

УДК 581.154:582.579.2+581.143.6

М.М. КОЗЫРЕНКО*, Е.В. АРНОКОВА, Е.В. БОЛТЕНКОВ, Л.С. ЛАУВЕ

Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, 690022

e-mail: ibss@eastnet.febras.ru

Соматоклональная изменчивость *Iris pseudacorus* L. по данным RAPD- и цитогенетического анализа

Продемонстрирована возможность клонального размножения дальневосточных представителей *Iris pseudacorus* посредством непрямого регенерации побегов в культуре ткани. Сравнение RAPD-спектров популяций интактных растений и регенерантов позволило проследить вариабельность 255 RAPD-фрагментов, из них 193 (76%) оказались полиморфными. У регенерантов выявлено 22 RAPD-локуса, отсутствующих у интактных растений. Сходство регенерантов с растением-донором составляет 31%. Все регенеранты сохраняют хромосомное число вида, из которого они были получены, $2n = 24$. Доля полиморфных локусов при 95%-ном критерии (P_{95}) в популяции регенерантов составляет 43%. Генетические дистанции между растением-донором и регенерантами — 0,2119, между регенерантами — 0,1812, что соответственно в 1,5 и 1,7 раза ниже уровня внутривидовых различий.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, размножение *in vitro*, ПЦР, частота полиморфных фрагментов, *Iris pseudacorus*, RAPD-анализ.

Касатик ложноаирный *Iris pseudacorus* L. — вид, широко распространенный в Европе, Малой Азии, на Кавказе, на юге Западной Сибири [1,2], на Дальнем Востоке встречается довольно редко. Красивые соцветия из 1—4 желтых цветков на концах каждой ветви обуславливают применение этих растений в цветоводстве и озеленении. Надземная часть растений этого вида, как и *I. setosa* Pall. ex Link, *I. ensata* Thunb., *I. laevigata* Fish. et Mey. и *I. lactea* Pall., служит сырьевым источником для получения биологически активных веществ, обладающих противовирусной активностью [3-5].

Современный этап использования естественных источников для получения биологически активных веществ ориентирован на сохранение растительных ресурсов за счет использования новых биотехнологических способов их воспроизводства. Так, растения более 10 видов рода 7т регенерированы из каллусной, суспензионной куль-

туры и протопластов [6—18]. Установлено, что культивирование *in vitro* индуцирует генетическую изменчивость [19—24]. Растения, регенерированные из клеточных культур, как правило, отличаются от исходных форм, т.е. несут генетическую (соматоклональную) изменчивость, накопленную в процессе культивирования *in vitro*. Спектр этой изменчивости затрагивает как структуру ДНК, так и структуру кариотипа.

До недавнего времени для выявления соматоклональной изменчивости использовали цитологический анализ кариотипа. Регенеранты видов *I. pumila* [7], *I. pseudacorus*, *I. versicolor* и *I. setosa* [8, 10, 11] сохраняли в основном генетические характеристики донорского растения, например, хромосомное число вида, из которого они были получены, хотя имели место и скрытые изменения — транслокации, делеции, инверсии и т.д. В настоящее время для выявления геномного полиморфизма на разных уровнях: формы, линии,

Список сокращений: БАП — 6-бензиламинопурин; 2,4-Д — 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; ИУК — β-индолилуксусная кислота; ПЦР — полимеразная цепная реакция; СТАВ — гексадецилтриметиламмония бромид; RAPD — Random amplified polymorphic DNA; UPGMA — невзвешенный парно-групповой метод кластерного анализа.

растения-регенеранта, сорта, вида, рода и т.д., — широко используют метод RAPD. Значительная степень полиморфизма RAPD-маркеров наблюдалась среди регенерантов томатов [25], гороха [26, 27], чеснока [28], риса [29], кедра [30], кукурузы [31] и овощного стахиса [32]. У растений-доноров *Panax notoginseng* [33], *Angelica acutiloba* [34] и их регенерантов, полученных путем культивирования *in vitro* из молодых цветочных и пазушных почек, соответственно, RAPD-анализ не выявил каких-либо существенных различий, что подтверждает возможность использования соматического эмбриогенеза для клонального микроразмножения этих видов.

Ранее метод RAPD был нами успешно применен для дифференциации видов р. *Iris* [35], выявления внутривидовой генетической изменчивости растений *I. setosa* из разных районов российского Дальнего Востока [36, 37] и определения генетического полиморфизма каллусных линий шести видов р. *Iris* [24].

Цель данного исследования — разработка альтернативного метода размножения *in vitro* дальневосточных представителей *I. pseudacorus* и выявление соматической изменчивости. Для этого проведен анализ геномной ДНК интактных растений, растения-донора и регенерантов методом RAPD и изучены хромосомные числа.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объект исследования — интактные растения и регенераты *I. pseudacorus*. В качестве исходного материала для получения первичного каллуса использовали зародыши семян. Растительные ткани культивировали на питательных средах, содержащих основные солевые компоненты среды Мурасиге и Скуга [38], витамины, гидролизат казеина (50 мг/л) и агар (6 г/л). В состав сред вносили фитогормоны в различных комбинациях и концентрациях. Продолжительность выращивания — 35 сут в темноте при температуре $22 \pm 2^\circ$ и относительной влажности 50—70%.

Регенераты выращивали на свету при интенсивности освещения 4000 лк и 16-часовом фотопериоде, прочие условия были такими же, как и для субкультивирования каллусов.

ДНК экстрагировали из 100 мг лиофильно высушенных листьев. К растертой в порошок растительной ткани добавляли 800 мкл буфера для экстракции, содержащего 100 мМ трис-НС1 (рН 9,5), 1,4 М NaCl, 20 мМ ЭДТА, 1% СТАВ (hexadecyltrimethyl ammonium bromide) и 20 мл/л меркаптоэтанола. Суспензию инкубировали на

водяной бане при температуре 65° в течение 1,5 ч с периодическим перемешиванием. Затем добавляли равный объем смеси хлороформ — октанол (24:1) и эмульгировали со встряхиванием. После этого эмульсию центрифугировали 10 мин при 5000 g. К водной фазе добавляли 0,1 объема 3 М ацетата натрия и равный объем изопропанола, перемешивали и оставляли при температуре -20° на 30—40 мин. ДНК осаждали центрифугированием, осадок промывали последовательно спиртовыми растворами ацетата натрия и ацетата аммония (200 мМ ацетат натрия и 10 мМ ацетат аммония в 75%-ном этаноле). ДНК подсушивали и растворяли в ТЕ-буфере.

Анализ ДНК и RAPD-анализ проводили, как описано нами ранее [23]. Для обозначения RAPD-локуса использовали название праймера, в присутствии которого он получен, и размер локуса в парах нуклеотидов.

Статистическую обработку RAPD-фенотипов проводили с помощью сравнительного анализа полос в RAPD-спектрах исследуемых образцов с применением компьютерной программы RFLPscanPlus 3.12, при этом учитывали только воспроизводимые в повторных экспериментах фрагменты (полиморфизм по интенсивности не брали в расчет). По каждому из праймеров были составлены бинарные матрицы. В данном исследовании использовали диплоидный материал, поэтому для получения несмещенных оценок частоты аллелей RAPD-локусов рассчитывали непрямой методом [39] на основе частот организмов, у которых данный фрагмент отсутствует.

Для количественной оценки RAPD полиморфизма (P_{95}), средней ожидаемой гетерозиготности (H_{exp}), коэффициента попарного сходства между особями (S), среднего внутривидового сходства (S_{pop}), генетических расстояний Нея (D_N) и построения дендрограмм генетических отношений на основе матриц значений D_N посредством невзвешенного парно-группового метода кластерного анализа (UPGMA) с бутстрэпными оценками степени надежности порядка ветвления (1000 реплик) использовали пакет прикладных программ TFPGA [40]. Для расчета среднего числа аллелей на локус (A) и эффективного числа аллелей на локус (A_e) использовали пакет программ POPGENE [41]. Бескорневое дерево, иллюстрирующее также генетические отношения между отдельными особями, построено методом UPGMA с помощью пакета программ TREECON [42].

Цитогенетический анализ апикальной меристемы корешков соматоклонов *I. pseudacorus* проводили по стандартной методике [43]. Материал

фиксировали в смеси уксусная кислота—этанол (3:1), выдерживали в 0,1н. растворе соляной кислоты в течение 15 мин и затем окрашивали ацетокармином. Просмотрено 79 препаратов и подсчитаны хромосомы в 1105 метафазных клетках.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На предварительном этапе работы нами выяснено, что наибольшей каллусообразующей способностью обладают изолированные зародыши семян *I. pseudacorus*, находящихся в фазе восковой спелости эндосперма. Эффективными фитогормонами для индукции каллусогенеза явились 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота и 6-бензиламинопурин в концентрации 5 мг/л и 0,5 мг/л, соответственно. Первичные каллусы, полученные от растений различного генотипа, морфологически слабо отличались друг от друга. Однако при длительном культивировании в одинаковых условиях единообразие каллусов было утрачено, что по видимому, связано с влиянием генотипа на детерминацию морфологических особенностей каллусных линий.

Субкультивирование тканей проводили на среде с уменьшенным в 5 раз содержанием 2,4-Д. Для каллусной культуры *I. pseudacorus* отмечена прямая зависимость между интенсивностью образования первичного каллуса на среде с 2,4-Д и его способностью к пролиферации и регенерации растений. Длительно пассируемая культура имела стабильную морфологию: плотный узловатый, состоящий из сросшихся полусферических агрегатов, матовый золотисто-желтый каллус.

Определяющим условием для индукции органогенеза явилось исключение из среды 2,4-Д. Каллусы, субкультивируемые в течение одного года, переносили на среды, содержащие (3-индолилуксусную кислоту и кинетин в концентрации 2 мг/л и 1 мг/л, соответственно. На поверхности нодулярного каллуса формировались белые эмбриониды, которые давали начало зеленым побегам. Количество регенерантов на одну пробирку в среднем составило 36 ± 2 . Побеги укореняли на среде с ИУК (1 мг/л), кинетином (0,2 мг/л) и феруловой кислотой (0,2 мг/л). Корни развивались медленно. Первые придаточные корни появились только на 20-е сутки культивирования. Через 5—6 нед регенеранты находились на ювенильной стадии развития и были готовы для пересадки в почву. Субкультивирование побегов на среде, содержащей вместо используемых фитогормонов индолилмасляную кислоту (0,5 мг/л), способствовало развитию уже на 5-е сутки главных корней, что сократило этап подготовки растений к высадке в почву. К концу пер-

вого года растения-регенеранты находились в иматурном возрастном состоянии.

Известно, что при введении в культуру и длительном выращивании от *vitro* в клетках происходят и накапливаются структурно-функциональные изменения, в первую очередь, хромосомные aberrации, и размах этих изменений зависит от вида. Например, каллусные линии женьшеня, культивируемые от *vitro* уже более десяти лет, по уровню хромосомного полиморфизма остаются относительно стабильными [23].

Цитологический анализ кариотипов 23 регенерантов *I. pseudacorus* показал, что они миксоплоидны с размахом изменчивости по числу хромосом от 6 до 62. Популяция клеток имеет следующую структуру: примерно 39% от общего числа клеток составляют диплоидные, -20% — гиподиплоидные, -23% — гипердиплоидные и -17% — анеуплоидные клетки. Исследованные нами ранее [24] интактные растения и каллусные линии *I. pseudacorus* также миксоплоидны, но с меньшим размахом изменчивости по числу хромосом — от 6 до 46—48, и с одинаковой в основном структурой популяций клеток: примерно 42% составляла доля диплоидных клеток, -32,5% — гиподиплоидных, ~9% — гипердиплоидных и -16% — анеуплоидных. Как следует из приведенных данных, у регенерантов наблюдается увеличение пloidности клеток при неизменном уровне анеуплоидии, модальный класс составляют, как и в каллусной линии, диплоидные клетки с числом хромосом, равным хромосомному числу растения-донора ($2n = 24$).

Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей [7, 8, 10]. Так, цитогенетический анализ 60 соматоклонов *I. pseudacorus* выявил только два растения-регенеранта с тетраплоидным набором хромосом ($2n = 4x = 68$), все остальные сохраняли хромосомное число растения-донора ($2n = 34$), из которого они были получены [8]. Регенераты *I. pumila* [7], *I. versicolor* и *I. setosa* [10] также имели хромосомное число родительского вида, хотя наблюдались скрытые изменения, такие как транслокации, инверсии, делеции и т.д.

При проведении RAPD-анализа одним из важных моментов является выбор праймеров, которые должны давать стабильные, воспроизводимые, специфичные наборы RAPD-спектров. Предварительный скрининг 32 десятимерных праймеров произвольной последовательности (Operon Technologies, США) позволил отобрать 18 эффективных в полимеразной цепной реакции с ДНК *I. pseudacorus* (табл. 1). Число ампликонов в RAPD-спектрах в зависимости от применяемого

праймера варьировало от 8 до 21, что составило в среднем 14,2 локуса на праймер, размеры фрагментов находились в области от 200 до 2000 п.н. На рис. 1 в качестве примера представлены амплификационные спектры ДНК с праймерами OPF-12 (см. рис. 1,а) и OPF-13 (см. рис. 1,б).

Сравнение RAPD-спектров позволило проследить вариабельность 255 фрагментов, из них 193 оказались полиморфными. Все исследованные интактные растения и регенеранты имеют

23% общих мономорфных локусов, а растение-донор и регенеранты — 31%. Результаты RAPD-анализа растения-донора и каллусных линий / *pseudacorus* [24] имели полное сходство для 81% локусов. Генетическая изменчивость у соматолонов, регенерированных из каллусной культуры (непрямая регенерация), складывается из изменчивости, возникающей при введении в культуру *in vitro*, длительном субкультивировании каллусной линии и переводе регенерантов в условия *in vivo*.

Таблица 1

Характеристика праймеров, используемых в работе

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'----3')	Локусы*		Число учитываемых локусов
		интактные растения	регенеранты	
OPF-01	ACGGATCCTG	5/12	1/8	13
OPF-04	GGTGATCAGG	13/15	6/12	16
OPF-05	CCGAATCCCC	6/11	9/12	13
OPF-06	GGGAATTCGG	9/12	6/10	12
OPF-09	CCAAGCTTCC	6/10	5/10	11
OPF-10	GGAAGCTTGG	10/16	6/10	16
OPF-12	ACGGTACCAG	9/15	2/10	15
OPF-13	GGCTGCAGAA	16/19	14/15	20
OPF-14	TGCTGCAGGT	4/9	2/5	9
OPF-16	GGAGTACTGG	7/10	8/11	14
OPE-03	CCAGATGCAC	9/12	7/12	12
OPE-04	GTGACATGCC	10/16	10/15	18
OPE-14	TGCGGCTGAG	9/14	13/16	17
OPE-19	ACGGCGTATG	6/12	8/11	13
OPE-20	AACGGTGACC	6/12	5/11	13
OPB-17	AGGGAACGAG	5/8	2/6	8
OPB-18	CCACAGCAGT	8/14	5/12	14
OPD-03	GTCGCCGTCA	17/20	12/19	21
Всего:		155/237	121/205	255

* В числителе — число полиморфных локусов, в знаменателе — число учитываемых локусов.

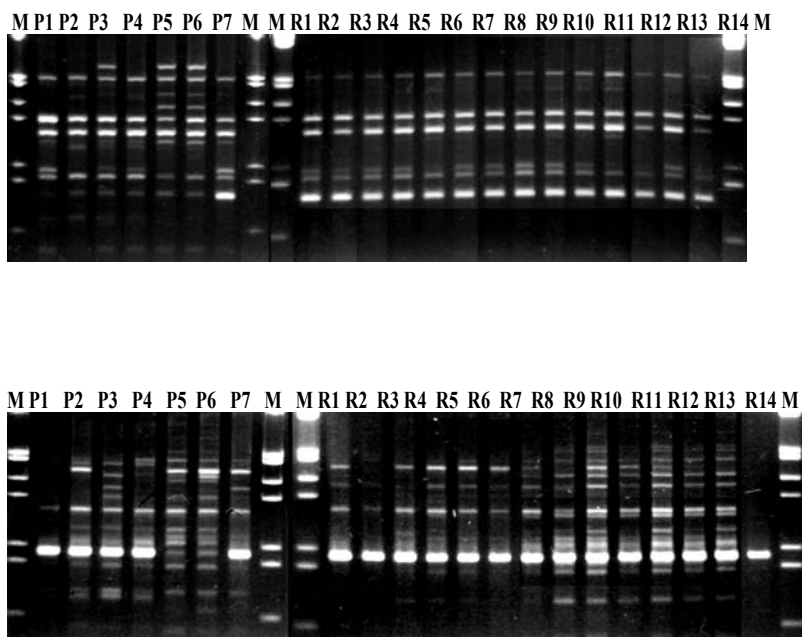


Рис. 1. RAPD-спектры образцов ДНК интактных растений и регенерантов *I. pseudacorus*, полученные с использованием праймеров OPF-12 (а) и OPF-13 (б): М — (*Eco*RI+*Hind*III)-рестрикты ДНК фага лямбда; P1 —P7 — интактные растения (P7 — растение-донор); R1 —R14 — регенераты

in vivo. Уровень изменений, происходящих на каждом из этапов растение-донор → каллусная культура → регенераты, разный. Степень отличия регенерантов от растения-донора примерно в 3,6 раз выше, чем у каллусной линии, и составляет 69%. Полученные данные согласуются с результатами RAPD-анализа соматоклонов кукурузы [31], у которых выявлена высокая (от 64 до 74%) степень отличия их от исходной линии. Авторы предположили, что изменения при культивировании *in vitro* затрагивают в основном некодирующие последовательности ДНК или что клетки со значительными генетическими нарушениями в кодирующей области утрачивают способность к регенерации. Недавно Bogani P. с сотрудниками [44] провели исследования RAPD-маркеров клеточной культуры томатов и установили, что маркеры происходят из повторяющихся некодирующих последовательностей геномной ДНК и гомология различных фрагментов главным образом выражается в присутствии многократных олигонуклеотидных АТ-повторов.

Генетические изменения, происходящие у регенерантов *I. pseudacorus* и наблюдаемые в RAPD-спектрах, затрагивают как структуру RAPD-локусов, так и последовательности ДНК вне этих локусов, что приводит к появлению новых ампликонов при сохранении большей части фрагментов, характерных для ДНК растения-донора. В RAPD-спектрах регенерантов выявлено 22 фрагмента, отсутствующих у интактных растений, один из них — OPF-05-650 присутствует у всех регенерантов. По мнению исследователей [28,45], появление новых, отсутствующих в родительских линиях ампликонов у регенерантов связано с тем, что в геноме есть специфические районы, предрасположенные к мутациям, которые возникают в ответ на условия культивирования и приводят к формированию различных клонов в культуре *in vitro*.

Исследуемые популяции интактных растений и регенерантов *I. pseudacorus* существенно различались по аллельным частотам большинства RAPD-локусов. Для определения уровня гене-

тической изменчивости рассчитаны основные параметры генетического полиморфизма по всем RAPD-локусам. Доля полиморфных локусов при 95%-ном критерии достоверности (P_{95}) в популяции регенерантов составляет 43%. Это довольно высокий уровень полиморфизма, однако он ниже, чем в популяции интактных растений ($P_{95} = 61\%$), т.е. регенераты генетически более сходны между собой, чем интактные растения. Коэффициент попарного сходства (S) между регенерантами варьирует от 0,7529 до 0,9333, а между интактными растениями — от 0,6863 до 0,8980; среднее внутрigrупповое сходство ($S_{\text{гp}}$) составляет 0,8260 и 0,7352, соответственно. Полученные данные согласуются с результатами исследований полиморфизма ДНК у регенерантов томатов [25], риса [29], кедра [30] и овощного стахиса [32]. Так, уровень полиморфизма у соматических клонов овощного стахиса, полученных в результате прямой регенерации на средах с различной концентрацией фитогормонов, повышался при использовании более высоких концентраций БАП (20 мг/л) или при многократной регенерации на среде с 10 мг/л БАП [32].

Среднее число аллелей на локус (A) и эффективное число аллелей (A_e) для интактных растений составляют 1,6078 и 1,3669 соответственно, для регенерантов — 1,4745 и 1,2839, соответственно. Средняя ожидаемая гетерозиготность (H_{exp}) интактных растений равна 0,2269, а регенерантов — 0,1721. Таким образом, изученные попу-

ляции *I. pseudacorus* характеризуются достаточно высокими значениями основных параметров генетической изменчивости, а следовательно, регенеранты так же, как и родительский вид, характеризуются экологической прогрессивностью — широтой экологической амплитуды и большим диапазоном приспособляемости.

По всем RAPD-локусам рассчитаны коэффициенты генетических дистанций (D_N) между всеми парами исследуемых образцов (табл. 2 и 3) и построены дендрограммы генетических отношений между интактными растениями (рис. 2,а) и всеми исследуемыми образцами (см. рис. 2,б). Коэффициенты генетических дистанций между парами интактных растений изменяются от 0,1075 (см. рис. 2,а и табл. 2, растения P5 и P6) до 0,3765 (см. рис. 2,а и табл. 2, растения P7 и P2), в среднем 0,3095, что свидетельствует о довольно значительной дифференциации представителей *I. pseudacorus*. На дендрограмме, отражающей генетические отношения интактных растений и регенерантов (см. рис. 2,б), четко выделяются два кластера: первый формируют растение-донор и все соматические клоны (индекс бутстрэпа 99%), второй — интактные растения (индекс бутстрэпа 86%). Генетические дистанции между растением-донором и регенерантами составляют в среднем 0,2119 (см. табл. 3), между самими регенерантами — 0,1812, что соответственно в 1,5 и 1,7 раза ниже уровня внутривидовых различий.

Таблица 2

Значения генетических различий (D_N) между интактными растениями *I. pseudacorus*, рассчитанные по 255 RAPD-локусам

Образцы	P1	P2	P3	P4	P5	P6
P2	0,2231					
P3	0,3318	0,3483				
P4	0,2581	0,2429	0,2683			
P5	0,3539	0,3263	0,3318	0,3102		
P6	0,3428	0,3595	0,3428	0,3318	0,1075	
P7	0,3595	0,3765	0,3708	0,3048	0,3048	0,3048

Примечание. P1—P7 — интактные растения, P7 — растение-донор.

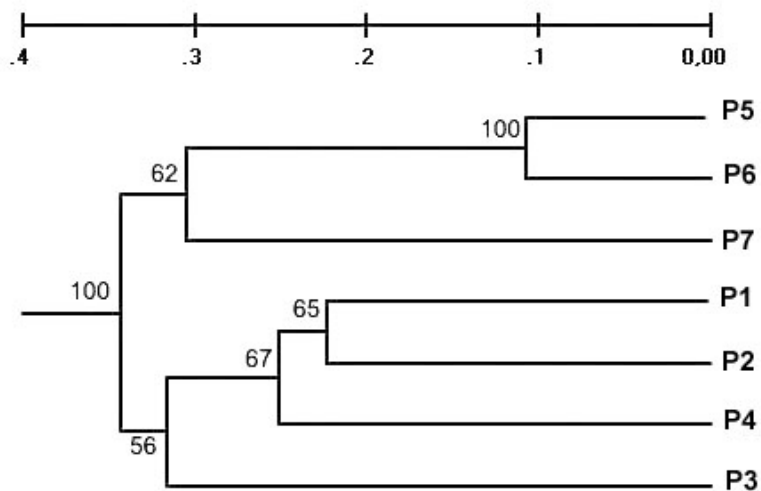
Таблица 3

Значения генетических различий (D_N) между растениям-регенерантами / *pseudacorus*, рассчитанные по 255 RAPD-локусам

Образцы	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14
R2	0,1753													
R3	0,1614	0,2134												
R4	0,2037	0,2085	0,1386											
R5	0,1753	0,2085	0,1660	0,1163										
R6	0,1800	0,1847	0,1706	0,1386	0,1386									
R7	0,2380	0,2330	0,2183	0,1386	0,1568	0,1163								
R8	0,2683	0,2631	0,2183	0,1476	0,2037	0,1614	0,1075							
R9	0,2838	0,2683	0,2134	0,1706	0,1989	0,1753	0,1296	0,0690						
R10	0,2530	0,1894	0,2231	0,1706	0,2085	0,1568	0,1119	0,1207	0,0988					
R11	0,2231	0,2581	0,1847	0,1431	0,1894	0,1476	0,1119	0,1296	0,1075	0,0902				
R12	0,2480	0,1753	0,2380	0,1568	0,1847	0,1522	0,1163	0,1614	0,1660	0,1296	0,1296			
R13	0,2683	0,2134	0,2281	0,1942	0,2231	0,1341	0,1252	0,1800	0,1847	0,1386	0,1119	0,1252		
R14	0,2183	0,2134	0,2581	0,2231	0,2429	0,1800	0,1989	0,2281	0,2631	0,2330	0,2134	0,1800	0,1800	
P7	0,1522	0,2134	0,1614	0,2231	0,1942	0,2380	0,2183	0,2380	0,2134	0,1942	0,1753	0,2281	0,2380	0,2786

Примечание. R1—R14 — растения-регенеранты; P7 — растение-донор.

-4 -3 -2 -1 0,00



0,2 0,1

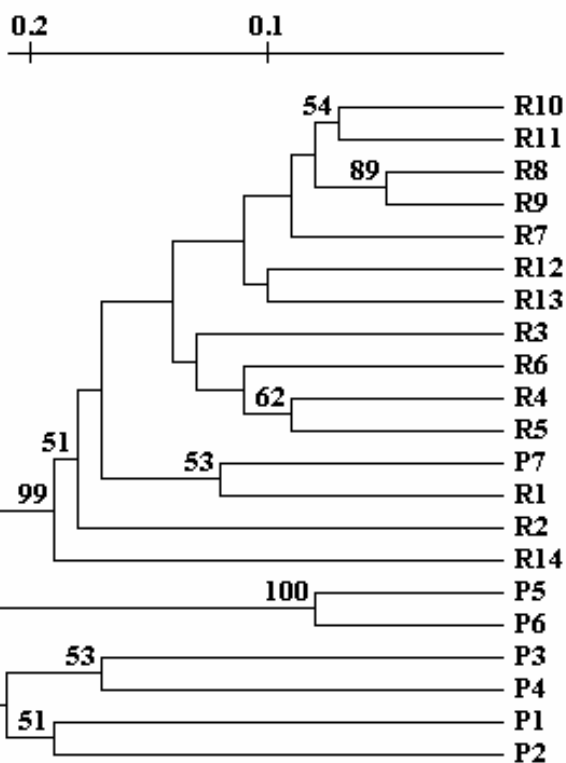


Рис. 2. UPGMA-дендрограмма генетических отношений между исследуемыми интактными растениями *I. pseudacorus* (а) и между интактными растениями и регенерантами (б). Цифрами указаны величины достоверности кластеризации (индекс бутс-трэпа). Обозначение образцов, как на рис. 1

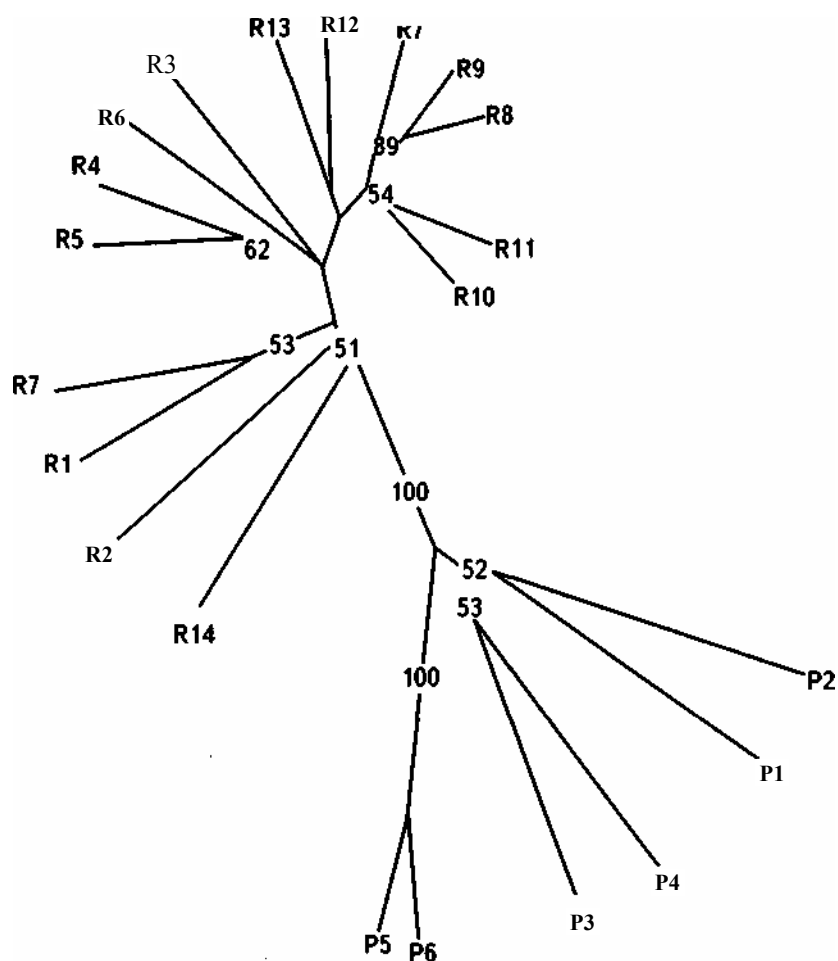


Рис. 3. Некорневое дерево, построенное методом UPGMA, отражающее генетические отношения между интактными растениями и регенерантами. Цифрами указаны величины достоверности кластеризации (индекс бутстрэпа). Обозначение образцов, как на рис. 1

Некорневое дерево, представленное на рис. 3, более наглядно иллюстрирует родство исследуемых представителей. Некоторые соматклоны объединяются вместе, образуя группы: R3—R4—R5—R6 и R7—R8—R9—R10—R11—R12—R13, и характеризуются значительным генетическим сходством (D_1) внутри каждой группы. Среднее D_1 в двух группах составляет 0,8771 и 0,898, соответственно. Возможно, эти регенеранты имели общее происхождение (из одного клона) и дивергировали в процессе культивирования *in vitro* и после пересадки *in vivo*. Сходство всех соматклонов с растением-донором примерно одинаковое, кроме R1 и R14, первый из них имеет наибольшее (0,8588), второй — наименьшее (0,7569) значение D_1 .

Таким образом, в настоящей работе нам удалось продемонстрировать возможность клонального размножения *I. pseudacorus* посредст-

вом не прямой регенерации побегов в культуре ткани и применения RAPD-анализа для детектирования и контроля соматклональной изменчивости. В процессе получения растений-регенерантов из клеточной культуры *in vitro* (калусогенез, органогенез, укоренение побегов и пересадка их в условия *in vivo*) происходят генетические изменения на уровне как ДНК, так и кариотипа, не превышающие внутривидовые. Все регенеранты сохраняют хромосомное число вида, из которого они были получены. По-видимому, основным механизмом изменчивости генома *I. pseudacorus* остаются генные мутации и хромосомные aberrации. Определены основные генетические параметры вида *I. pseudacorus* ($P_{95} = 61\%$, $A = 1,61$, $A_e = 1,37$, $H_{exp} = 0,2269$) и популяции регенерантов ($P_{95} = 43\%$, $A = 1,47$, $A_e = 1,28$, $H_{exp} = 0,1721$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Сосудистые растения советского Дальнего Востока. — Л.: Наука, 1987. — Т. 2. — С. 414—427.
2. Флора Сибири. Agaraceae-Orchidaceae. — Новосибирск: Наука, 1987. — С. 113—124.
3. *Iwashina, T., Ootani, S.* // Ann. Tsukuba Bot. Card. - 1998. -N 17.— P. 147—183.
4. *Минина С.А., Абу-Схела Г.П.И., Астахова Т.В.* и др. // Хим.-фарм. журн. —1999. — Т. 33. — № 4.—С. 40—42.
5. *Минина С.А., Астахова Т.В., Пряхина Н.И., Абу-Схела Г.* // Хим.-фарм. журн. —2001. — Т. 35.—№2.—С. 24—26.
6. *Jehan, Я, Courtois, D., Ehret, C, et al.* // Plant Cell Reports. — 1994. — V. 13. — P. 671—675.
7. *Radojevic, L.J., Sokic, O., Tusic, B.* // Acta Hort. — 1987. — V. 212. —P. 719—723.
8. *Laublin, G., Sain, i H.S., Cappadocia, M.* // Plant Cell Tiss. Org. Cult.—1991. —V. 27. —P. 15—21.
9. *Yabuяa T., Ikeda, Y., Adachi T.* // Euphytica. —1991. — V. 57. —P. 77—81.
10. *Laublin, G., Cappadocia, M.* // Bot. Ada. — 1992. — V. 105. — С. 319—322.
11. *Radojevic, I., Subotic, A. Hi.* PlantPhysiol. — 1992. — V. 139. P. 690—696.
12. *Kavase, K., Mizutani, H., Yoshioka, M., Fukuda, S.* // J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. — 1995. — V. 64. - N 1. — P. 143—148.
13. *Shimizu, K., Yabuяa, T., Adachi, T.* // Euphytica. - 1996. — V. 89. — P. 223—227.
14. *Shimizu, K., Nagaike, H., Yabuяa, T., Adachi. T.* // PlantCell Tiss. Org. Cult. - 1997. — V. 50. — P. 27—31.
15. *Hida, A., Shimizu, K., Nagata, R., etal.* // Euphytica —1999. — V. 105. —P. 99—102.
16. *Shimizu, K., Miyabe, Y., Nagaike, H., et al.* // Euphytica. — 1999. —V. 107. —P. 105—113.
17. *Wang, Y., Jeknic, Z., Ernst, R.C., Chen, T.H.H.* // HortScience. — 1999. —V. 34. — N 7. — P. 1271—1276.
18. *Shibli. R.A., Ajlouni, MM* // Plant Cell Tiss. Org. Cult. — 2000. —V. 61.—N 1. —P. 15—21.
19. *Larkin. R.J., Scowcroft, W.R.* // Theor. Appl. Genet. —1981. — V. 60.—N2. —P. 197—214.
20. *Мардамыин А.Г., Матвеева Е.В.* // Физиология растений. — 1997. — Т. 44. — № 3. — С. 445—448.
21. *Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Реунова Г.Д.* и др. // Биотехнология. - 1997. — № 5. — С. 10—14.
22. *Аверьянова В.А., Александрова И.В., Быков В А, Клиниов С.В.* // Генетика. —1999. — Т. 35. — № 12. — С. 1674—1680.
23. *Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Лауве Л.С.* и др. // Биотехнология. — 2001. - № 1. - С. 19—26.
24. *Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Лауве Л.С., Болтенков Е.В.* // Биотехнология. — 2002. — № 4. — С. 38—48.
25. *Bogani, P., Simoni, A., Lio, P., et al.* // Genome. — 1996. — V. 39. — P. 846—853.
26. *Кокаева З.Г., Боброва В.К., Вальехо-Роман КМ.* и др. // Докл. АН. — 1997. — Т. 355. — № 1. — С. 134—136.
27. *Кокаева З.Г., Боброва В.К., Гостимский С.А., Троицкий А.В.* // Докл. АН. — 2000. — Т. 372. — № 4. — С. 565—567.
28. *Al-Zahim, M.A., Foid-Lloyd, B. V., Newbury, H.J.* // Plant Cell Reports. — 1999. — V. 18. — P. 473—477.
29. *Godwin, I.D., Sangduen, S.W., Kunanvachaidash, R., et al.* // Plant Cell Reports. — 1997. — V. 16. — P. 320—324.
30. *Piola, F., Rahr, R. Heizman, P.* // Plant Sci.—1999.—V. 141.—N2. —P. 159—163.
31. *Осипова Е.С., Кокаева З.Г., Троицкий А.В.* и др. // Генетика. — 2001. — Т. 37. — № 1. — С. 91—96.
32. *Кочиева Е.З., Хусейн И.А., Легкобум М.П., Хадеева Н.В.* // Генетика. — 2002. — Т. 38. — № 5. — С. 629—634.
33. *Shoyama, Y., Zhu, X.X., Nakai. R., Shiraishi, S.* // Plant Cell Reports. — 1997. — V. 16. — P. 450—453.
34. *Watanabe, A., Araki, S., Kobari, S., et al.* // Plant Cell Report. — 1998. —V. 18. —P. 187—192.
35. *Журавлев Ю.Н., Козыренко М.М., Артюкова Е.В.* и др. // Генетика. — 1998. — Т. 34. — № 3. — С. 368—372.
36. *Артюкова Е.В., Козыренко М.М., Илюшко М.В.* и др. // Молекулярная биология. — 2001. — Т. 35. — № 1. — С. 152—156.
37. *Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Илюшко М.В.* и др. // Биологические исследования на островах северной части Тихого океана. — 2000. — № 2. — С. 1—11.
38. *Murashige, T., Skoog, F.* // Phisiol. Plant. —1962. — V. 15. — P. 473—497.
39. *Lynch, M., Milligan, B.C.* // Mol. Ecol. — 1994. — V. 3. — P. 91—99.
40. *Miller, M.P.* 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
41. *Yeh.F.C.Boyle. T.J.B.* // Belgian J. Bot. —1997. — V. 129.— P. 157.
42. *Van de Peer. Y., De Wachter, R.* // Comput. Applic. Biosci. — 1994. — V. 10. — P. 569—570.
43. *Паушева З.П.* Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1974. —287с.
44. *Bogani, P, Simoni, A, Lio, P., et al.* // Genome. — 2001. — V. 44.—N4. —P. 549—558.
45. *Bohanec, B., Jakse, M., Ihan, A., Jovorik, B.* // Plant Sci. — 1995. —V. 104.—P. 215—224.

M.M. KOZYRENKO*, E.V. ARTYUKOVA, E.V. BOLTENKOV, and L.S. LAUVE

Institute for Biology and Soil, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 690022, Vladivostok Russia

e-mail: ibss@eastnet.febras.ru

Somaclonal Variability of *Iris pseudacorus* L. judged by RAPD- and Cytogenetic Analyses

A possibility of clonal propagation in Far-Eastern representatives of *Iris pseudacorus* species by indirect shoot regeneration in tissue culture has been demonstrated. A variability in 255

RAPD fragment (193 fragment (-76%) among them proved to be polymorphic) between intact plants and regenerants was studied. 22 RAPD fragments observed in the regenerants failed to occur in an intact plant. Similarity of the regenerants to a donor plant comprises 31%. In all regenerants chromosome number of the donor species is retained and equal to $2n = 24$. At 95% criterion of probability (P_{95}), a percentage of polymorphic loci in the regenerant population reaches 43%. Genetic distances between the donor plant and regenerants, and between the regenerants themselves are quantified as 0,2119 and 0,1812, respectively. These figures are 1.5 and 1.7 times lower the level of interspecific variability.

Key words: frequencies of polymorphic fragments, genetic polymorphism, *in vitro* propagation, *Iris pseudacorus*, PCR, RAPD-analysis.