

УДК 581.1

## ИЗМЕНЕНИЕ МОРФО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ГРЕЧИХИ ПОСЕВНОЙ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Г.В. Камалова, Л.Р. Нигматуллина, Н.И. Румянцева

### Аннотация

Изменение числа хромосом, содержания пероксида водорода и активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД) и растворимой пероксидазы – в клетках каллусов гречихи посевной связано с различной способностью к морфогенезу при длительном культивировании (21 месяц). В каллусных культурах гречихи посевной морфогенной способностью обладают культуры с преобладанием диплоидных клеток и низким содержанием пероксида водорода. Потеря морфогенного потенциала с увеличением времени культивирования сопровождается уменьшением доли диплоидных клеток и увеличением содержания внутриклеточного пероксида водорода. Активность антиоксидантных ферментов не проявила четкой корреляции с морфогенной способностью каллусных культур. Полученные результаты указывают на наличие связи между изменением морфогенной способности, генетической вариабельностью и изменением редокс-статуса каллусных клеток с увеличением времени культивирования.

**Ключевые слова:** гречиха посевная *Fagopyrum esculentum* Moenh., каллусы, морфогенез, окислительный стресс, пероксид водорода, хромосомные числа.

---

### Введение

В последнее десятилетие показано, что окислительный стресс играет существенную роль в регуляции морфогенеза растений [1–6]. Одним из связующих звеньев, определяющих участие окислительного стресса в регуляции процессов дифференцировки и морфогенеза у растений, является пероксид водорода. Эта молекула – побочный продукт метаболизма клетки – играет роль вторичного посредника, вовлеченного в регуляцию определенных генов [7, 8]. Установлено, что увеличение эндогенного содержания пероксида водорода коррелирует с индукцией морфогенеза в каллусных культурах хрустальной травки [9], развитием почек и соматических зародышей на незрелых зародышах подсолнечника [10]. Тем не менее накопление высоких концентраций пероксида водорода в клетке вследствие повреждения или недостаточной активности антиоксидантных систем может приводить к повреждению основных макромолекул клетки (ДНК, белков, липидов). Существует гипотеза [11], согласно которой интенсивное накопление активных форм кислорода (АФК) в клетках рассматривают как причину хромосомных и генных мутаций, приводящую к потере регенерационной способности культур клеток и тканей *in vitro*.

По мнению Касселс с соавторами [12], причиной окислительного стресса, вызывающего цитогенетическую вариабельность *in vitro*, могут быть специфические условия культивирования. Следует отметить, что клетки растений подвергаются стрессу уже на этапе стерилизации и вычленения экспланта (поражение) и далее при воздействии таких стрессоров, как свет, измененная влажность, осмотики, гормоны, прооксиданты, присутствующие в среде культивирования. Любые виды стрессоров вызывают продукцию АФК, которые могут оказывать негативное влияние на различные виды макромолекул в клетке, в частности ДНК, вызывая одно- и двуцепочечные разрывы. При недостаточной активности антиоксидантных и репаративных систем клетки нарушения ДНК могут быть реализованы в виде точечных мутаций и хромосомных аберраций. Следовательно, можно предположить, что культуры, имеющие различную способность к морфогенезу и отличающиеся по генетической вариабельности, могут характеризоваться различным содержанием АФК, в частности,  $H_2O_2$ , и обладать различной активностью антиоксидантных ферментов.

Ранее было установлено, что морфогенные культуры гречихи посевной достаточно быстро теряют способность к морфогенезу (через 6–12 месяцев культивирования), что коррелирует с изменением морфологических, цитогенетических и биохимических характеристик каллуса [13]. Цель проводимых исследований заключалась в выявлении влияния длительного культивирования *in vitro* на генетическую вариабельность, изменение морфогенной способности и редокс-статуса клеток каллусов гречихи посевной.

### Материалы и методы

В работе использовали морфогенные и неморфогенные каллусы гречихи посевной *Fagopyrum esculentum* Moenh. сорта Казанская крупнозерная. Каллусы были получены из незрелых зародышей в течение лета – осени 2005 г.; морфология и получение таких культур описаны нами ранее [13, 14]. Культуры поддерживали в термостате при температуре  $26 \pm 2$  °С, в темноте, на каллусогенной среде RX (pH 5.5–5.6) [15], содержащей соли по B5 [16] с добавлением 2 мг/мл тиамин, 1 мг/мл пиридоксин, 1 мг/мл никотиновой кислоты, 2000 мг/л гидролизата казеина, 2 мг/л 2,4-Д, 0.5 мг/л ИУК, 0.5 мг/л НУК, 0.2 мг/л кинетин, до 2.5% сахарозы и 0.8% агара. Для определения регенерационной способности каллусные культуры помещали на среду RXR, представляющую собой среду RX, в которой в качестве гормонов были добавлены 0.18 мг/л ИУК и 2.23 мг/л 6-БАП, и безгормональную среду MS [17] и культивировали на свету (5000 лк) в условиях 16/8-часового фотопериода свет/темнота и температуры 25 °С. Оценивали способность культур к образованию соматических зародышей, почек и корней. Для приготовления цитогенетических препаратов каллус фиксировали в фиксаторе Кларка. Окрашивание хромосом проводили 2%-ным пропионовым орсеином («Диаэм», Россия). Препараты анализировали с помощью микроскопа Jenamed «Carl Zeiss» (Германия). Содержание  $H_2O_2$  в клетках определяли спектрофотометрически согласно Беллинчампи с соавторами [18]. Активность растворимой пероксидазы определяли по методу Бояркина [19], супероксиддисмутазы (СОД) – согласно Полесской с соавторами [20]. Представлены данные двух независимых опытов с тремя биологическими повторностями в каждом. В таблицах

приведены среднеарифметические значения показателей активности ферментов, в качестве разброса экспериментальных данных указаны среднеарифметические ошибки, ошибка выборочной доли при подсчете митотического индекса, а также медиана, 5-й и 95-й перцентили содержания пероксида водорода.

### Результаты и их обсуждение

Первичный морфолого-цитогенетический анализ, а также оценку регенерационной способности проводили через 4 месяца культивирования каллусов. Были исследованы эмбриогенные каллусные линии 2–5 и 1–10, геммогенная линия 3–12 и неморфогенный каллус 1–18. Линии 2–5 и 1–10 представляли собой гетерогенные каллусы с белыми уплотнениями и характеризовались высокой способностью к эмбриоидогенезу (до 50 соматических зародышей на чашку). Гетерогенная линия 3–12 состояла из рыхлых глобул серого и светло-коричневого цвета и обладала способностью формировать почки (не менее 30 почек на чашку). Белый рыхлый каллус линии 1–18 не проявлял способности ни к одной форме морфогенеза. Проведенный цитогенетический анализ (табл. 1) выявил, что эмбриогенные линии морфогенных каллусов были представлены в основном диплоидными клетками с 16 хромосомами, их доля составляла 80–83%. Напротив, в геммогенной линии 3–12 доля диплоидных клеток была значительно меньше (19%). Несмотря на это, культура обладала высокой способностью к образованию почек. В литературе имеются немногочисленные данные о том, что морфогенные культуры могут содержать клетки как с эуплоидным, так и с поли- и анеуплоидными числами хромосом [21]. Однако в большинстве случаев в каллусных культурах с высокой регенерационной способностью преобладают эуплоидные клетки [22, 23]. Можно предположить, что в случае линии 3–12 мы наблюдали селекцию и становление морфогенной линии, поскольку в первые месяцы культивирования каллусные культуры еще нестабильны и могут состоять из нескольких популяций клеток, обладающих разными генетическими характеристиками и разной морфогенной активностью. Неморфогенный каллус линии 1–18 представлял собой миксопloidную культуру и характеризовался значительным разбросом хромосомных чисел: от  $1n$  до  $8n$  и более. Свыше 90% клеток в этой культуре составляли полипloidные клетки (табл. 1). При этом было установлено, что эмбриогенные линии характеризовались низким содержанием внутриклеточного пероксида водорода по сравнению с геммогенной и неморфогенной линиями (табл. 1). В табл. 1 и 2 указаны значения содержания пероксида водорода в клетках, соответствующие 5-му перцентилю, медиане и 95-му перцентилю.

Через 21 месяц культивирования в линиях 2–5 и 1–10 было отмечено снижение морфогенной способности, сопровождавшееся изменением морфологии культуры, – белые уплотнения в каллусной ткани отсутствовали. В этих культурах образование соматических зародышей происходило с небольшой частотой (3–5 соматических зародыша на чашку), и их развитие ограничивалось ранними стадиями. При этом линия 1–18, ранее охарактеризованная как неморфогенная, на безгормональной среде MS интенсивно образовывала корни (рис. 1, б). Линия 3–12 через 21 месяц культивирования сохранила способность к образованию почек на прежнем уровне (рис. 1, з).

Табл. 1

Морфогенная способность, хромосомная изменчивость и содержание внутриклеточной  $H_2O_2$  в каллусных культурах *Fagopyrum esculentum* через 4 месяца культивирования

Линия каллуса	Доля диплоидных клеток, %	Содержание $H_2O_2$ , мкМ/г сухого веса (5%; медиана; 95%)	Морфогенная способность
2–5	80 ± 3	0.5; 1; 1.3	Эмбриогенный
1–10	83 ± 3	0.05; 0.09; 0.6	Эмбриогенный
3–12	19 ± 2	3.2; 7; 47.9	Геммогенный
1–18	10 ± 2	1.5; 10; 19.3	Неморфогенный

Табл. 2

Морфогенная способность, хромосомная изменчивость и содержание внутриклеточной  $H_2O_2$  в каллусных культурах *Fagopyrum esculentum* через 21 месяц культивирования

Линия каллуса	Доля диплоидных клеток, %	Содержание $H_2O_2$ , мкМ/г сухого веса (5%; медиана; 95%)	Морфогенная способность
2–5	45 ± 5	5.2; 5.8; 8.9	Слабо эмбриогенный
1–10	40 ± 4	3.5; 5.1; 8.7	Слабо эмбриогенный
3–12	79 ± 5	2.9; 3.3; 3.7	Геммогенный
1–18	95 ± 1	2.6; 5.1; 5.4	Ризогенный

Было установлено, что снижение регенерационного потенциала в линиях 2–5 и 1–10 коррелировало со снижением доли диплоидных клеток, тогда как проявление способности к ризогенезу в линии 1–18 сопровождалось увеличением доли диплоидных клеток (табл. 2).

Интересно отметить, что через 4 месяца культивирования в линии 3–12 морфогенная активность наблюдалась при низком числе диплоидных клеток, а через 21 месяц культивирования произошло значительное увеличение доли клеток с диплоидным набором хромосом. Этот факт подтверждает предположение о том, что при выполнении первичного цитогенетического анализа использовали еще нестабилизировавшуюся культуру, тогда как со временем в линии 3–12 произошла селекция клеток с типичным для морфогенных каллусов диплоидным набором хромосом.

Проведенные исследования показали, что полиплоидизация клеток в линиях 1–10 и 2–5 сопровождается увеличением содержания внутриклеточного пероксида водорода (табл. 1, 2). При увеличении доли диплоидных клеток в каллусах линий 3–12 и 1–18, наоборот, отмечается снижение уровня пероксида водорода в клетках. С одной стороны, можно предположить, что высокое содержание пероксида водорода в полиплоидных клетках является следствием увеличения размеров генома и обусловлено изменением активности ферментов, вносящих вклад в ее образование и разрушение. Кроме того, увеличение содержания пероксида водорода в полиплоидных клетках может быть необходимо для регуляции измененного генома, поскольку пероксид водорода выполняет сигнальные функции [8]. С другой стороны, увеличение внутриклеточного уровня АФК может являться не следствием, а причиной полиплоидизации клеток [24, 25]. В своих исследованиях мы установили связь между изменением хромосомного

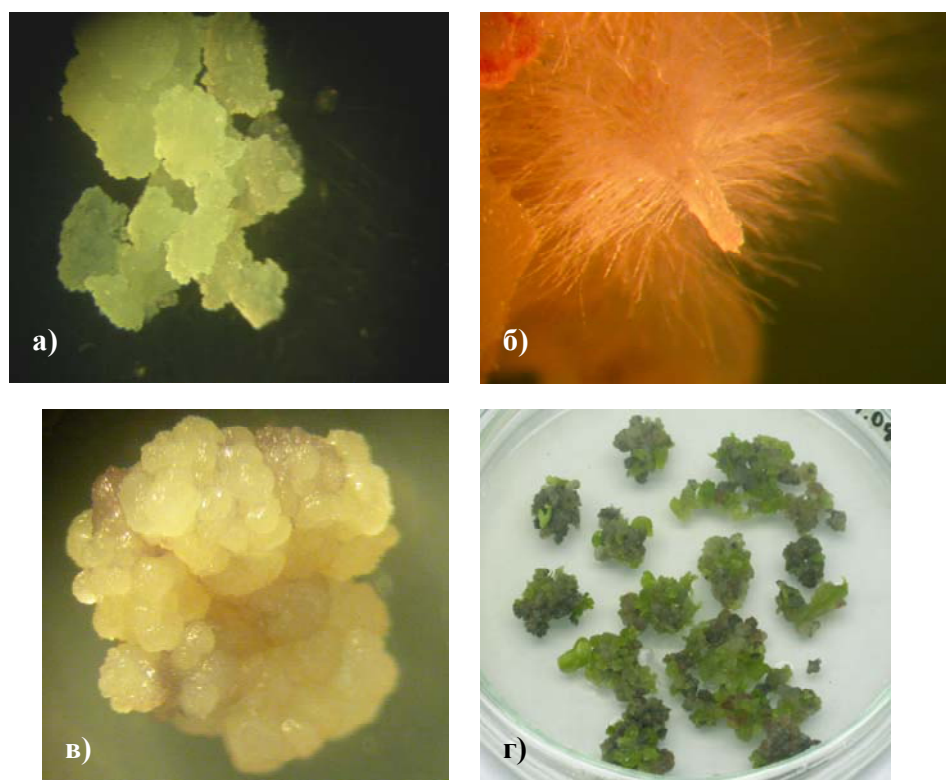


Рис. 1. Морфогенез в культурах гречихи посевной: а) общий вид линии 1–18, б) образование корней в линии 1–18, в) общий вид линии 3–12, г) геммогенез в линии 3–12

набора, содержанием пероксида водорода и изменением морфогенной способности (табл. 2). Приобретение способности к образованию корней (линия 1–18) сопровождалось увеличением доли диплоидных клеток и снижением внутриклеточного содержания пероксида водорода. В то время как в линиях 1–10 и 2–5 уменьшение частоты образования соматических зародышей коррелировало со снижением доли диплоидных клеток и увеличением уровня внутриклеточного пероксида водорода. Интересно отметить, что в линии 3–12, сохранившей способность к образованию почек на прежнем уровне, изменение хромосомного набора происходило также в сторону преобладания клеток с диплоидным набором, что коррелировало с уменьшением содержания пероксида водорода в клетках. Следует отметить, что значительного изменения морфологии клеток всех исследуемых культур не наблюдается, поэтому изменение содержания внутриклеточного пероксида водорода не было связано с изменением размеров клеток.

Таким образом, установлено, что в культурах гречихи посевной снижение регенерационной способности коррелирует с увеличением доли полиплоидных клеток и повышением внутриклеточного содержания  $H_2O_2$ , тогда как усиление морфогенной способности сопровождается увеличением доли диплоидных клеток и снижением содержания  $H_2O_2$  в клетках. Следует отметить, что прямой связи между содержанием внутриклеточного пероксида водорода с типом морфогенеза установлено не было.

Табл. 3

Изменение активности антиоксидантных ферментов в длительно культивируемых каллусах гречихи посевной, отн. ед/г сух. веса

Линия	СОД		Растворимая пероксидаза	
	через 4 месяца культивирования	через 21 месяц культивирования	через 4 месяца культивирования	через 21 месяц культивирования
2–5	46 ± 9	96 ± 3	33 ± 5	17 ± 2
1–10	57 ± 2	57 ± 5	41 ± 2	57 ± 5
3–12	43 ± 2	76 ± 2	11 ± 0.5	0.3 ± 0.03
1–18	104 ± 6	77 ± 1	21 ± 2	0.3 ± 0.04

Вариабельность содержания внутриклеточного пероксида водорода в клетках различных линий и при увеличении времени культивирования может быть связана с различием в активности антиоксидантных ферментов. Поэтому были исследованы активность супероксиддисмутазы (СОД) – фермента, осуществляющего дисмутацию супероксида в пероксид водорода и растворимой пероксидазы, использующей пероксид водорода для окисления различных субстратов. Следует отметить, что в литературе имеются данные о снижении активности антиоксидантных ферментов при потере морфогенной способности. Так, Пападакис с соавторами [26, 27] было установлено, что снижение тотипотентности протопластов коррелировало со снижением активности СОД, Бенсон с соавторами [28] выявлено, что в суспензионной культуре риса, потерявшей морфогенную способность, активность пероксидазы была значительно ниже по сравнению с регенерирующей культурой. Тем не менее нами не было выявлено четкой связи между активностью СОД и пероксидазы и изменением внутриклеточного содержания пероксида водорода и способности культур к морфогенезу (табл. 3). Так, снижение эмбриогенной способности в линии 2–5 через 21 месяц культивирования сопровождалось увеличением активности СОД, что коррелировало с увеличением содержания пероксида водорода в клетках. Напротив, в линии 1–10, в которой также наблюдали снижение эмбриогенной способности, изменения активности СОД не происходило, хотя содержание внутриклеточного пероксида водорода увеличивалось. Приобретение ризогенной способности в линии 1–18 сопровождалось снижением активности СОД и содержания пероксида водорода в клетках. В линии 3–12, сохранившей морфогенную способность на неизменном уровне в течение всего периода культивирования, отмечали увеличение активности СОД, хотя содержание внутриклеточного пероксида водорода снижалось.

Интересно отметить, что увеличение содержания пероксида водорода в клетках линии 2–5 происходило на фоне повышения активности СОД, тогда как в линии 1–10 оно наблюдалось при усилении активности пероксидазы. Поскольку известно, что отдельные изоферменты растворимой пероксидазы могут обладать оксидазной активностью и генерировать пероксид водорода [29], вероятно, что в линии 1–10 увеличение внутриклеточного содержания пероксида водорода происходило за счет увеличения активности пероксидазы. В линии 1–18 уменьшение внутриклеточного содержания пероксида водорода происходило при снижении активности как СОД, так и пероксидазы. Однако в линии 3–12

наблюдали низкую активность пероксидазы и низкое содержание пероксида водорода, хотя активность СОД возрастала по сравнению с ранее полученными результатами.

Можно предположить, что наблюдаемое различие активности ферментов связано с изменением уровня их экспрессии, так как полиплоидизация связана с увеличением копийности генов. При этом изменение экспрессии ферментов может быть связано как с увеличением числа копий гена самого фермента [30], так и с изменением числа регуляторов, например, факторов транскрипции [31, 32], а также сигнальных молекул. Поскольку мы наблюдаем в каллусах вариabельность по числу хромосом, велика вероятность их различия по качественному составу генома, что и может быть причиной различия каллусов в активности изучаемых антиоксидантных ферментов.

Таким образом, полученные результаты указывают на наличие связи между изменением морфогенной способности, генетической вариabельностью и изменением редокс-статуса каллусных клеток с увеличением времени культивирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 09-04-97039-р\_поволжье\_a).

### Summary

*G.V. Kamalova, L.R. Nigmatullina, N.I. Rumyantseva.* Alteration of Morpho-cytogenetical and Biochemical Characteristics of Cultured Cells of Common Buckwheat during Long-term Culturing.

The variation of chromosome numbers, the content of intracellular hydrogen peroxide and activity of antioxidative enzymes (superoxide dismutase and soluble peroxidase) in cells of long cultured (21 months) calli of common buckwheat having different morphogenic ability were investigated. On the basis of data obtained a conclusion was made that among calli of common buckwheat the cultures with predominance of diploid chromosome numbers and low intracellular content of hydrogen peroxide are able to morphogenesis. The loss of morphogenic potential with an increase in the time of culturing was accompanied by a decrease of the share of diploid cells and by an increase in the content of intracellular hydrogen peroxide. The activity of antioxidant enzymes did not reveal clear correlation with the morphogenic ability of the callus cultures. The obtained results indicate the presence of the correlation between the morphogenic ability, chromosome variation and change in redox-status of callus cells with an increase in the time of culturing.

**Key words:** common buckwheat *Fagopyrum esculentum* Moenh., calli, morphogenesis, oxidative stress, hydrogen peroxide, chromosome numbers

### Литература

1. *Siminis C.I., Kanellis A.K, Roubelakis-Angelakis K.A.* Catalase is differentially expressed in dividing and nondividing protoplasts // *Plant Physiol.* – 1994. – V. 105. – P. 1375–1383.
2. *de Marco A., Roubelakis-Angelakis K.A.* The complexity of enzymic control of hydrogen peroxide concentration may affect the regeneration potential of plant protoplasts // *Plant Physiol.* – 1996. – V. 110. – P. 137–145.
3. *de Marco A., Roubelakis-Angelakis K.A.* Hydrogen peroxide plays a bivalent role in the regeneration of protoplasts // *J. Plant Physiol.* – 1996. – V. 149. – P. 109–114.

4. Cui K., Xing G., Liu X., Xing G., Wang Y. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. // Plant Sci. – 1999. – V. 146. – P. 9–16.
5. Papadakis A.K., Roubelakis-Angelakis K.A. The generation of active oxygen species differs in tobacco and grapevine mesophyll protoplasts // Plant Physiol. – 1999. – V. 121. – P. 197–205.
6. Papadakis A.K., Siminis C.I., Roubelakis-Angelakis K.A. Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts // Plant Physiol. – 2001. – V. 126. – P. 434–444.
7. Neil S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants // J. Exp. Bot. – 2002. – V. 53, No 371. – P. 1237–1247.
8. Vranová E., Inzé D., Van Breusegem F. Signal transduction during oxidative stress // J. Exp. Bot. – 2002. – V. 53. – P. 1227–1236.
9. Libik M., Konieczny R., Pater B., Ślesak I., Miszański Z. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant // Plant Cell Rep. – 2005. – V. 23. – P. 834–841.
10. Konieczny R., Libik M., Tuleja M., Niewiadomska E., Miszański Z. Oxidative events during in vitro regeneration of sunflower // Acta Physiol. Plant. – 2008. – V. 30. – P. 71–79.
11. Benson E.E. Special symposium: in vitro plant recalcitrance Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2000. – V. 36. – P. 163–170.
12. Cassels A.C., Curry R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2001. – V. 64. – P. 145–157.
13. Румянцева Н.И., Сергеева Н.В., Хакимова Л.В., Сальников В.В., Гумерова Е.А., Лозовая В.В. Органогенез и соматический эмбриогенез в культуре двух видов гречихи // Физиол. растений. – 1989. – Т. 36, № 1. – С. 187–194.
14. Румянцева Н.И., Сальников В.В., Федосеева Н.В., Лозовая В.В. Особенности морфогенеза в длительно культивируемых каллусах гречихи // Физиол. растений. – 1992. – Т. 39, № 1. – С. 143–151.
15. Румянцева Н.И., Валиева А.И., Самохвалова Н.А., Мухитов А.Р., Агеева М.В., Лозовая В.В. Особенности лигнификации клеточных стенок каллусов гречихи, различающихся по способности к морфогенезу // Цитология. – 1998. – Т. 40, № 10. – С. 835–843.
16. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima R. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells // Exp. Cell Res. – 1968. – V. 50. – P. 151–158.
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and biomass assay with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, No 3. – P. 473–497.
18. Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G. Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants // Plant Physiol. – 2000. – V. 122, No 4. – P. 1379–1385.
19. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 430 с.
20. Полесская О.Г., Каширина Е.И., Алехина Н.Д. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде // Физиол. растений. – 2004. – Т. 51, № 5. – С. 686–691.
21. Menendez-Yuffa A., Fernandez da Silva R., Rios L., Xena de Enrech N. Mitotic aberrations in coffee (*Coffea Arabica* cv. 'Catimor') leaf explants and their derived embryogenic calli // Electron. J. Biotechnol. – 2000. – V. 3, No 2. – P. 161–166.



22. *Gmitter F.G.Jr, Ling X.B., Cai C.Y., Grosser J.W.* Colchicine-induced polyploidy in citrus embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets // *Plant Sci.* – 1991. – V. 74. – P. 135–141.
23. *Ezura H., Oosawa K.* Ploidy of somatic embryos and the ability to regenerate plantlets in melon (*Cucumis melo* L.) // *Plant Cell Rep.* – 1994. – V. 14. – P. 107–111.
24. *Константинов Ю.М., Ривкин М.И.* Возможный свободно-радикальный механизм возникновения соматической изменчивости у растений // *Культура клеток растений.* – М.: Наука, 1991. – С. 127–129.
25. *Gorla G. R., Malhi H., Gupta S.* Polyploidy associated with oxidative DNA injury attenuates proliferative potential of cells // *J. Cell Sci.* – 2001. – V. 114. – P. 2943–2951.
26. *Papadakis A.K., Roubelakis-Angelakis K.A.* The generation of active oxygen species differs in tobacco and grapevine mesophyll protoplasts // *Plant Physiol.* – 1999. – V. 121. – P. 197–205.
27. *Papadakis A.K., Siminis C.I., Roubelakis-Angelakis K.A.* Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts // *Plant Physiol.* – 2001. – V. 126. – P. 434–444.
28. *Benson E.E., Lynch P.T., Jones J.* Variation in free-radical damage in rice cell suspensions with different embryogenic potentials // *Planta.* – 1992. – V. 188. – P. 296–305.
29. *Shannon L.M.* Plant isoenzymes // *Annu. Rev. Plant Physiol.* – 1986. – V. 5, No 2. – P. 187–204.
30. *Wendel J.F.* Genome evolution in polyploids // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – V. 42. – P. 225–249.
31. *Chen Z.J.* Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2007. – V. 58. – P. 377–406.
32. *Osborn T., Pires J.C., Birchler J.C., James A., Auger D.L., Chen Z.J., Lee H-S., Comai L., Madlung A., Doerge R.W., Colot V., Martienssen R.A.* Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids // *Trends Genet.* – 2003. – V. 19, No 3. – P. 141–147.

Поступила в редакцию  
15.04.09

---

**Камалова Гузель Валерьевна** – младший научный сотрудник лаборатории физиологии и генетики культивируемых клеток Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН.

E-mail: [kam-guz@yandex.ru](mailto:kam-guz@yandex.ru)

**Нигматуллина Лилия Ринатовна** – студент кафедры физиологии и биотехнологии растений Казанского государственного университета.

E-mail: [nigmatullinalili@mail.ru](mailto:nigmatullinalili@mail.ru)

**Румянцева Наталья Ивановна** – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией физиологии и генетики культивируемых клеток Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН.

E-mail: [nat\\_rumyantseva@mail.ru](mailto:nat_rumyantseva@mail.ru)