментов использовали маркер M26 (100 bp DNA Ladder, НПО СибЭнзим, Россия). Анализ повторяли дважды, а с праймерами, показавшими полиморфизм амплифицированных фрагментов ДНК, – 5 раз.

Для определения уровня генетической изменчивости сравнивали спектры ампликонов исходных растений и полученных из суспензии клонов. Генетическое расстояние (Gd) рассчитывали по формуле (Nei, Li, 1979)

$$\mathrm{Gd} = 1 - 2N_{xy}/(N_x + \mathrm{N}_y),$$

где N_x – число зон, имеющихся в спектре исходных растений, но отсутствующих в спектре клеток суспензии; N_y – число зон в спектре клеток суспензии, но не в спектре исходных растений; N_{xy} – число зон, общих для обоих спектров.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Измерение диаметров протопластов, выделенных из суспензионной культуры клеток в логарифмической фазе субкультивирования, позволило оценить неоднородность популяции клеток по размерам. Как видно на рис. 1а, диаметры протопластов варьируют более чем в 3 раза, при этом >80% из них составляют от 17 до 29 мкм.

Распределение клеток суспензии по количеству ядерной ДНК, представленное на рис. 1б, демонстрирует, что культура Col-0 миксоплоидна. Количество ДНК в ядрах более чем 80% клеток варьировало от 4*C* до 16*C*, с небольшой долей промежуточных значений, относящихся к клеткам, находящимся в S-фазе клеточного цикла.

RAPD- и ISSR-анализ проводили с использованием праймеров, для которых согласно литературным данным показана высокая информативность при анализе генома *A. thaliana* (He *et al.*, 2007). Согласно результатам исследования все использованные праймеры и их комбинации обеспечивали синтез фрагментов ДНК. В зависимости от праймера(ов) число амплифицируемых фрагментов колебалось от 2 до 11, а их размеры варьировали от 200 до 2000 п. н.

Для изучения влияния длительного культивирования клеток *A. thaliana* на стабильность генома было проанализировано 10 клонов, полученных из суспензии клеток. При проведении ПЦР-анализа с одиночными RAPD- и ISSR-праймерами не было обнаружено различий между геномами анализирумых клонов и геномом растений Col-0. Использование попарных комбинаций праймеров, обеспечившее увеличение численности ампликонов до 195, позволило найти изменения в спектрах фрагментов, полученных с четырьмя парами праймеров. С парами праймеров 481 + QR-2, S2055 + S2056 и QR-2 + S97 в ДНК всех клонов было зарегистрировано появление по одному новому фрагменту, отсутствующему в пробах растительной ДНК (рис. 2). Полиморфные фрагменты относились к диапазону 400–700 п. н. С комбинацией праймеров M3 + M7 в ДНК клонов было обнаружено появление трех новых фрагментов, при этом два из них размерами ~500 и 1000 п. н. присутствовали во всех пробах, а третий ампликон размером <300 п. н. появился только у семи клонов. В ДНК трех клонов, как и в ДНК растений, данный фрагмент отсутствовал (рис. 3). В целом степень различия между суспензионными клонами и растениями *A. thaliana* оказалась очень низкой (1.5%). По-видимому, длительное культивирование клеток *in vitro* не вызвало больших изменений в геноме.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что культивирование тканей растений *in vitro* вызывает повышение уровня генетической изменчивости. Однако количественные данные существенно различаются у разных авторов, что может быть связано как с условиями постановки экспериментов, так и с видовыми особенностями использованных в работах растений. Например, среди сомаклонов сахарного тростника, отобранных по признаку устойчивости к насекомым-вредителям, ~4% линий имели отличия от контрольных растений (Arencibia *et al.*, 1999). Гудвин с соавт. (Godwin *et al.*, 1997) с помощью RAPD-анализа сомаклонов риса показали, что все регенеранты, как обладающие, так и не обладающие фенотипическими отличиями от исходных растений, имели полиморфные фрагменты в спектрах продуктов амплификации. Очень высокая степень полиморфизма (55–99%) была описана ранее для каллусных клонов томата (Bogani *et al.*, 1996). У сомаклонов гороха уровень полиморфизма ДНК-маркеров составлял от 23 до 38% (Кокаева и др., 1997). Менее значительная степень различия была выявлена между клеточными

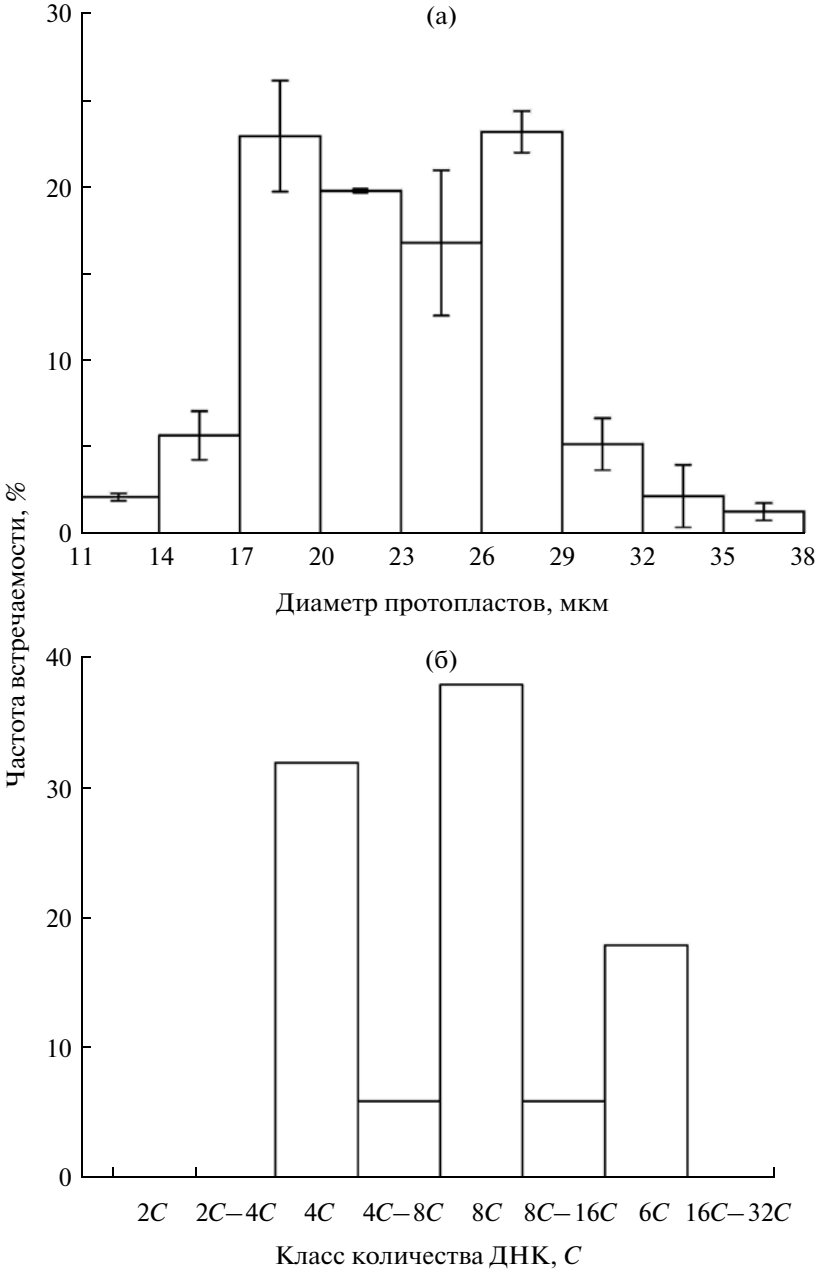

Рис. 1. Диаметры протопластов культивируемых клеток *A. thaliana* (а) и распределение ядер по количеству ДНК (б).

линиями женьшеня (10.2%) (Козыренко и др., 2001) и между растениями сахарного тростника, регенерированными из эмбриогенного каллуса (Taylor *et al.*, 1995). Доля полиморфных фрагментов у сомаклонов кукурузы варьировала от 6.5 до 23% (Осипова и др., 2003).

Исследуемая нами суспензионная культура клеток *A. thaliana* уже достаточно длительное время культивируется *in vitro*. За это время, возможно, было экспоненциальное распространение того или иного изменения в геноме. Клетки суспензионной культуры *A. thaliana* характеризуются гетерогенностью размеров. Следует отметить, что анализировались клетки на разных стадиях клеточного цикла – клетки, закончившие постмитотический рост и, например, только что образовавшиеся в результате цитокинеза. Вполне обоснованно и предположение о том, что размер клеток *A. thaliana in vitro* частично определяется и количеством ДНК в ядре, поскольку существует зависимость между количеством ядерной ДНК и размером клеток (Kondorosi *et al.*, 2000; Sugimoto-Shirasu, Roberts, 2003).

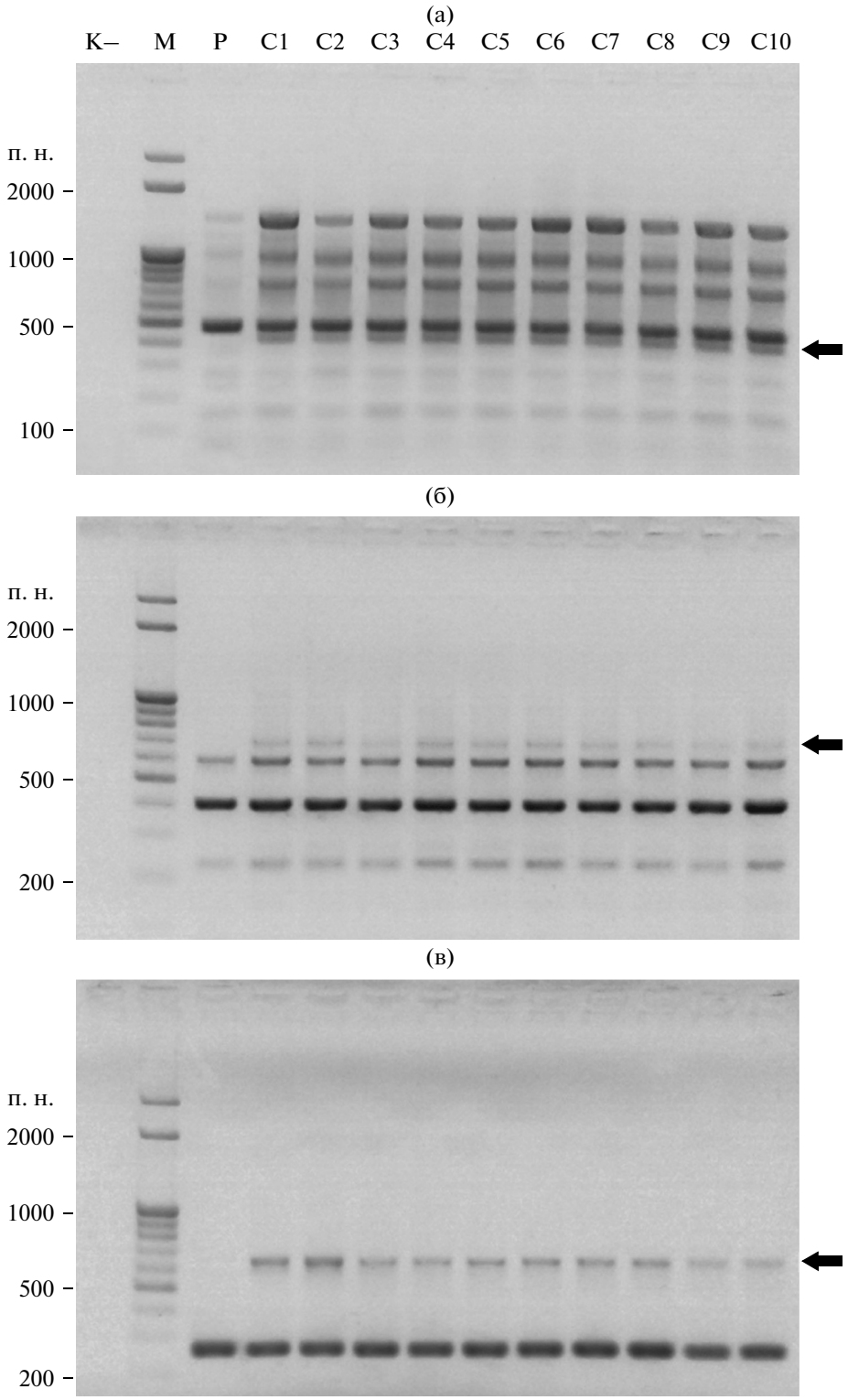

Рис. 2. RAPD-профили ДНК растения линии Col-0 (Р) и суспензионных клонов (С1–С10) *A. thaliana*, полученные с комбинацией праймеров 481 + QR-2 (а), S2055 + S2056 (б) и QR-2 + S97 (в). К– – отрицательный контроль, М – маркер молекулярной массы. Стрелки – полиморфные фрагменты, для рис. 2–3.

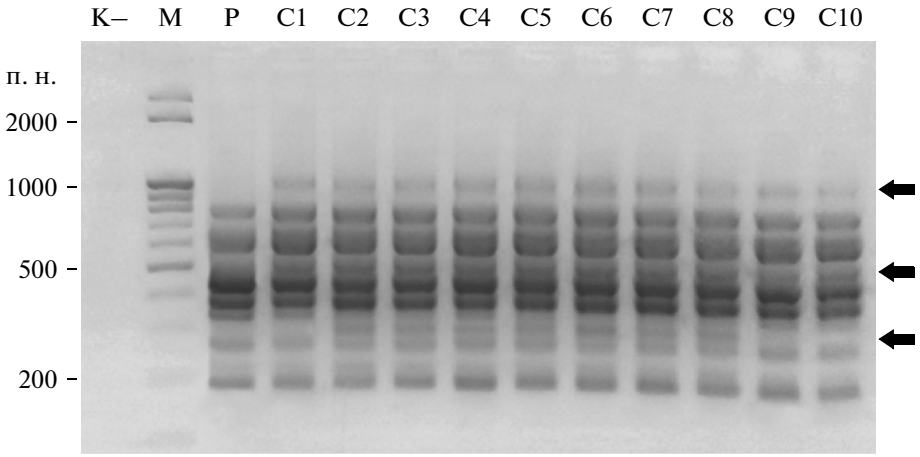

Рис. 3. ISSR-профили ДНК растения линии Col-0 и суспензионных клонов *A. thaliana*, полученные с комбинацией праймеров M3 + M7.

Миксоплоидия (эндополиплоидия), т.е. присутствие в одной ткани клеток с разным содержанием ДНК, – широко распространенное явление (Barow, Meister, 2003). Так, например, популяция клеток эпидермы листа растений *A. thaliana* миксоплоидна (Melaragno *et al.*, 1993) и содержит ядра с количеством ДНК от 2*C* до 16*C*. Для культивируемых *in vitro* клеток миксоплоидия также широко распространенное явление, которое может определяться как специфическими условиями культивирования (компоненты питательной среды, температура и др.), так и плоидностью исходного эксплантa. Вклад того или иного фактора трудно прогнозировать. В полученной нами культуре Col-0 наблюдали в значительном количестве клетки с 4*C*, 8*C* и 16*C*. Сказывается ли такое дублирование генома на его генетической изменчивости?

Уровень генетической изменчивости, обнаруженный нами в суспензионной культуре *A. thaliana*, был существенно ниже, чем в приведенных выше примерах для культивируемых клеток других видов растений. Вероятно, генетическая стабильность *in vitro* характерна для клеток *Arabidopsis*, имеющих маленький геном с небольшой долей повторяющихся участков. В пользу этого предположения свидетельствует низкая частота изменчивости, показанная для регенерантов *Arabidopsis* в работе Джян с соавт.: частота мутаций на локус варьировала у разных регенерантов от 4.2×10^{-7} до 24.2×10^{-7} (Jiang *et al.*, 2011). В другой работе частота полиморфных ампликонов при использовании AFLP- и RAMP-анализов ДНК-регенерантов *A. thaliana* составила 6% (Labra *et al.*, 2004). Большая разница была показана между уровнем изменчивости ДНК-маркеров у растений, регенерированных из независимо полученных каллусных линий *Arabidopsis*. Доля полиморфных фрагментов изменялась от 0.15 до 5.2% (Polanco, Ruiz, 2002).

Степень генетической изменчивости культивируемых клеток растений зависит от продолжительности культивирования *in vitro*. Молодым культурам в первые месяцы культивирования свойственно возрастание гетерогенности (Armstrong, Phillips, 1988; Fras, Maluszynska, 2003). Для длительно культивируемых клеток, как правило, характерна стабилизация генома с поддержанием определенного уровня плоидности и замедлением темпа мутирования (Cote *et al.*, 2001; Кузнецова и др., 2006). У *A. thaliana* влияние длительного культивирования в условиях *in vitro* на стабильность генома ранее практически не было изучено.

Наше исследование показало, что большинство различий между спектрами ампликонов ДНК, выделенной из клеток суспензионной культуры и из растения линии Col-0, проявилось у всех десяти проверенных клонов. Можно предположить, что данные изменения возникли в начале культивирования, затем клетки, несущие эти мутации, размножились и стали доминирующими в популяции. На генетическую изменчивость, возникающую на более поздних этапах культивирования суспензии, могли бы указывать различия между клонами. Однако из 31 проверенной комбинации праймеров только одна (M3 + M7) позволила обнаружить фрагмент ДНК, присутствующий в спектре ампликонов одних клонов и не выявленный у других. Низкая степень гетерогенности суспензии по маркерам ДНК косвенно свидетельствует о замедлении мутационного процесса на более поздних этапах культивирования.

Таким образом, для клеток длительно культивируемой суспензии *A. thaliana* характерны значительные вариации по количеству ядерной ДНК и относительно низкий уровень изменчивости последовательности ДНК генома.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты 13-04-00950 и 14-04-00333).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гостимский С.А., Кокаева З.Г., Коновалов Ф.А. Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров // Генетика. 2005. Т. 41. № 4. С. 480–492.

Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Лауве Л.С. и др. Генетическая изменчивость каллусных линий женьшеня *Panax ginseng* // Биотехнология. 2001. № 1. С. 19–26.

Кокаева З.Г., Боброва В.К., Вальехо-Роман К.М. и др. RAPD-анализ сомаклональной и межсортовой изменчивости гороха // Докл. РАН. 1997. Т. 355. С. 134–136.

Кузнецова О.И., Аш О.А., Гостимский С.А. Изучение влияния продолжительности культивирования каллусов на накопление генетических изменений у регенерантов гороха (*Pisum sativum* L.) // Генетика. 2006. Т. 42. № 5. С. 684–692.

Носов А.В., Шевырёва Т.А., Трофимова М.С. и др. Протопласты клеток растений как объект для физиологических, биохимических, молекулярных и генетических исследований // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. Кузнецова Вл.В., Кузнецова В.В., Романова Г.А. М.: БИНОМ; Лаборатория знаний, 2012. С. 403–423.

Осипова Е.С., Ковеза О.В., Троицкий А.В. и др. Выявление специфических RAPD- и ISSR-фрагментов у сомаклонов кукурузы (*Zea mays* L.) и создание на их основе SCAR-маркеров // Генетика. 2003. Т. 39. № 12. С. 1664–1672.

Arencibia A., Carmona E.R., Cornide M.T. et al. Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (Saccharum hybrid) plants produced by cell electroporation // Transgenic Res. 1999. V. 8. P. 349–360.

Armstrong C.L., Phillips R.L. Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable embryogenic tissue cultures of maize // Crop Sci. 1988. V. 28. P. 363–369.

Bairu M.W., Aremu A.O., Van Staden J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods // Plant Growth Regul. 2011. V. 63. P. 147–173.

Barow M., Meister A. Endopolyploidy in seed plant is differently correlated to systematic, organ, life strategy and genome size // Plant Cell Environ. 2003. V. 26. P. 571–584.

Bassam B.J., Caetano-Anolles G. Automated "Hot Start" PCR using mineral oil and paraffin wax // Biotechniques. 1993. V. 14. P. 30–34.

Bogani P., Simoni A., Lio P., Scialpi A. Genome flux in tomato cell clones cultured *in vitro* in different physiological equilibria. A RAPD analysis of variability // Genome. 1996. V. 39. P. 846–853.

Cote F.X., Teisson C., Perrier X. Somaclonal variation rate evolution in plant tissue culture: Contribution to understanding through a statistical approach // *In vitro* Cell Dev. Biol. 2001. V. 37. P. 539–542.

Fras A., Maluszynska J. Regeneration of diploid and tetraploid plants of *Arabidopsis thaliana* via callus // Acta Biol. Cracovensia. 2003. V. 45. P. 145–152.

Gaj M.D., Maluszynska M. Genetic variation in callus culture of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Arabidopsis Inf. Serv. 1987. V. 23. P. 1–8.

Godwin I.D., Sangduen N., Kunanuvatchaidach R. et al. RAPD polymorphism among variant and phenotypically normal rice (*Oryza sativa* var. indica) somaclonal progenies // Plant Cell Rep. 1997. V. 16. P. 320–324.

He F., Kang D., Ren Y. et al. Genetic diversity of the natural populations of *Arabidopsis thaliana* in China // Heredity. 2007. V. 99. P. 423–431.

Jiang C., Mithani A., Gan X. et al. Regenerant *Arabidopsis* lineages display a distinct genome-wide srectrum of mutations conferring variant phenotypes // Current Biol. 2011. V. 21. P. 1385–1390.

Keathley D.E., Scholl R.L. Chromosomal Heterogeneity of *Arabidopsis thaliana* anther callus, regenerated shoots and plants // Z. Pflanzenphysiol. 1983. V. 112. P. 247–255.

Kondorosi E., Roudier F., Gendreau E. Plant cell-size control: growing by ploidy // Curr. Opin. Plant Biol. 2000. V. 3. P. 488–492.

Labra M., Vannini C., Grassi F. et al. Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 109. P. 1512–1518.

Melaragno J.E., Mehrotra B., Coleman A.W. Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis* // Plant Cell. 1993. V. 5. P. 1661–1668.

Moller E.M., Bahnweg G., Sandermann H., Geiger H.H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 6115–6116.

Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 5273–5296.

Polanco M.C., Ruiz M.L. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants // Plant Sci. 2002. V. 162. P. 817–824.

Sangwan R.S., Bourgeois Y., Dubois F., Sangwan-Norreel B.S. *In vitro* regeneration of *Arabidopsis thaliana* from cultured zygotic embryos and analysis of regenerants // J. Plant Physiol. 1992. V. 140. P. 588–595.

Shenk R.U., Hildebrandt A. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant sell cultures // Can. J. Bot. 1972. V. 50. P. 199–204.

Soneli J.R., Rao P.S., Mhatre M. Suitability of RAPD for analyzing spined and spineless variant regenerants of pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.) // Plant Molec. Biol. 2002. V. 20. P. 307a–307i.

Sugimoto-Shirasu K., Roberts K. "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2003. V. 6. P. 544–553.

Taylor P.W.J., Fraser T.A., Ko H.-L., Henry R.J. RAPD analysis of sugarcane during tissue culture // Curr. Iss. Plant Molec. Cell Biol. 1995. P. 241–246.

Zoriniants S.E., Nosov A.V., Monforte-Gonzalez M. et al. Variation of nuclear DNA content during somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. using cytophotometry // Plant Sci. 2003. V. 164. P. 141–146.

The Level of Genetic Variability of Cells in Prolonged Suspension Culture of *Arabidopsis thaliana*

K. A. Sedov, A. A. Fomenkov, A. I. Solov'yova, A. V. Nosov, and Yu. I. Dolgikh

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia

e-mail: sedov_konstantin@bk.ru

The level of heterogeneity and genetic variability of cells in a suspension of *Arabidopsis thaliana* cultured *in vitro* for more than seven years was studied. The considerable heterogeneity of the suspension in cell size was shown. As revealed by nuclear DNA cytophotometry, the suspension culture was mixoploid and the amount of DNA in the cells varied from 4 to 16 *C*. However, PCR with 6 *RAPD*- and 4 *ISSR*-primers and their intra-group combinations showed the lowest degree of variability of DNA markers. The genetic distances of clones obtained from a suspension culture of the parent plant were only 1.5%. Differences between the clones were identified with only one pair of 31 primer combinations tested, indicating low level of genetic heterogeneity of the suspension. The results showed that variations in the amount of DNA in the suspension culture cells are not accompanied by significant changes in the DNA sequence.