

## Геномная изменчивость соматических клеток растений. 6. Изменчивость и отбор в процессе адаптации к условиям выращивания *in vitro*

В. А. Кунах

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

*Сделан обзор данных о динамике генетической структуры клеточных популяций, а также о роли и особенностях действия отбора в процессе адаптации клеток к условиям выращивания *in vitro*. Рассмотрены влияние условий выращивания, роль генотипа, фитогормонов и других факторов, регулирующих изменчивость и направление действия отбора. Показано, что адаптация клеток растений является многоступенчатым процессом. На первых этапах культивирования наблюдается физиологическая адаптация к условиям роста *in vitro*, позже происходят процессы генетической адаптации, выражающиеся в изменении генетической структуры клеточных популяций. В репрезентативных выборках штаммов в процессе адаптации наблюдаются все типы эволюции генетической структуры популяций — дивергенция, конвергенция и параллелизм. Выделены три периода в процессе адаптации: первичной популяции изолированных клеток, становления штамма, сформированного штамма. Разделение на периоды определяется типом, направлением и жесткостью отбора, действующего в клеточной популяции. Для сформированных (адаптированных) штаммов характерно наличие физиологического и генетического гомеостаза, обусловленного преимущественным действием стабилизирующего отбора. Сделано заключение о том, что адаптация клеток к условиям длительного выращивания в пассируемой культуре — это процесс формирования новой биологической системы в результате действия основных движущих факторов эволюции — изменчивости, наследственности, отбора и, видимо, дрейфа генов (генотипов). В целом изученное явление может представлять собой модель глубокой (но обратимой) регрессивной эволюции биологической системы — от многоклеточного уровня к одноклеточному.*

**Введение.** В предыдущих работах [1—3] было отмечено, что введение клеток высших растений в культуру *in vitro* — процесс сложный и многоэтапный. Он представляет собой по существу создание новой биологической системы — клоновой популяции, роль организмов в которой осуществляют клетки, изначально запрограммированные на выполнение определенных структурных и функциональных задач как часть многоклеточного организма. Это требует кардинальной перестройки как функций и метаболизма клеток, так и структуры клеточных популяций.

В настоящей работе рассмотрены особенности и динамика геномных реорганизаций, их роль, а также роль и особенности действия отбора в про-

цессе адаптации клеток к условиям выращивания *in vitro*.

Особенности адаптации и, в конечном счете, эволюции биологических сообществ наиболее четко могут быть выявлены при изучении динамики генетической структуры популяций, в нашем случае — клеточных популяций. Генетическая структура популяций устанавливается путем изучения частоты встречаемости отдельных генов и/или генотипов в репрезентативных выборках. Поэтому в работе проанализированы главным образом результаты, полученные при изучении генома отдельных клеток. Сегодня наиболее достоверными в этом плане являются данные, полученные при изучении числа и морфологии хромосом. Именно они и обсуждены в первую очередь.

Результаты этих исследований важны для популяционно-генетического анализа еще и потому,

что они дают представление об изменчивости как генотипа, так и фенотипа, поскольку кариотип является одним из важных морфологических признаков клетки.

**Изменчивость числа хромосом.** Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что в подавляющем большинстве случаев число хромосом в первичном каллусе в основном отражает хромосомные числа клеток исходного экспланта [2]. При пассировании клеток хромосомные числа существенно изменяются. Рассмотрим особенности этой изменчивости на примере результатов исследований, специально посвященных изучению этого вопроса на достаточно репрезентативной выборке клеточных штаммов.

В экспериментах была изучена динамика изменчивости числа хромосом в процессе пассирования выборки из 30 штаммов гаплоаппуса *Haploappus gracilis* (Nutt.) A. Gray ( $2n = 4$ ) из семейства *Asteraceae*. Штаммы получены от растений разного возраста (от 1 до 6 месяцев) и из разных органов — верхушечной меристемы, участков стеблей и листьев из разных ярусов и участков гипокотыля.

27 первичных каллусов, полученных из верхушечной меристемы, участков листьев и стеблей независимо от возраста растения состояли на 74—94 % из диплоидных клеток. Три каллуса из различных участков гипокотыля были полиплоидными, в двух из них наблюдали в основном тетраплоидные и октаплоидные митозы, а в одном — диплоидные (около 65 %) и тетраплоидные. (Возможные причины этих отличий рассмотрены нами в работе [2].)

В течение первых трех пассажей не было обнаружено существенных изменений соотношения клеток разных уровней плоидности по сравнению с первичным каллусом. Поэтому начальное распределение клеток по числу хромосом для каждого штамма рассмотрим в сумме за первые три пассажа (табл. 1).

Приведенные в этой таблице индексы штаммов — это аббревиатуры, обозначающие их происхождение. Первый знак в аббревиатуре — первая буква родового названия растения (Г — гаплоаппус). Второй знак — цифра, обозначающая возраст исходного растения в месяцах (от 1 до 6). Третий знак — буквы, обозначающие исходный эксплант: Л — лист, С — стебель, ТР — точка роста, Г — гипокотыль. Далее может быть либо буква, обозначающая ярус, из которого вычленялся эксплант (В — верхний, С — средний, Н — нижний), либо цифра, нумерующая экспланты, вычлененные из соседних участков растения. Последняя цифра через дефис (если она есть) всегда обозначает номер

экспланта при получении каллусов из соседних участков растения.

Из табл. 1 видно, что штаммы, полученные из участков листа и стебля, представляют собой совокупность со следующими лимитами: по числу диплоидных клеток 92,8 и 70,0 %; по числу триплоидных — 10,2 и 0,0 %; по числу тетраплоидных — 19,5 и 1,8 %. Соответствующий анализ, результаты которого приведены на рис. 1, показал, что распределение изученной выборки из 20 штаммов как по числу диплоидных, так и три- и тетраплоидных клеток соответствует нормальному ( $\chi^2 \leq 0,20$ ). Средние арифметические по каждому уровню плоидности совпадали со значением модальных штаммов выборки. Например, по диплоидным клеткам  $x = 83,0 \pm 1,5$  %. Значения модальных штаммов близки к этому числу: Г4СН-1 —  $83,3 \pm 2,6$  и Г4СС —  $82,3 \pm 1,8$  %. По триплоидным клеткам  $x = 5,1 \pm 0,5$  %; значение модальных штаммов: Г1Л —  $5,1 \pm 0,9$  и Г4ЛН —  $4,5 \pm 2,0$  %. По тетраплоидным клеткам  $x = 7,2 \pm 1,0$  %; значение модальных штаммов: Г6СВ —  $5,6 \pm 3,8$  и Г4ЛВ —  $5,3 \pm 2,1$  %.

Часть штаммов, представленных в табл. 1, характеризовалась относительной стабильностью плоидности в течение дальнейших лет культивирования. В частности, штамм Г2Л в течение около 7 лет культивирования более чем на 70 % состоял из диплоидных клеток ( $2n = 4$ ) при размахе изменчивости по числу хромосом от 2 до 32 (табл. 2). Вместе с тем в 8-м пассаже этого штамма было отмечено достоверное снижение частоты диплоидных и одновременно возрастание доли тетраплоидных клеток. Однако уже в 9-м пассаже соотношение клеток разных уровней плоидности возвратилось к исходному состоянию и в дальнейшем существенно не изменялось. Резкое падение частоты диплоидных клеток, а затем их возврат к исходному уровню совпали по времени с завершением формирования морфологических особенностей этого штамма, типа и темпа его роста, уменьшением размаха изменчивости по признаку «прирост биомассы за пассаж» (см. [3]). Таким образом, в штамме Г2Л процессы формирования морфологических и цитогенетических признаков завершились к 10-му пассажу. В процессе дальнейшего изучения, вплоть до 73-го пассажа, штамм характеризовался стабильностью изученных признаков как морфологических, так и цитологических. Подобные явления оказались свойственными и штаммам Г3Л-1 и Г4ТР.

Ряд других штаммов в процессе пассирования характеризовался более значительным изменением плоидности клеток, увеличением размаха изменчи-

Таблица 1

Распределение клеток по числу хромосом в течение первых трех пассажей каллусных тканей гаплопеплуса *H. gracilis*, полученных и выращиваемых на среде Эриксона, % (собственные данные)

Индекс штамма	Число изученных метафаз	Число наборов хромосом, n						Анеуплоидные
		1	2	3	4	5—7	≥ 8	

*Штаммы, полученные из участков листа и стебля растений разного возраста (1—6 месяцев)*

Г5Л	56	—	92,8±3,5	—	3,6±2,5	—	3,6±2,5	—
Г6СС	55	—	90,9±3,9	5,5±3,1	1,8±1,8	—	—	1,8
Г4ТР	230	0,9	90,0±2,0	2,6±1,0	4,8±1,4	—	—	1,7
Г4ЛС	265	1,1	89,4±1,9	4,1±1,2	3,9±1,2	0,4	—	1,1
Г4ЛВ	113	1,8	86,7±3,2	4,4±1,9	5,3±2,1	—	—	1,8
Г3С-2	140	—	86,4±2,9	7,1±2,2	4,4±1,7	—	0,7±0,7	1,4
Г6СВ	36	2,8	86,0±5,8	2,8±2,7	5,6±3,8	—	—	2,8
Г3Л-2	270	1,1	85,6±2,1	5,9±1,4	4,8±1,3	—	0,4±0,4	2,2
Г1Л	584	0,9	83,4±1,5	5,1±0,9	5,8±1,0	1,5	1,2±0,4	2,1
Г4СН-1	209	1,4	83,3±2,6	4,3±1,4	7,6±1,8	0,5	0,5±0,5	2,4
Г4СС	436	2,1	82,3±1,8	3,7±0,9	8,7±1,3	0,5	0,4±0,3	2,3
Г3С-1	269	1,5	81,1±2,4	9,3±1,8	3,3±1,1	—	—	4,8
Г4ЛН	112	0,9	79,5±3,8	4,5±2,0	7,9±2,5	3,6	2,7±1,6	0,9
Г2Л	447	1,8	78,4±1,9	10,2±1,4	6,1±1,1	2,1	1,4±0,6	—
Г3Л-1	500	1,2	78,2±1,8	8,0±1,2	4,6±0,9	1,6	0,4±0,3	6,0
Г6ЛВ	160	—	78,1±3,3	3,8±1,5	12,5±2,6	0,6	5,0±1,7	—
Г4ЛС-1	91	2,2	76,9±4,4	3,3±1,9	9,9±3,1	1,1	—	6,6
Г4СН-2	119	4,2	75,6±3,9	8,4±2,5	8,4±2,5	0,8	—	2,6
Г5С	154	1,3	75,4±3,5	2,6±1,3	19,5±3,2	—	0,6±0,6	0,6
Г6Л	60	6,5	70,0±5,9	6,8±3,3	8,3±3,6	—	6,7±3,3	1,7

*Штаммы, полученные из участков гипокотыля четырехмесячных растений*

Г4Г-1	125	—	64,8±4,3	2,4±1,4	31,2±4,1	0,8	0,8±0,8	—
Г4Г-2	130	2,3	10,8±2,7	5,4±2,0	36,8±4,2	8,5	36,2±4,2	—
Г4Г-3	187	2,1	10,7±2,5	4,3±1,5	34,8±3,5	8,6	39,5±3,7	—

ности по числу хромосом, изменением модального класса. При этом из аналогичного по происхождению и пloidности первичного каллуса могут формироваться цитогенетически отличающиеся штаммы. Рассмотрим это на некоторых примерах, представленных на рис. 2 и 3 (см. также табл. 1).

Штаммы листового происхождения Г2Л и Г3Л-1, как уже отмечалось, были диплоидными в течение 7 лет изучения. Штамм Г4ЛС, также листового

происхождения, сформировался как высокопloidный с октапloidным модальным классом (рис. 2, Б). Два соседних участка стебля из одного и того же растения дали первичный каллус, из которого сформировались цитогенетически отличающиеся штаммы Г3С-1 и Г3С-2 (рис. 2, А и 3, А). В то же время от разных по пloidности первичных каллусов (дипloidного стеблевого происхождения) и высокопloidного каллуса из гипокотыля сформирова-

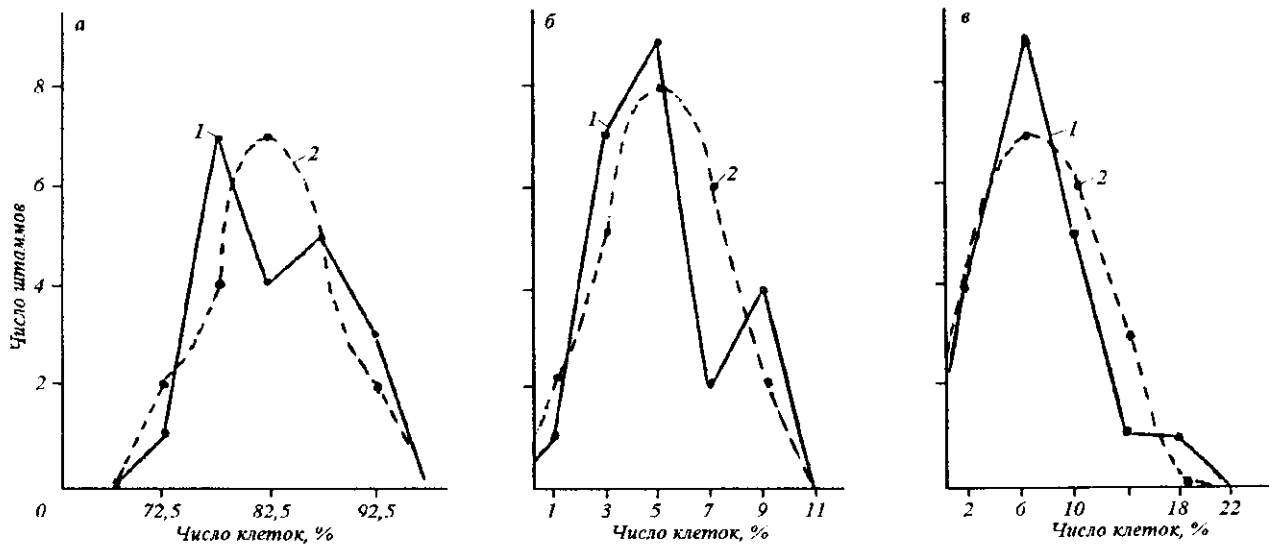


Рис. 1. Распределение выборки из 20 каллусов гаплопаппуса *H. gracilis* по числу диплоидных (а), триплоидных (б) и тетраплоидных (в) наборов хромосом: 1 — эмпирическое и 2 — нормальное (расчетное) распределение

лись штаммы ГЗС-2 и Г4Г-3, цитогенетически не отличимые (рис. 3). Эти различия сформировались у штаммов при их получении и выращивании в одинаковых условиях на питательной среде Эрикасона.

В сформировавшихся штаммах как диплоидных, так и полиплоидных с разным размахом изменчивости по числу хромосом, с четко и нечетко выраженным модальным классом и т. д. при дальнейшем пассировании в постоянных условиях существенных изменений числа хромосом не наблюдали. Очевидно, для сформированных штаммов гаплопаппуса, характеризующихся установившимся динамическим равновесием клеток различных уровней плоидности, в стабильных условиях выращивания это равновесие поддерживается без заметных изменений в течение достаточно большого числа пассажей. Экспериментальные данные изучения этих штаммов изложены в работах [4—7].

Анализ полученных данных позволил нам выделить пять основных типов изменчивости хромосомных чисел в процессе формирования штаммов гаплопаппуса (рис. 4). Из приведенных обобщенных данных видно, что в процессе формирования штаммов наблюдались все возможные типы эволюции числа хромосом: параллельная изменчивость,

дивергенция, а при различном исходном уровне плоидности также и конвергенция. Происхождение исходного материала, уровень его плоидности не оказывали решающего влияния на направление эволюции числа хромосом, на уровень плоидности сформировавшегося штамма. Эти явления оказались свойственны популяциям культивируемых клеток и других изученных видов растений.

Например, при изучении выборки из 22 штаммов скерды *Crepis capillaris* L. (Wallr) ( $2n=6$ ) в течение первого года культивирования наблюдали интенсивные процессы изменчивости как морфологических и других особенностей штаммов, так и числа хромосом. Установлены дивергенция штаммов, в том числе по набору хромосом, и параллельная их изменчивость. Отличие заключалось в том, что у гаплопаппуса соотношение между клетками с разным числом хромосом устанавливалось к 8—12-му пассажу и в дальнейшем оставалось, как правило, стабильным, а у креписа процессы изменчивости наблюдались в ряде случаев и при дальнейшем пассировании. Кроме того, у креписа чаще формировались штаммы с более широким размахом изменчивости по числу хромосом, нечетко выраженным модальным классом, доминированием полиплоидных клеток с анеуплоидным числом хромосом

Таблица 2

Динамика числа клеток разных уровней пloidности в штамме гаплопептуса листового происхождения Г2Л в процессе длительного пассирования на среде Эриксона, % (собственные данные)

Номер пассажа	Число изученных метафаз, шт.	Число наборов хромосом, n					Анеуплоидные
		1	2	3	4	> 4	
1	192	2,6±1,1	71,8±3,2	9,4±2,1	7,8±1,9	1,6±0,9	6,8±1,8
2	125	1,6±1,1	79,2±3,6	11,2±2,8	3,2±1,6	1,6±1,1	3,2±1,6
3	225	0,9±0,6	72,2±3,0	14,5±2,3	5,2±1,5	3,2±1,2	4,0±1,3
4	447	0,4±0,3	79,4±1,9	9,2±1,4	5,4±1,1	1,8±0,6	3,8±0,9
5	81	1,2±1,2	79,0±4,5	7,8±3,0	3,6±2,1	3,6±2,1	4,8±2,4
6	215	1,8±0,9	81,4±2,7	8,8±1,9	3,7±1,3	1,5±0,8	2,8±1,1
7	666	1,7±0,5	74,7±1,7	10,4±1,2	9,1±1,1	0,9±0,4	3,4±0,7
8	102	4,0±1,9	46,0±5,0	9,0±2,9	30,0±4,6	8,0±2,7	3,0±1,7
9	37	—	86,4±5,6	5,5±3,7	8,1±4,5	—	—
10	200	0,5±0,5	78,0±2,9	8,5±2,0	10,5±2,2	1,0±0,7	1,5±0,9
11	294	1,7±0,8	79,3±2,4	9,5±1,7	6,8±1,5	0,3±0,3	2,4±0,9
15	235	—	71,0±3,0	9,4±1,9	12,7±2,2	4,7±1,4	2,2±1,0
20	156	1,3±0,9	73,8±3,5	7,6±2,1	14,6±2,8	—	2,6±1,3
30	66	3,0±2,1	72,7±5,5	7,6±3,3	4,5±2,6	3,0±2,1	9,1±3,5
36	381	2,4±0,8	82,4±2,0	5,8±1,2	1,5±0,6	—	—
45	100	1,0±1,0	73,0±4,4	7,0±2,6	5,0±2,2	10,0±3,0	4,0±2,0
51	100	3,0±1,7	75,0±4,3	10,0±3,0	6,0±2,4	3,0±1,7	3,0±1,7
58	100	1,0±1,0	71,0±4,5	8,0±2,7	10,0±3,0	5,0±2,2	5,0±2,2
73	273	—	84,6±2,2	2,9±1,0	5,9±1,4	5,5±1,4	1,1±0,6

[6—8]. Подобные результаты на креписе были получены и другими авторами [9—13].

У гороха, по данным многих авторов, при длительном пассировании также формируются штаммы разных уровней пloidности [12, 14—19]. Анализ этих результатов показал, что независимо от генотипа (сорта, линии) и тканевой принадлежности исходного экспланта в процессе пассирования наблюдались все типы изменчивости числа хромосом, представленные на рис. 4. Подобные результаты были получены при изучении нескольких десятков каллусных штаммов табака из участков молодых листьев гаплоида, диплоида и пыльников диплоида [20—23], каллусных тканей томатов из участков листьев гаплоидного, диплоидного и тетраплоидного растений, а также из пыльников диплоидов [20, 24—26].

У томатов были отмечены и некоторые интересные особенности. В частности, различия в рас-

пределении клеток по числу хромосом, обусловленные разным уровнем пloidности исходного материала, наблюдались только в первичном каллусе и в некоторых случаях в течение первых одного—двух пассажей. При этом в первичных каллусах преобладали клетки с уменьшенным против исходного числом хромосом, особенно в каллусах тетраплоидного и, в меньшей степени, диплоидного происхождения.

При пассировании такие клетки вытеснялись полиплоидными. Более интенсивно процессы полиплоидизации происходили у штаммов гаплоидного и диплоидного происхождения. В результате из разного исходного материала сформировались практически неотличимые миксоплоидные штаммы без четко выраженного модального класса. Во всех 23 изученных штаммах 50 % и более составляли анеуплоидные клетки при размахе изменчивости по числу хромосом от гипогаметоидных до более чем

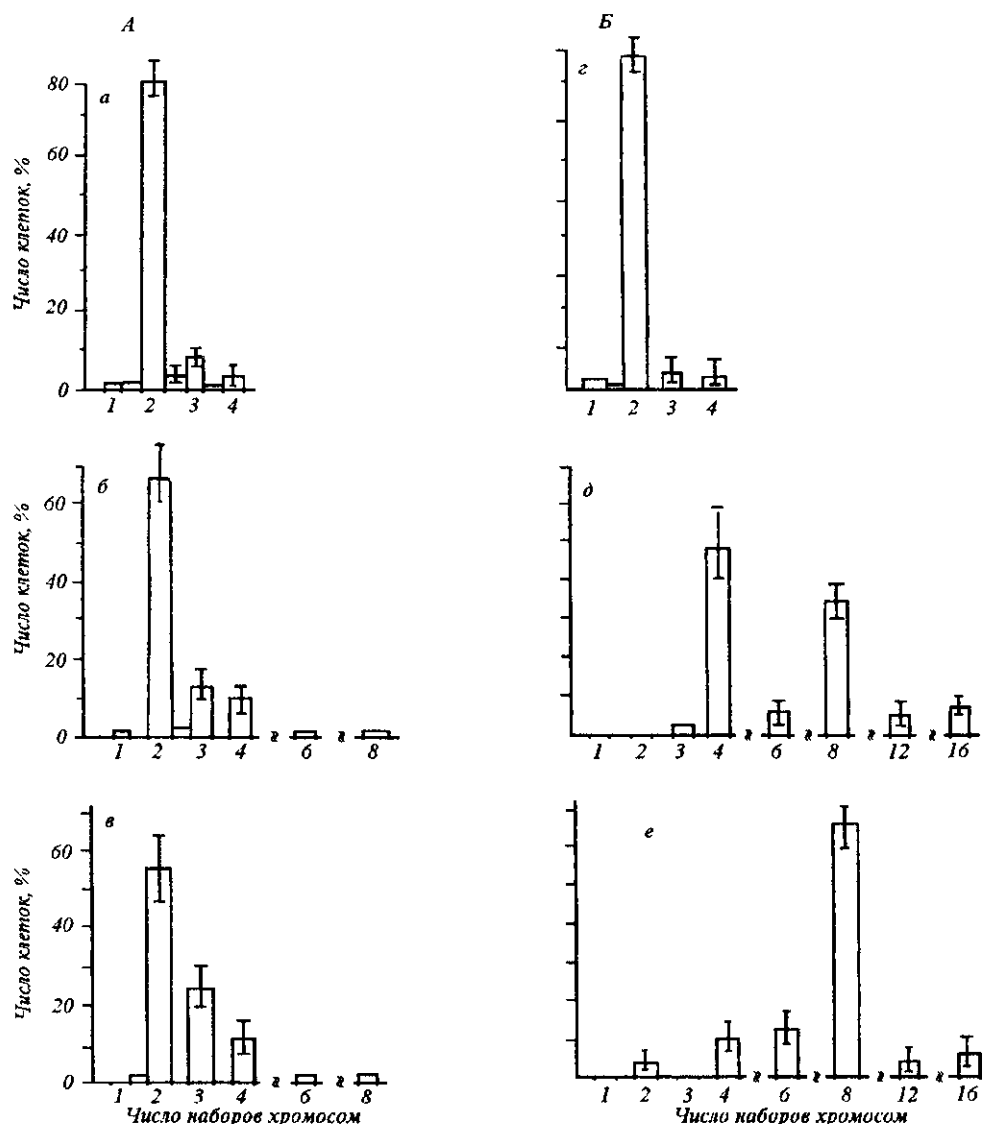


Рис. 2. Дивергенция на примере динамики распределения хромосомных чисел в штаммах ГЗС-1 (А) и Г4ЛС (Б) гаплопантуса в процессе пассирования (пассажи: а, б — 1—3-й; в — 5-й; г — 7—16-й; д — 7-й; е — 12—23-й)

16n [24, 25]. Следовательно, для популяций культивируемых клеток томатов существует, вероятно, независящее от пloidности исходного материала оптимальное соотношение между клетками с различным числом хромосом, при котором пассируемые ткани оказываются наиболее приспособленными к условиям роста *in vitro*, что, очевидно, и явилось причиной в данном случае преимущественно конвергентной эволюции числа хромосом.

Подобное явление конвергенции клеточных по-

пуляций по числу хромосом было описано при изучении каллусных тканей, полученных от диплоидного и тетраплоидного растений кормовой [27] и сахарной свеклы [28], а также белены *Hyoscyamus muticus* [29, 30]. При этом у белены на первых этапах культивирования отмечен очень широкий размах изменчивости по числу хромосом, вплоть до 60 при  $2n = 28$ , а к 8—12 месяцам в обоих типах тканей белены, как и свеклы, преобладали клетки с числом хромосом, близкими к тетраплоидному.

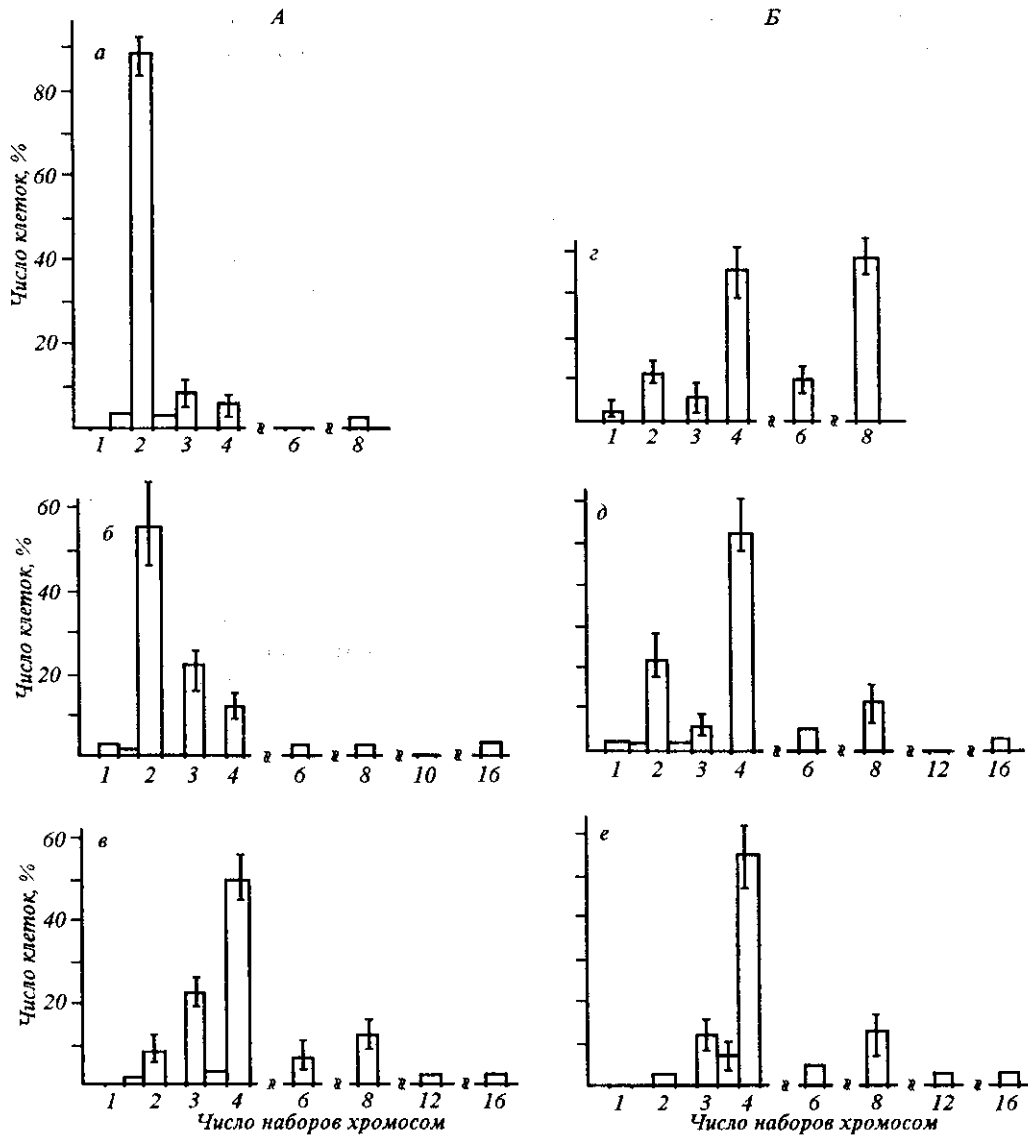


Рис. 3. Конвергенция на примере динамики распределения хромосомных чисел в штаммах ГЗС-2 (А) и Г4Г-3 (Б) гаплоидуса в процессе пассирования (пассажи: а — 1—3-й; б — 5-й; в — 8—12-й; г — 1—2-й; д — 4-й; е — 11—22-й)

Конвергенция наряду с параллелизмом установлена также для многих злаковых культур при использовании различного исходного материала, который образовывал отличающиеся первичные каллусы.

Например, у ржи *Secale cereale* в каллусных тканях, полученных из незрелого зародыша, уровень пloidности клеток в процессе формирования штамма существенно не изменялся. В результате был сформирован штамм, состоящий более чем на две трети из диплоидных клеток. В каллусных

тканях, полученных из пыльников, в процессе пассирования наблюдали полиплоидизацию, результатом которой явилось исчезновение гаплоидных клеток и формирование штамма, состоящего из диплоидных и полиплоидных клеток с примерно одинаковой частотой (табл. 3).

У кукурузы *Zea mays* изучали каллусные ткани, полученные от двух линий, различающихся по способности к каллусообразованию и, кроме того, по количеству гетерохроматина и его распределению в хромосомах (см. [31]). Первичные каллусы

существенно отличались по числу хромосом — клетки одной линии (ВИР-27) были в подавляющем числе диплоидными, а каллус другой линии (ЧК 218) содержал, кроме диплоидных, заметное количество три- и тетраплоидных клеток. В про-

цессе пассирования установленные различия нивелировались и сформированные штаммы не отличались друг от друга по изученным признакам, в том числе и по пloidности [32, 33].

В течение около двух лет изучения оставались диплоидными шесть клеточных штаммов малохромосомного злака *Zingieria biebersteiniana* (Claus) P. Smirn. ( $2n = 4$ ), полученных из разных органов (табл. 4). В процессе формирования штаммов зингерии существенных изменений не отмечено и в приросте биомассы. Следовательно, для данной культуры свойствен первый тип изменчивости как прироста биомассы (см. [3], рис. 1), так и числа хромосом (см. [34]).

Изложенные здесь и другие имеющиеся в литературе данные (см., например, [35—55]) свидетельствуют о том, что в каждом конкретном случае наблюдаются свои специфические черты изменчивости числа хромосом и количества ДНК в процессе адаптации клеток к условиям в пассируемой культуре. Определенное влияние на процессы изменчивости оказывают видовая принадлежность растения, особенности его генотипа и другие внутренние и внешние факторы, роль которых на первых этапах каллусообразования описана нами ранее [2].

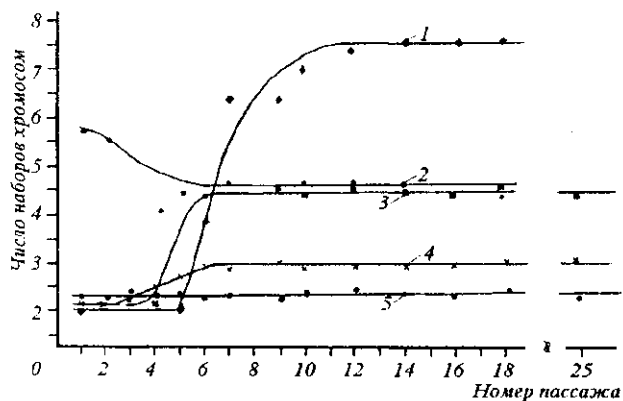


Рис. 4. Основные типы изменчивости среднего числа хромосом на клетку в процессе формирования клеточных штаммов гаплопаллуса: 1 — 4-й; 2 — 5-й; 3 — 3-й; 4 — 2-й; 5 — 1-й

Таблица 3

Динамика числа клеток разных уровней пloidности в штаммах ржи сорта *Веселоподольская*, полученных и выращиваемых на среде МС, % (данные получены совместно с Г. Н. Юрковой и Б. А. Левенко)

Номер пассажа	Число изученных метафаз, шт.	Число наборов хромосом, n					Анеуплоидные
		1	2	3	4	> 4	
<i>Каллус из зародыша</i>							
2	100	—	93,0±2,6	—	7,0±2,6	—	—
3	71	4,2±2,4	73,2±5,3	—	—	22,6±5,0	—
4	100	—	87,0±3,4	—	11,0±3,1	2,0±1,4	—
10	50	2,0±2,0	76,0±6,0	4,0±2,2	12,0±4,6	6,0±3,4	—
12	100	—	83,0±3,8	2,0±1,4	11,0±3,1	4,0±2,0	—
<i>Каллус из пыльника</i>							
1	64	68,8±5,8	14,0±4,3	1,6±1,6	—	—	15,6±4,5
2	53	43,4±6,8	39,6±6,7	—	7,6±3,6	—	9,4±4,0
3	24	33,3±9,6	58,4±10,1	—	8,3±5,6	—	—
11	100	3,0±1,7	49,0±5,0	7,0±2,6	35,0±4,8	6,0±2,4	—
12	100	—	51,0±5,0	3,0±1,7	34,0±4,7	8,0±2,7	4,0±2,0



Таблица 4

Динамика числа клеток разных уровней плоидности в штаммах зингерии *Zingiber biebersteiniana*, полученных и выращиваемых на среде В5, % (данные получены совместно с Б. А. Левенко и Г. Н. Юрковой)

Индекс штамма	Номер пассажа	Число изученных метафаз, шт.	Число наборов хромосом, n						Анеуплоидные
			1	2	3	4	8	≥ 8	
<i>Каллус из участков оси колоса</i>									
№ 1	0	209	—	99,0±0,7	—	—	—	—	1,0±0,7
	1	98	—	99,0±1,0	—	—	—	—	1,0±1,0
	17	98	—	96,0±2,0	—	2,0±1,4	—	—	2,0±1,4
	20	115	—	99,1±0,9	—	—	—	—	0,9±0,9
№ 2	1	80	—	97,5±1,7	—	2,5±1,7	—	—	—
	17	12	—	100,0	—	—	—	—	—
№ 3	17	17	—	100,0	—	—	—	—	—
	20	92	—	96,7±1,9	2,2	—	—	—	1,1±1,1
<i>Каллус из участков мезокотила проростков</i>									
№ 11	0	58	—	86,2±4,5	—	5,2±2,9	6,9	1,7	—
	17	63	—	98,4±1,6	—	—	—	—	1,6±1,6
	20	78	—	100,0	—	—	—	—	—
№ 13	17	134	0,7	88,1±2,8	6,0	1,5±1,1	—	—	3,7±1,6
	20	118	—	98,3±1,2	—	—	—	—	1,7Cl,2
№ 14	17	77	—	100,0	—	—	—	—	—

В частности, уровень, типы и размах изменчивости, а также направление эволюции числа хромосом в клеточных популяциях могут зависеть от вида растения. В большинстве известных случаев модальный класс в сформированных штаммах составляют клетки с числом хромосом в пределах  $2n-4n$  независимо от уровня плоидности исходного материала. Для некоторых видов растений свойственно преимущественное формирование штаммов с модальным классом, состоящим из клеток, содержащих 8—10 наборов хромосом. Это, например, *Urginea indica* (см. [55]) и *Rhodiola rosea* (наши неопубликованные данные). Изменение числа хромосом у одних растений идет очень быстро, в частности, у томатов или у той же *U. indica* (см. [55, 56]), у других — медленно, например, у некоторых сложноцветных, бобовых и злаковых. В результате у отдельных растений, особенно у видов с простыми (не полиплоидными) геномами, число хромосом в процессе адаптации клеток к условиям

роста *in vitro* изменяется незначительно, клеточные штаммы таких растений чаще и длительное время остаются диплоидными. У видов с полиплоидными геномами, как правило, наблюдается редукция числа хромосом, дольше сохраняется гаплоидный статус при получении культуры из гаплоидных клеток. Например, в каллусных тканях, полученных из пыльников ржи, гаплоидные клетки исчезали быстро, а в аналогичных случаях у мягкой пшеницы в некоторых случаях отмечали даже возрастание их частоты [36]. У пшеницы однозернянки (диплоидный вид) в процессе пассирования наблюдали преимущественно полиплоидизацию клеток [44], а у твердой (тетраплоид) и мягкой (гексаплоид) пшениц — редукцию числа хромосом, что приводило к значительной анеуплоидизации [45].

Процессы редукции числа хромосом в культивируемых клетках полиплоидных видов растений могли приводить к формированию клеток с числом хромосом ниже гаплоидного. Это, например, описа-

но в опытах с дигиплоидами картофеля *S. tuberosum*, где при культивировании пыльников наблюдали клетки, содержащие 12 хромосом при  $n = 2x = 24$  [57], в наших опытах с томатами *Lycopersicon esculentum* ( $2n = 24$ ), в каллусных клетках которых наблюдали в ряде случаев девять и шесть хромосом (неопубликованные данные), и в работах других авторов [58].

У других растений, например, у нута *Cicer arietinum* и его близких диких видов *C. bijugum* и *C. judaicum* изменчивость числа хромосом шла путем эндоредупликации, о чем свидетельствуют значительное преобладание ортоплоидных клеток ( $2n$ ,  $4n$  и  $8n$ ) и низкая частота три- и пентаплоидных клеток [59]. Выраженность такого рода процессов, как отмечалось выше, часто зависит и от особенностей генотипа изучаемых растений. Например, в каллусах картофеля, полученных от форм с одинаковым уровнем пloidности, но разных генотипов, была установлена различная тенденция к полиплоидизации клеток [60]. Такая же ситуация описана и для кукурузы, на основании чего автор делает вывод о том, что генотип играет определяющую роль в стабильности кариотипа *in vitro* [61].

Вместе с тем практически для всех изученных культур растительных клеток выявляется ряд общих признаков, заключающихся в следующем.

Клетки первичного каллуса, как правило, мало отличаются по числу хромосом от клеток исходного экспланта. В процессе пассирования хромосомные числа, за редким исключением, существенно изменяются. Наиболее значимые изменения происходят в течение, в основном, первых 7—10, иногда 12 пассажей. При этом как направленные (векторизованные) изменения, так и наиболее существенные колебания хромосомных чисел наблюдаются в клеточных популяциях практически одновременно с изменением прироста биомассы, увеличением размаха изменчивости по этому признаку, нарушением суточного ритма митотической активности, изменениями длительности клеточного цикла в целом и митоза в частности. В этом периоде, названном автором периодом становления штаммов, наблюдаются все возможные типы эволюции клеточных популяций по числу хромосом — дивергенция, параллелизм и конвергенция подобно тому, как это описано и для морфологических особенностей штаммов (см. [3]). Адаптированные, сформированные штаммы в постоянных условиях выращивания характеризуются, как правило, стабильным соотношением между клетками с различным числом хромосом. Возникшее в конце периода становления соотношение является динамически равновесным.

Подтверждением этому является то, что выращивание сформированных штаммов в разных лабораториях (зачастую в отличающихся условиях и на разных по составу питательных средах) не приводило к заметным изменениям числа хромосом. Равновесие между клетками с различным числом хромосом (при наличии некоторых флуктуаций) сохраняется на фоне перманентно протекающих (в ряде случаев с высокой частотой) процессов, приводящих к возникновению клеток с изменениями числа хромосом [4, 7, 11, 12, 24, 62].

**Структурные перестройки хромосом.** Перенос клеток растений в условия роста *in vitro* приводит к резкому повышению частоты структурных мутаций (аббераций) хромосом. Уровень и типы перестроек в процессе формирования пассируемых клеточных штаммов, как правило, существенно изменяются.

Приступая к анализу конкретных примеров следует отметить, что реализованные перестройки выявляются в виде фрагментов и мостов с фрагментами, чаще всего в анафазе этого же митоза. Показателем «свежего» разрыва хромосом является наличие в анафазе одного или нескольких фрагментов. Мосты без фрагментов — это, как правило, результат сохранения в клеточных поколениях дицентрических хромосом в результате цикла мостов «разрыв—слияние—мост» [62, 63]. Наблюдаемые в культуре *in vitro* типы аббераций хромосом свидетельствуют о том, что общий уровень аббераций является суммарным результатом «свежих» разрывов и цикла мостов, т. е. «переживающих» аббераций. Вклад каждого из этих механизмов в процессе адаптации к условиям роста *in vitro* изменяется, что, в конечном счете, и определяет особенности динамики структурных перестроек хромосом [62].

Например, при изучении описанной выше выборки штаммов гаплопаллуса было установлено, что для первичных каллусов диплоидного происхождения характерен невысокий размах изменчивости по уровню аббераций — 0,8—4,9 % со средним значением  $2,9 \pm 0,4$  %. В первом—четвертом пассажах размах изменчивости увеличился, он составлял 0,7—7,2%, но средний уровень мутаций остался таким же. Сходным был он и у штамма, полученного от тетраплоидного растения. В дальнейшем наблюдали дивергенцию штаммов по числу структурных мутаций — у некоторых из них, например у штамма Г2Л, отмечено снижение частоты мутирования, у большинства же уровень мутаций существенно не изменялся, а у штаммов ГЗС, Г4ТР, ГЗЛ-1 и особенно у Г6Ц-1 — возрос. В результате выборка сформированных штаммов (после года культивирования) характеризовалась

большим размахом изменчивости по частоте анафаз с повреждениями хромосом — от 0,7 до 43,1 % со средним значением  $5,48 \pm 0,17$  %. Сходные результаты были получены и для других изученных культур многих видов растений, которые опубликованы в работах [14, 16, 37, 42, 62, 64—66].

Анализ полученных данных позволил выделить несколько основных типов изменчивости уровня aberrаций, свойственных изученной выборке (рис. 5). Сопоставление этих результатов с данными, представленными на рис. 4, а также с изложенными в предыдущей работе [3] показало, что наиболее существенные изменения уровня структурных перестроек, дивергенция и конвергенция штаммов по этому признаку происходят одновременно с изменениями темпа роста каллуса, его морфологии, ритма митотической активности, длительности клеточного цикла и пloidности клеточных популяций. В это же время наблюдали наиболее существенные изменения степени поражения поврежденных клеток и спектра aberrаций хромосом [62].

В первичных каллусах и в некоторых случаях в течение первых одного—двух пассажей среди перестроек преобладали фрагменты. Изменения уровня aberrаций, наблюдаемые при дальнейшем пассировании, происходили за счет клеток с мостами без фрагментов (рис. 6). Расчеты, основанные на анализе изменений соотношения мостов без фрагментов и анафаз с фрагментами, т. е. доли «переживающих» и «свежих» разрывов, показали следующее.

Поврежденные клетки в первичном каллусе делятся не более двух раз. В периоде становления и в сформированных штаммах клетка после реализации перестройки проходит в среднем один—два цикла при низких уровнях мутирования и три—четыре цикла — при высоких уровнях анафаз с aberrациями хромосом. Следовательно, в основе дивергенции штаммов по уровню aberrаций лежит изменение интенсивности элиминации клеток с повреждениями хромосом. В диплоидных штаммах, как правило, наблюдается более жесткая элиминация поврежденных клеток. В результате здесь ниже общий уровень поврежденных анафаз, а среди повреждений существенную долю составляют фрагменты. Более высокая частота клеток с «переживающими» aberrациями хромосом и соответственно более высокий общий уровень aberrаций, а среди них высокая доля клеток с мостами в полиплоидных штаммах могут быть объяснены тем, что высокая степень дублирования хромосомного материала обеспечивает повышенную жизнеспособность клеток со значительными нехватками участков и целых хромосом, возникающих в результате цикла

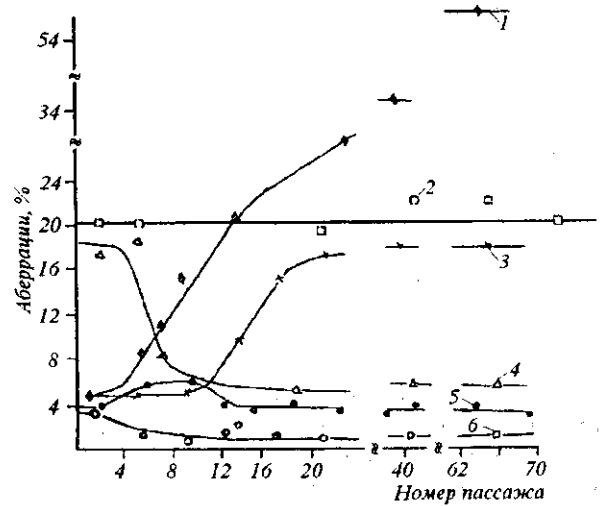


Рис. 5. Основные типы изменчивости уровня анафазных aberrаций хромосом в процессе пассирования клеточных штаммов: 1 — 5-й; 2 — 6-й; 3 — 4-й; 4 — 3-й; 5 — 2-й; 6 — 1-й

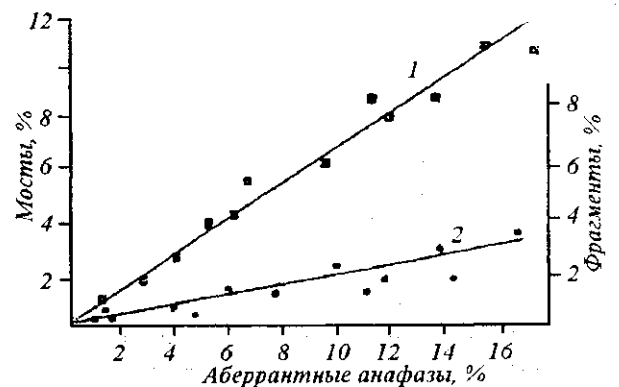


Рис. 6. Вклад клеток с мостами (1) и клеток с фрагментами (2) в общий уровень aberrантных анафаз на примере культуры тканей гаплопаппуса

мостов. Клеточные популяции сформированных штаммов характеризуются, как правило, постоянным уровнем и типом aberrаций, что может быть

обусловлено установлением в них динамического равновесия между процессами возникновения перестроек хромосом и клеточного отбора. Более подробно эти результаты изложены в работе [62].

**Изменчивость морфологии хромосом.** Высокая частота структурных перестроек хромосом, которая может достигать в некоторых штаммах 50 % и более от числа делящихся клеток, а также длительное переживание перестроек из митоза в митоз в результате цикла «разрыв—слияние—мост» на фоне ослабленного стабилизирующего отбора приводят к изменениям морфологии хромосом [62].

Первым детально проведенным исследованием в этой области является работа Сакристан [67]. Автор показала, что в клетках *C. capillaris in vitro* с высокой частотой встречаются транслоцированные хромосомы. В некоторых штаммах при этом сохраняется диплоидное число хромосом, однако анализ морфологии показал их псевдодиплоидность.

Позже подобные данные были получены не только на креписе, но и на гаглопаппусе, бобах, лилии, пшенице, ячмене и на других объектах, в основном, с применением метода дифференциальной окраски хромосом [11, 13, 42, 62, 68—76]. При этом было установлено, что у растений со сложным амфиполиплоидным геномом хромосомы, принадлежащие к разным геномам, изменяются по-разному. Например, у пшеницы *Triticum timopheevii* ( $2n = 4x = A' A' GG$ ) число перестроек морфологии хромосом и разнообразие их вариантов в суспензионной культуре было большим для G генома, чем для генома A', в то же самое время анализ анеуплоидных метафаз показал, что процесс элиминации хромосом в большей степени затронул A' геном [76].

Изложенные результаты были получены при изучении, как правило, длительно пассируемых сформированных штаммов. Анализ динамики кариотипической изменчивости культивируемых клеток скерды *C. capillaris* с использованием C-метода дифференциального окрашивания хромосом, проведенный нами, выявил следующие особенности этой изменчивости [8].

Анализировали кариотипы в корешках проростков и в каллусных тканях, полученных от растений этой же популяции, начиная с первичного каллуса и в течение около двух лет пассирования. При анализе первичного каллуса заметных различий по числу и морфологии хромосом и по распределению C-полос по сравнению с интактными растениями не было обнаружено. После трех месяцев культивирования (во втором пассаже) около 10 %

составляли клетки, кариотипы которых были сходны с таковыми интактного растения. Остальные метафазы были как с измененным числом и морфологией хромосом (около 25 %), так и морфологически сходные с метафазами интактного растения, но с различающимся рисунком дифференциального окрашивания. В четвертом пассаже около 30 % составляли анеуплоиды и шестихромосомные наборы ( $2n = 6$ ) с сильно измененной морфологией хромосом. Пластинок, сходных по окрашиванию с метафазами интактного растения, не наблюдали. Начиная с девятого пассажа, в ткани доминировали анеуплоидные, в частности, семихромосомные клетки, в сумме они составляли до 60 %. Их анализ показал, что шесть из такого семихромосомного набора сходны по морфологии с хромосомами интактного растения (но имели существенные отличия в рисунке окрашивания), а седьмая дополнительная хромосома встречалась двух типов: 1) крупный акроцентрик, по размеру и морфологии близкий к A-хромосоме набора и 2) метацентрик, близкий по размеру (но не по морфологии) к C-хромосоме. Эти два типа семихромосомных метафаз встречались с приблизительно одинаковой частотой. Наблюдаемая в 13-м пассаже картина была сходна с таковой в девятом пассаже.

По данным других исследователей [11], в каллусных тканях *C. capillaris* в первых пассажах доминировали тетраплоидные и высокоплоидные клетки. Начиная с пятого пассажа появились и стали модальными клетки с семью хромосомами. Авторы отмечают, что в этих клетках было три пары хромосом, типичных для креписа, а седьмая хромосома образовалась в результате транслокации и состоит из длинного плеча хромосомы C и длинного плеча хромосомы A (или D). К сожалению, эти данные получены с использованием рутинного, а не метода дифференциального окрашивания хромосом, поэтому к ним следует относиться с определенной долей осторожности.

Еще раньше, также методами рутинного окрашивания хромосом, было установлено, что клеточные популяции креписа в течение первого года культивирования являются нестабильными, миксоплоидными. И лишь при дальнейшем пассировании формируются кариотипически стабильные штаммы (клеточные линии) с различными аберрантными хромосомами [10]. Иными словами, здесь была показана дивергенция штаммов креписа как по числу, так и по морфологии хромосом.

Подобные явления описаны и при кариотипическом изучении с помощью метода C-окрашивания тканей пшеницы *Triticum tauschii* ( $2n = 14$ ). Было установлено, что в течение первых трех

месяцев культивирования в 75—95 % случаев в клетках сохранялся нормальный кариотип. Однако спустя еще два месяца наблюдали доминирование клеток с анеуплоидными кариотипами, содержащими 13 хромосом. Анализ показал, что в таких анеуплоидных клетках со значительной частотой встречалась дицентрическая хромосома, сформированная хромосомами 2D и 5D [77].

Несколько иная картина наблюдалась у ячменя. Здесь на начальных этапах пассирования каллусов была выявлена широкая вариабельность кариотипов. В дальнейшем отмечены тенденция к снижению числа клеток высоких уровней плоидности и анеуплоидов и к увеличению числа диплоидных и тетраплоидных клеток. К концу опыта (180 дней роста) в популяции был 61 % клеток с диплоидным числом хромосом. Однако, в отличие от хромосом исходного экспланта, они были акроцентрическими. Иными словами, в популяции стали доминировать псевдодиплоидные клетки [78].

В процессе пассирования, как уже отмечалось, у *C. capillaris* наблюдались клетки и с неизменным числом и морфологией хромосом. В сформированном (описанном выше) неорганизованно растущем штамме после девятого пассажа они составляли около 10 %, а в другом штамме (ризогенном), постоянно формирующем корешки, такие клетки составляли модальный класс. Однако тщательный анализ показал, что в неорганизованно растущем штамме при сохранении морфологии хромосом в них происходит существенное изменение рисунка их дифференциального окрашивания. При этом разные хромосомы набора и их плечи изменялись по-разному. Вначале изменения затрагивали длинные плечи во всех трех типах хромосом и только к четвертому пассажу они затрагивали в рисунке окрашивания и малые плечи хромосом. Наиболее нестабильной в наборе была С-хромосома, она первой подвергалась изменениям, и в пластинках с сильно измененной морфологией хромосом хотя бы одна из С-хромосом набора обязательно была изменена. Наиболее стабильной оказалась спутничная D-хромосома. Следует подчеркнуть, что самый широкий спектр изменчивости рисунка дифференциального окрашивания хромосом наблюдался в периоде становления, т. е. во втором—четвертом пассажах [8]. В обобщенном виде эти данные представлены как схема на рис. 7. В ризогенном штамме наблюдали подобные явления, однако в кончиках корешков, формируемых *in vitro*, изменения в распределении гетерохроматина в хромосомах диплоидных клеток были не столь значительными [79].

Таким образом, накопленные при изучении

культивируемых клеток разных видов растений результаты свидетельствуют, что в периоде становления происходит быстрая реорганизация генома, приводящая к возникновению измененных кариотипов. В процессе адаптации к условиям изолированного роста происходят изменения и в хромосомах диплоидных клеток, в которых при рутинном окрашивании изменений не наблюдается. В сформированных штаммах дальнейших значительных изменений не отмечено, в них устанавливается доминирование лишь нескольких кариотипов из широкого спектра изменений, возникших в периоде становления.

**Влияние условий выращивания.** Состав культуральной среды и другие внешние факторы существенно влияют на уровень и спектр геномной изменчивости в популяциях культивируемых клеток, в значительной мере определяют направление эволюции их генома в процессе адаптации к условиям пассируемого роста *in vitro*.

Например, изучение каллусных и суспензионных культур *H. gracilis* и *Vicia hayastana* показало, что на твердых питательных средах полиплоидизация клеточных культур шла интенсивнее, и в сформированных каллусных штаммах уровень плоидности клеток был выше [72, 80, 81]. Около 30 % первичных каллусов, полученных на агаризованной среде из пыльников наперстянки *Digitalis lanata*, содержали преимущественно гаплоидные клетки. В процессе дальнейшего пассирования на твердой среде гаплоидные клетки быстро исчезали. В суспензионной культуре гаплоидные клетки встречались и в дальнейших пассажах даже в тех случаях, когда суспензия была получена от первичных каллусов, содержащих значительное количество диплоидных клеток [82].

В наших опытах результаты были несколько иными. Первичный каллус, полученный от гипокотыля гаплопаппуса, был разделен на две части, и клетки выращивались параллельно в жидкой и на твердой (штамм Г4Г-3) питательных средах. Среды отличались лишь наличием или отсутствием агара. Анализ, проведенный спустя четыре пассажа, показал, что модальный класс в обоих вариантах формировали тетраплоидные клетки. Вместе с тем в суспензии было значительно меньше диплоидных клеток и более чем в два раза больше клеток с числом хромосом, превышающим тетраплоидный набор, значительно шире был размах изменчивости по числу хромосом за счет появления высокоплоидных (до 22n) клеток (табл. 5).

Выращивание, начиная со второго пассажа, штамма Г4ГР параллельно в каллусной и суспензионной культурах также привело к подобным

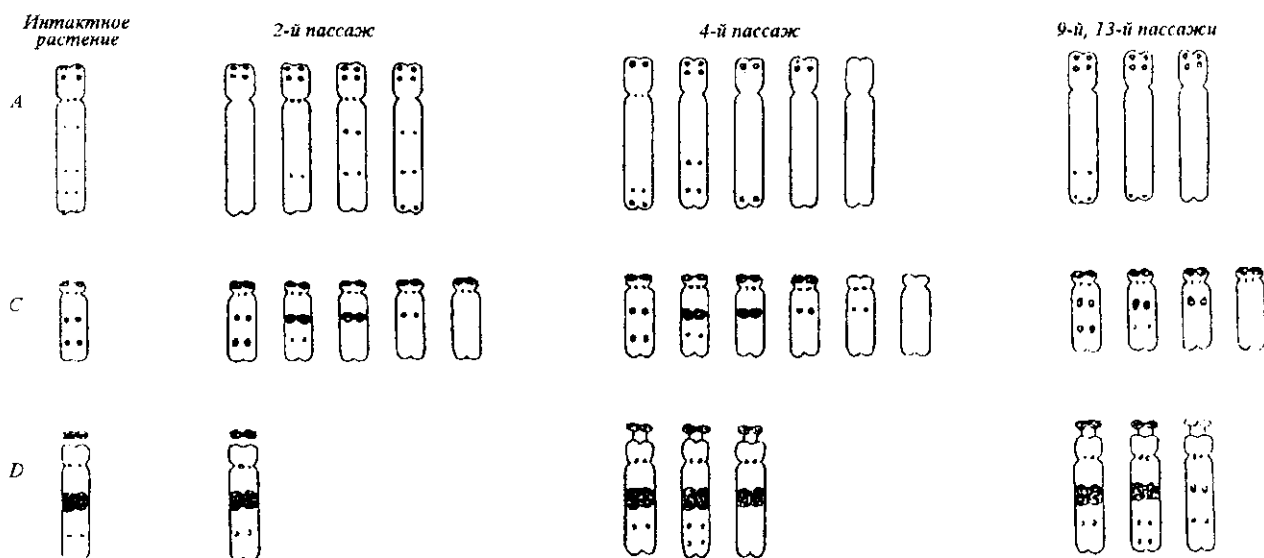


Рис. 7. Основные типы С-бэндов в морфологически неизмененных хромосомах культуры тканей скерды *Crepis capillaris* (А, С, D — типы хромосом)

различиям: в суспензии в 22-м пассаже была ниже частота диплоидных клеток, повысилась доля триплоидных и тетраплоидных метафаз (табл. 5).

Перевод каллусной ткани диплоидного штамма гаплопаппуса Г2Л после шестого пассажа в суспензионную культуру фактически вызвал формирование нового штамма, существенно отличающегося от исходной каллусной ткани по числу хромосом. В частности, после переноса в жидкую среду резко уменьшилась частота диплоидных клеток, возросла доля тетраплоидных и высокоплоидных клеток, размах изменчивости по числу хромосом увеличился до 16n. При дальнейшем выращивании в течение 30 пассажей суспензионная культура характеризовалась стабильностью частоты диплоидных клеток, доля которых колебалась в пределах 52—57 % и была достоверно ниже, чем в каллусной ткани (табл. 5). Более раннее проявление полиплоидии в суспензионной культуре по сравнению с каллусной тканью наблюдали и другие исследователи [83—85].

Цитотометрическое изучение содержания ДНК в каллусах пшеницы показало полиплоидизацию клеток в процессе их культивирования на разных по составу питательных средах. При этом уровень амплификации ДНК зависел от содержа-

ния в культуральной среде минеральных солей, наличия кокосового молока, концентрации сахарозы, органического азота и других компонентов [86]. Смена минерального состава питательной среды на первых этапах пассирования, например, миксоплоидного штамма гаплопаппуса, привела к изменению модалного класса, в частности, к повышению числа диплоидных клеток в миксоплоидном штамме [87].

Как показали исследования на люцерне, содержание ДНК в клетках пассируемых штаммов может зависеть от длительности пассажа: при коротких интервалах суспензионные культуры оставались диплоидными, а при длительных — около 60 % клеток содержали 8—16 С ДНК [88].

Иные данные были получены при изменении условий выращивания сформированных штаммов. В частности, в наших опытах выращивание штамма гаплопаппуса ГС после 30-го пассажа параллельно на твердой и в жидкой питательной средах привело к повышению доли диплоидных клеток и резкому снижению частоты полиплоидных клеток всех степеней плоидности в жидкой среде. Однако спустя два пассажа в суспензии частота диплоидных клеток уменьшилась, а тетраплоидных — возросла и в результате суспензионная культура при-

Таблица 5

Изменчивость числа клеток разных уровней плоидности в культуре тканей гаплопеплуса при изменении условий выращивания, % (собственные данные)

Тип питательной среды Вид культуры	Номер пассажа	Число изученных метафаз, шт.	Число наборов хромосом, л					Анеуплоидные
			1	2	3	4	> 4	
<i>Штамм Г2Л</i>								
Эриксона								
Каллус	7	666	1,7±0,5	74,7±1,7	10,4±1,2	9,1±1,1	0,9±0,5	3,4±0,7
	8	102	4,0±1,9	46,0±5,0	9,0±2,9	30,0±4,6	8,0±2,7	3,0±1,7
	10	200	0,5±0,5	78,0±2,9	8,5±2,0	10,5±2,2	1,0±0,7	1,5±0,9
	20	156	1,3±0,9	73,8±3,5	7,6±2,1	14,6±2,8	—	2,6±1,3
	30	66	3,0±2,1	72,7±5,5	7,6±3,3	4,5±2,6	3,0±2,1	9,1±3,5
	36	381	2,4±0,8	82,4±2,0	5,8±1,2	1,5±0,6	—	—
Суспензия	7	212	1,0±0,7	56,6±3,4***	4,6±1,4**	28,3±3,1***	7,6±1,8***	1,9±0,9
	20	117	7,7±2,5*	56,4±4,6***	8,5±2,6	8,5±2,6	14,5±3,3***	4,4±1,9
	30	126	8,7±2,5	53,2±4,4***	9,5±2,6	8,7±2,5	15,1±3,2**	4,8±1,9
	36	131	8,4±2,4*	52,7±4,4***	9,9±2,6	9,9С2,6	14,5±3,1***	4,6±1,8
<i>Штамм Г4Г-3</i>								
Эриксона								
Каллус	4	220	—	29,1±3,1	7,7±1,8	53,2±3,4	9,5±2,0	0,5±0,5
Суспензия	4	553	0,5±0,3	18,8±1,7**	5,6±1,0	52,8±2,1	20,8±1,7***	1,5±0,5
<i>Штамм Г4ГР</i>								
Эриксона								
Каллус	3	91	1,1±1,1	81,4±4,1	9,9±3,1	2,2±1,5	2,5±1,5	3,3±1,9
	22	208	0,5±0,5	91,3±2,0	0,5±0,5	2,4±1,0	—	5,3±1,6
Суспензия	3	401	2,2±0,7	82,1±1,9	6,0±1,2	9,7±1,5***	—	—
	22	585	1,0±0,4	73,9±1,8***	3,9±0,8***	17,6±1,6***	2,3±0,6	1,4±0,5
МС								
Каллус	22	100	1,0±1,0	92,0±2,7	—	1,0±1,0	—	6,0±2,4
<i>Штамм ГС</i>								
МС								
Каллус	30—33	525	1,5±3,1	18,3±1,7	25,9±1,9	30,5±2,0	21,0±1,8	2,8±0,7
Суспензия	31	319	0,6±3,1	72,1±2,5***	9,4±1,6***	10,3±1,7***	3,5±1,0***	4,1±1,1
	33	100	—	53,0±5,0***	10,0±3,0***	29,0±4,5	4,0±2,0***	4,0±2,0
Эриксона								
Каллус	31	503	1,2±0,5	35,1±2,1***	33,8±2,1**	15,8±1,6***	5,9±1,1***	8,2±1,2***
	32	188	4,8±1,6*	32,2±3,4***	26,0±3,2	20,9±3,0**	10,3±3,2***	5,8±1,7
	33	156	2,6±1,3	17,3±3,0	32,0±3,7	28,2±3,6	14,8±2,8	5,1±1,8

Примечание. Здесь и в табл. 6 различия достоверны при уровне значимости \*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001.

близилась по пloidности к исходной каллусной ткани (табл. 5). Четче эта тенденция проявилась после смены минерального состава среды, в частности, при переносе ткани штамма ГС со среды МС на среду Эриксона. Вначале отмечали возрастание частоты возникновения высокоploидных митозов. Спустя два пассажа в этой популяции произошли обратные изменения и в результате ткань, выращиваемая на среде Эриксона, не отличалась по пloidности от исходной ткани, выращиваемой на среде МС. Перенос диплоидного штамма Г4ТР в 22-м пассаже со среды Эриксона на среду МС вовсе не повлиял на пloidность культивируемых клеток (табл. 5). Подобные результаты были получены и в опытах с сахарной свеклой: перенос клеток сформированного штамма с агаризованной среды в жидкую не привел к заметным изменениям содержания ДНК и числа хромосом [89]. В других экспериментах с этой же культурой было установлено, что оптимизация состава питательной среды (определяемая по параметрам роста) приводила к избирательной репродукции гексаploидных клеток в миксоploидной популяции [90].

Имеются и другие данные о том, что разные сформированные штаммы одной и той же культуры клеток по-разному реагируют на смену состава питательной среды. Например, при исключении из питательной среды витаминов в разных штаммах суспензионной культуры диоскореи *Dioscorea deltoidea* происходили изменения чисел хромосом — в одном штамме начали преобладать высокоploидные, а в другом — гаплоидные клетки [91].

На эволюцию числа хромосом в популяциях культивируемых клеток весьма существенное влияние могут оказывать и условия освещенности. Например, в опытах с каллусными тканями, полученными из семядолей *Canavalia ensiformis*, было показано, что в отличие от культур, выращиваемых в темноте на средах различного состава и с разными стимуляторами роста, в культурах, выращиваемых на свету, существенно возрастала доля триploидных клеток [92]. Изменение светового режима выращивания клеток, в частности, перенос культур на свет также приводило в ряде случаев к изменению соотношения между клетками разных уровней пloidности. Например, в наших экспериментах с гаплопаппусом в суспензионной культуре диплоидного штамма Г4ТР, перенесенной после второго пассажа из темноты в условия постоянного освещения (1200—1500 лк), выявлена тенденция к снижению частоты диплоидных клеток при повышении доли тетраploидных. В сформированном штамме Г2Л после такого переноса в 20, 30 и 36-м пассажах картина была обратной — частота тет-

раploидных клеток снижалась, а диплоидных — возрастала (табл. 6). Эти данные, а также имеющиеся в литературе свидетельства о том, что при выращивании культивируемых клеток на свету в изначально диплоидных культурах, как правило, увеличивается гетерогенность клеточных популяций за счет снижения количества диплоидных клеток, а в миксоploидных штаммах, наоборот, уменьшается размах изменчивости по числу хромосом [93—95]. Зависимость цитогенетического эффекта от длины волны света может свидетельствовать об участии в процессах изменчивости геномной структуры клеточных популяций фитохромной, а также гормональной систем [95, 96].

Имеются, однако, данные о том, что условия освещения существенно не влияют на число хромосом в культивируемых клетках. Например, в каллусных тканях, полученных из неоплодотворенных семяпочек герберы *Gerbera jamesonii*, при темновых и световых условиях культивирования не было установлено различий по числу хромосом; в обоих случаях они оставались гаплоидными [97].

Значительное влияние на уровень и типы изменчивости, на направление эволюции генома в процессе адаптации клеточных популяций к условиям изолированного роста оказывают экзогенные регуляторы роста, особенно фитогормоны, их наличие, количество и соотношение в составе культуральной среды. По этому вопросу накоплено большое количество неоднозначно трактуемых экспериментальных данных, которые частично уже обсуждались [2, 98, 99] и будут специально проанализированы в дальнейшем. Здесь же необходимо отметить лишь следующее.

Эффект экзогенных гормонов и направление их действия (повышение уровня и расширение спектра изменчивости или, наоборот, снижение гетерогенности клеточных популяций, селективное действие по отношению к клеткам с различными геномами или индукция их возникновения и т. д.) определяются многими параметрами. Это, прежде всего, вид растения, особенности его генотипа, длительность выращивания клеток *in vitro*, особенности изменчивости и направление эволюции генома в исследуемых клеточных популяциях и др. В частности, показано, что получение и дальнейшее выращивание клеточных штаммов на питательных средах, различающихся по гормональному составу, далеко не всегда существенно влияет на характер (направление) изменчивости числа хромосом. Однако на средах с разным содержанием и соотношением регуляторов роста могут сформироваться штаммы, отличающиеся по цитогенетическим па-



Таблица 6

Изменчивость числа клеток разных уровней пloidности при выращивании суспензионной культуры гаплопипуса в темноте и при постоянном освещении 1200—1500 лк, % (собственные данные)

Номер пассажа	Вариант опыта	Число изученные метафаз, шт.	Число наборов хромосом, n					Анеуплоидные
			1	2	3	4	> 4	
<i>Штамм Г4ТР</i>								
3	Темнота	401	2,2±0,7	82,1±1,9	6,0±1,2	9,7±1,5	—	—
	Свет	297	3,0±1,0	74,1±2,5*	6,1±1,4	15,5±2,0*	1,3±0,7	—
<i>Штамм Г2Л</i>								
20	Темнота	117	7,7±2,5	56,4±4,6	8,5±2,6	8,5±2,6	14,5±3,3	4,4±1,9
	Свет	121	5,8±2,1	70,2±4,2*	5,8±2,1	5,0±2,0*	5,0±2,0*	8,2±2,5
30	Темнота	126	8,7±2,5	53,2±4,4	9,5±2,6	8,7±2,5	15,1±3,2	4,8±1,9
	Свет	145	6,2±2,0	71,0±3,8**	6,9±2,1	5,5±1,9	2,8±1,4***	7,6±2,2
36	Темнота	131	8,4±2,4	52,7±4,4	9,9±2,6	9,9±2,6	14,5±3,1	4,6±1,8
	Свет	153	6,5±2,0	70,6±3,7**	7,3±2,1	5,2±1,8	2,6±1,3***	7,8±2,2

раметрам, в частности, по числу хромосом [41, 54, 72, 82, 100—107]. При этом на разных средах разнообразие типов изменчивости по числу хромосом проявляется по-разному. Например, в опытах с пыльниками *Paeonia lactiflora* анализ показал, что на среде, содержащей НУК, 2,4-Д и кинетин, все шесть изученных каллусов были гаплоидными, а на среде, содержащей 15 % кокосового молока, один каллус был гаплоидным, два — миксоплоидными и один — диплоидным [39]. В то же время каллусные ткани тетраплоидного картофеля быстро полиплоидизировались независимо от наличия и соотношения в культуральной среде экзогенных регуляторов роста [108].

Изменение гормонального состава среды на разных этапах введения в культуру *in vitro* по-разному влияло на геномную изменчивость и эволюцию генома клеточных популяций. Наиболее существенные изменения наблюдали, как и в описанных выше случаях, при изучении реакции штаммов, находящихся в периоде становления [17, 101, 109].

Таким образом, получение и дальнейшее выращивание клеточных культур в отличающихся условиях, в том числе на разных по составу культуральных средах, приводит, как правило, к формированию штаммов, отличающихся по многим параметрам, в том числе по уровню и типам

хромосомных aberrаций, по числу хромосом, содержанию ядерной ДНК, по многим последовательностям ДНК, ее структурно-функциональному состоянию, что было выявлено также при молекулярно-биологических и биохимических исследованиях [110—117]. Изменение условий выращивания во многих случаях приводит к изменению соотношения между клетками разных уровней пloidности. Штаммы, отличающиеся по длительности выращивания в условиях *in vitro*, неодинаково реагируют на смену культуральных условий. Клетки еще не сформировавшихся штаммов (находящихся в периоде становления), перенесенные в другие условия роста, как правило, дают начало культуре, отличающейся по генетическим параметрам от исходной популяции. Другими словами, изменение условий культивирования в периоде становления приводит чаще всего к формированию нового штамма. В сформированных штаммах в таких случаях далеко не всегда отмечаются изменения генетической структуры популяций, в частности, числа хромосом. При изменении условий в миксоплоидных штаммах вначале происходит увеличение доли, как правило, диплоидных клеток, а в диплоидных штаммах наблюдается увеличение размаха изменчивости по числу хромосом, а иногда и смена модального класса. При дальнейшем культивирова-

нии в этих измененных условиях в популяции зачастую восстанавливается исходное соотношение между клетками с разным числом хромосом. На основании изложенного можно сделать вывод о том, что сформированным штаммам свойственно наличие как физиологического, так генетического гомеостаза.

Один из наиболее ярких примеров существования такого гомеостаза был продемонстрирован в опытах с кукурузой Ву Дык Куанг и Шаминой [118]. Изучение клонов, полученных от индивидуальных клеток и протопластов исходно миксоплоидной клеточной популяции, выращиваемой длительное время *in vitro*, показало, что они вначале были разными по плоидности. Однако приблизительно через год все клоны сформировали клеточные штаммы, практически неотличимые по числу хромосом от исходного миксоплоидного штамма. Авторы рассматривают это явление как следствие адаптивной селекции, приводящей клеточные популяции к оптимальному для данных условий соотношению клеток с различным числом хромосом.

Изменчивость, отбор и факторы, регулирующие направление их действия в клеточных популяциях *in vitro*. В предыдущем сообщении [3] приведены данные о том, что в процессе адаптации клеточных популяций к условиям *in vitro* выявляется критический период, названный автором периодом становления. В этом периоде, охватывающем второй—восьмой, иногда до 12-го пассажа с начала введения клеток в культуру *in vitro*, наблюдается существенная перестройка физиологических процессов в клетках и структуры клеточных популяций. Возрастает уровень и расширяется спектр геномных изменений, увеличивается гетерогенность клеточных популяций по многим признакам и одновременно наблюдается позитивная селекция клеток, приспособленных к условиям роста *in vitro*, и элиминация неприспособленных. Именно в этом периоде происходят наиболее существенные изменения, результатом которых является адаптация клеточного сообщества как биологической системы к изменившимся по сравнению с первичным каллусом условиям существования. Наблюдаемые при этом изменения морфологии клеточных штаммов и особенностей их роста, митотического режима, в том числе динамика гетерогенности по длительности клеточного цикла в целом и митоза в частности, изменчивость суточного ритма митотической активности изложены ранее (см. [3]). Сведения, приведенные в данной работе, подтверждают и расширяют представления об этом явлении. Их анализ в совокупности с ранее опубликованными данными позволил выявить конкретные особенно-

сти и наиболее возможные причины изменчивости, а также механизмы адаптации культивируемых клеток. Основные из них заключаются в следующем.

Известно, что гормональная система играет существенную роль в ответе растений на стрессовые воздействия и в процессах адаптации, влияя на генную экспрессию и проявляя свое действие на транскрипционном и трансляционном уровнях [117, 119—122]. Одновременно гормоны являются элементами общих мутагенных и антимутагенных систем растений, обуславливающих уровни естественного мутирования [123]. Накопление в клетках метаболитов, в том числе фитогормонов, выше уровня естественного их содержания, моделируя воздействие на организм неблагоприятных факторов внутренней и внешней среды, приводит к значительному усилению мутирования. Усиление мутирования в этих условиях является адаптивным, на основе чего создаются предпосылки для приспособления к новым условиям среды [124, 125].

Адаптивность популяций, их устойчивость и надежность, особенно клоновых популяций, в том числе, видимо, и клеточных, растет пропорционально степени генетической изменчивости, существующей в популяции [126—129]. Механизмы поддержания целостности генофонда клоновых популяций, а это прежде всего стабилизирующий отбор, связанный с общностью адаптивного типа, достаточно эффективны [130].

Анализ представленных выше данных, а также опубликованных в предыдущих сообщениях и других, имеющихся в литературе, приводит к заключению о том, что главной причиной высокой геномной изменчивости культивируемых клеток растений является нарушение гормонального баланса. Подобной точки зрения придерживаются и другие исследователи [42, 43, 47, 104]. Рассмотрим это положение и вытекающие из него следствия детальной.

В интактных организмах гормональное состояние и окружение быстрорастущих тканей направлено на создание оптимальных условий для деления и роста клеток. В норме гормональный фон в таких тканях обуславливает наличие стабилизирующего отбора, отметающего из популяции делящихся клеток те из них, у которых имеются геномные нарушения, возникшие по тем или иным причинам. В дифференцирующихся тканях гормональный фон и компетентность клеток другие — здесь в зависимости от будущих функций под влиянием фитогормонов идут не только морфобиологические и биохимические изменения клеток,

но и запрограммированные изменения их генома, направленные в конечном счете на наилучшее выполнение указанной функции (см. [98]).

В культуре *in vitro* ситуация иная. Здесь одна из главных целей — получение из чаще всего дифференцированных (специализированных) тканей популяции быстроделющихся и быстрорастущих клеток. Для этого эмпирически создаются соответствующие условия, в частности, в питательную среду для культивирования вводят не только необходимые макро- и микроэлементы и источник углеводного питания, но и различные стимуляторы роста, прежде всего, фитогормоны. В этих условиях происходит инициация процессов дедифференцировки и активной пролиферации клеток, образование первичного каллуса. Индукция процессов дедифференциации и каллусообразования предполагает перепрограммирование генома и его возврат в состояние, характерное для пролиферирующих клеток, т. е. «ювенилизацию» генома. Это выражается в виде разнообразных геномных преобразований, уровень, типы и направленность которых у различных объектов могут быть разными. Эти изменения являются, в основном, запрограммированными (см. [2]). Поэтому, на взгляд автора, в первичных каллусах растений, способных в природе образовывать раневую каллус, т. е. у которых каллусогенез — это эволюционно закрепившийся и генетически обусловленный восстановительный процесс (см. [1]), наблюдаемая изменчивость является результатом физиологической адаптации клеток. При использовании оптимальных для роста гормональных воздействий условия существования клеток в первичном каллусе *in vitro* сопоставимы с таковыми в целостном (но подверженном раневому воздействию) организме. Эти условия могут сохраняться *in vitro* в течение, как можно судить по некоторым данным, первых трех—четырех пассажей [131, 132]. В результате первичный каллус и клетки нескольких первых пассажей представляют собой систему, сравнимую в целом с меристемой интактного растения или, скорее, с раневым каллусом. Гормональный фон в этой системе обеспечивает ее относительную однородность и стабильность, четкую ритмику митотической активности (регулируемую, кстати, фитогормонами), преимущественное действие стабилизирующего отбора.

По мере пассирования ведется отбор наиболее интенсивно делящихся клеток или быстрорастущих участков изолированных тканей, по существу отбираются клетки с измененным гормональным балансом и/или измененной реакцией (компетентностью) на гормоны. При этом постепенно исчезают интегрирующие механизмы растительного организ-

ма, клетки переходят в условия существования, выходящие за пределы нормы реакции их генотипа, т. е. попадают в действительно стрессовые условия. В результате в популяции изолированных клеток начинает действовать дестабилизирующий отбор. Эта форма отбора подобно тому, как это описано для животных, приводит к резкому усилению генетической изменчивости вследствие нарушения коррелятивных систем организма, главным образом гормональной системы, возникающей при стрессовых воздействиях [133, 134].

Эффективность дестабилизирующего отбора при введении клеток в изолированную культуру зависит не только от условий их выращивания, в частности, от гормонального состава питательной среды, но и от вида растения, его генотипа, особенностей первичного экспланта, т. е. от состояния генома в исходных клетках. Другими словами, эффективность дестабилизирующего отбора проявляется в результате взаимодействия «генотип—среда», где определяющую роль играют экзогенные гормоны и компетентность клеток. Для клеток диких видов растений с простыми геномами характерен более низкий уровень и не столь широкий размах геномной, в частности, кариотипической изменчивости. Клетки большинства культурных видов характеризуются *in vitro* значительно более широким размахом изменчивости. Это обусловлено, видимо, не только полиплоидным состоянием генома культурных растений, но и тем, что в процессе окультуривания эти растения подвергались длительному воздействию дестабилизирующего отбора. В результате отобраные формы являются более лабильными, более заметно реагирующими на изменение условий выращивания, в том числе на гормональные воздействия, они и при введении в изолированную культуру показывают более широкий размах изменчивости, особенно кариотипической. У ряда таких растений результаты дестабилизирующего отбора проявляются уже в первичном каллусе (см. [2]).

На фоне высокой геномной изменчивости начинает действовать как проявление давления изменившейся окружающей среды преимущественно ведущая форма отбора, которая и формирует популяцию клеток, приспособленную к неограниченному росту в конкретных условиях изолированной культуры. Изменение числа и морфологии хромосом в результате цикла мостов, нарушений митозов и других процессов, соматический кроссинговер, генные мутации, репрессия и дерепрессия генов, амплификация и делеция повторов ДНК, транспозиции являются основными механизмами изменчивости, на основе которой при решающей роли отбора

совершается эволюция генетической структуры клеточной популяции. (Более детально механизмы геномной изменчивости *in vitro* рассмотрены в работе [2].)

Поскольку в культуре изолированных клеток и тканей растений повсеместно встречаются изменения чисел хромосом, повышение уровня их структурных перестроек, изменения в количестве и распределении С-хроматина, а другие отклонения в периоде становления наблюдаются значительно реже, логично предположить, что первый и наиболее вероятный и эффективный механизм появления новых генотипов и увеличения генетического полиморфизма *in vitro* состоит в возникновении клеток с различными наборами хромосом, стабилизации их числа и соотношения на определенном уровне, отборе на определенную частоту структурных перестроек хромосом, приводящих к изменению их морфологии. При этом вначале наблюдается, как правило, полиплоидизация определенной части клеточной популяции в результате, главным образом, эндомитозов. Далее вновь увеличивается гетерогенность популяции по числу и морфологии хромосом вследствие различных нарушений митоза и цикла мостов. И, видимо, уже потом происходят изменения, преимущественно приводящие к появлению новых клеточных вариантов, различающихся и на уровне ДНК.

Результаты, подтверждающие именно такой ход событий, имеются практически во всех опубликованных работах, в которых проводилось изучение геномной изменчивости в динамике пассирования клеточных культур самых разных видов растений (см., например, [8, 10, 18, 37, 40, 43, 47, 55, 58, 61, 62, 64, 73, 78, 87, 117, 135]). В качестве примера можно привести также наши данные о том, что геномные изменения на уровне ДНК в течение первого года пассирования у разных видов раувольфии были незначительны, а при длительном культивировании их масштаб может превышать межвидовую изменчивость, свойственную растениям в природе [136—139].

Здесь следует еще раз отметить, что когда организмы попадают в неблагоприятные для роста и развития условия, особенно в стрессовые, происходит индукция множества защитных реакций, выявляемых на молекулярном уровне, среди которых существенное значение, прежде всего, для популяции имеет индукция геномных перестроек [140, 141]. В этом случае повышение частоты мутирования и других геномных перестроек имеет приспособительное значение, так как возникающие в большом количестве новые разнообразные формы являются материалом для естественного отбора,

направление которого изменяется в новых условиях среды. Отбору может подвергаться и сам уровень мутабельности как одно из непреходящих условий лабильности популяции (см. [129]). Один из путей регуляции уровня мутирования заключается в изменении эффективности элиминации клеток с циклом «разрыв—слияние—мост».

В процессе пассирования формируется популяция клеток, взаимоотношения между которыми близки к таковым организмов в клоновой популяции. Такие популяции характеризуются отсутствием классической комбинативной изменчивости, являющейся в панмиктических популяциях одним из основных источников генетического полиморфизма. Мутационная же изменчивость наряду с другими реорганизациями генома, селекция на гетерогенность популяции и относительно быстрая смена поколений могут достаточно эффективно компенсировать отсутствие комбинативной изменчивости в ее классическом понимании.

После 8—10-го пассажа штаммы, как правило, стабилизируются по многим изученным признакам. Они являются гетерогенными, но обычно в них устанавливается динамическое равновесие между клетками с разными геномами. Эта стабильная гетерогенность наблюдается на фоне сравнительно высокого, иногда достигающего 50 % и более уровня мутаций хромосом и нарушений митоза, приводящих к возникновению новых генотипов, т. е. на фоне перманентно высокого уровня мутационного давления (см. [7, 24, 62]).

Следует особо отметить, что пассируемые клеточные культуры с сильным неорганизованным типом роста, за редким исключением, представляют собой гетерогенные популяции, подавляющее большинство в которых составляют клетки с реорганизованным геномом. Популяции, в которых большинство составляют клетки с исходным геномом, как правило, в пассируемой культуре не растут, такие клеточные культуры прекращают рост и гибнут на первых этапах пассирования (см., например, [7, 14, 15, 24, 48, 55, 104, 142]). В некоторых экспериментах установлена прямая корреляция продолжительности роста каллусов и доли клеток с реорганизованным геномом [142]. Таким образом, адаптация клеток к условиям роста *in vitro* определяется реорганизацией исходного клеточного генома независимо от его состояния в исходном экспланте и даже в первичном каллусе.

Изменение условий выращивания сформированных штаммов, т. е. выращиваемых более года в культуре *in vitro*, приводит во многих случаях к изменению генетической структуры клеточных популяций, чаще всего наблюдаемой при изучении

числа хромосом. Однако спустя два—четыре пассажа, иногда позже, в измененных условиях отмечается либо стабилизация популяции на новом уровне гетерогенности, либо восстановление исходной генетической структуры популяции. Следовательно, сформированные штаммы, в отличие от популяции изолированных клеток, находящихся в периоде становления, характеризуются наличием не только физиологического, но и генетического гомеостаза. Судя по изложенным выше и в предыдущих публикациях данным [1—3, 98, 99], такой гомеостаз в сформированных штаммах определяется сложившимся гормональным фоном, создаваемым комплексом как экзогенных, так и эндогенных фитогормонов и обуславливающим преимущественное действие стабилизирующего отбора.

Таким образом, в культуре изолированных клеток растений имеют место общепопуляционные закономерности. В клеточных популяциях *in vitro* наблюдаются основные движущие факторы эволюции — изменчивость, наследственность и отбор. В результате действия этих факторов при переносе клеток в изолированные условия происходит адаптация клеточных популяций к этим условиям выращивания. При этом наблюдается как конвергенция, так и дивергенция популяций. Наблюдаемые процессы дивергенции штаммов могут быть объяснены помимо случайности возникновения наследственных изменений и некоторых геномных отличий в исходном материале также дрейфом генов (мутаций) в результате того, что при пересадке используется незначительная часть каллусной или суспензионной культуры.

**Заключение.** Культивируемые *in vitro* клетки растений представляют собой клоновую популяцию, где роль организмов играют отдельные клетки. Исходные клетки интактных многоклеточных организмов не запрограммированы на выполнение этих функций. Поэтому явления, происходящие в клеточных популяциях в процессе их адаптации к условиям выращивания *in vitro*, по существу — в процессе формирования новой биологической системы, представляют несомненный биологический интерес. Это уникальная модель глубокой (но, при желании экспериментатора, обратимой) регрессивной эволюции биологической системы — от многоклеточного уровня к одноклеточному.

Адаптация клеток растений к условиям изолированного роста является многоступенчатым процессом. Изменчивость, наблюдаемая на первых этапах культивирования, является в основном результатом физиологической адаптации. При дальнейшем пассировании наблюдаются процессы генетической адаптации, выражающиеся в изменении

генетической структуры клеточных популяций. В процессе адаптации можно выделить три периода: первичной популяции изолированных клеток, становления штамма и сформированного штамма.

Клетки, находящиеся в периоде первичной популяции (первичный каллус и в ряде случаев первые два—три пассажа), характеризуются сравнительно небольшими генетическими отличиями от клеток исходной ткани, относительной стабильностью большинства изученных признаков в результате преимущественного действия стабилизирующего отбора. Наблюдаемые в этом периоде геномные реорганизации — это сумма изменений разного происхождения. Во-первых, это запрограммированные изменения, происходящие при ранениях и индукции дедифференциации. Во-вторых, они представляют собой какую-то часть изменений и мутаций, возникших в онтогенезе и выявляющихся при вступлении клеток в митоз, и, в-третьих, — это изменения и мутации, возникшие под влиянием условий индукции каллусообразования, которые в ряде случаев могут выходить за пределы нормы реакции конкретного генотипа и индуцировать геномные перестройки (см. [2]).

В периоде становления происходит окончательное исчезновение интегрирующих механизмов организма, клетки находятся в условиях преимущественного действия дестабилизирующего отбора. Чаще всего отмечается снижение темпа роста, нарушение циркадного ритма митотической активности, изменение длительности клеточного цикла, уровня и спектра аберраций хромосом, возрастает частота различных нарушений митоза, происходят значительные изменения в экспрессии генетической информации и увеличивается размах изменчивости большинства изученных цитологических, биохимических и молекулярно-биологических маркеров. На фоне высокого уровня и широкого спектра изменчивости действие ведущего (прогрессивного) отбора обуславливает генетическую адаптацию гетерогенных популяций клеток. Практически по всем изученным признакам наблюдаются все возможные типы эволюции родственных клеточных штаммов — дивергенция, конвергенция и параллелизм.

В периоде сформированного штамма большинство клеточных популяций характеризуется относительной стабильностью изученных признаков, возникших в периоде становления, наличием физиологического и генетического гомеостаза, обусловленного преимущественным действием стабилизирующего отбора, направление и сила которого, по-видимому, значительно отличаются от такового в интактном организме и в раневом каллусе. На-

блюдаемые в сформированных штаммах геномные реорганизации часто носят преимущественно канализованный характер, что может свидетельствовать об определенной общности механизмов эволюции генома растений в природе и в культуре *in vitro* (см., например, [137—139]).

Следует отметить, что разделение процесса адаптации клеточных популяций к условиям роста в изолированной культуре на указанные периоды не является безусловным. Наряду с большинством данных, полученных нами и имеющихся в литературе, которые подтверждает правомочность такого разделения, имеются факты, не совсем укладывающиеся в предложенную схему. В частности, для некоторых культур затруднительно выделение периода первичной популяции изолированных клеток. Например, у многих культурных растений уже в первичном каллусе отмечается наличие таких типов и уровня изменчивости, которые свидетельствуют, что у этих растений клетки *in vitro* вступают в период становления с первых этапов каллусообразования. Эти явления особенно четко проявляются у растений, геном которых имеет сложную полиплоидную, особенно аллополиплоидную структуру, и при использовании первичных эксплантов, клеточный геном которых в процессе онтогенеза подвергался значительным преобразованиям (см. [2, 99]). Период становления и период сформированного штамма свойственны подавляющему большинству культур, результаты изучения которых на сегодня известны. В то же время длительность периода становления у разных культур и даже у разных штаммов одной и той же культуры может быть различной.

Несомненную важность представляет и то, что сходные процессы и периоды (стадии) описаны для клеток животных в культуре в процессе становления постоянных клеточных линий, при опухолевом росте, а также, видимо, и в процессе нормального онтогенеза [143—146].

Существование подобной картины и у животных еще раз свидетельствует об универсальности адаптационных механизмов клеток независимо от степени их эволюционного развития, так как сходные явления свойственны и прокариотам (см., например, [147]).

Следовательно, культивируемые клетки высших растений, представляя собой новую, созданную искусственно биологическую популяцию, подчиняются общебиологическим закономерностям. В этой системе действуют основные движущие факторы эволюции — изменчивость, наследственность и отбор. Определенную роль играет также дрейф генов (генотипов), перманентно происходящий при

пересадках, особенно каллусных культур, при использовании в качестве эксплантов небольших участков ткани. В результате действия названных факторов при переносе клеток *in vitro* происходит их адаптация к конкретным условиям изолированного роста, идет формирование биологической системы, характеризующейся целым рядом особенностей.

Главной особенностью популяций культивируемых клеток является их высокая изменчивость на всех уровнях изучения — анатомогистологическом, цитоморфологическом, цитогенетическом, генетическом, биохимическом, молекулярно-биологическом. Конкретные причины, механизмы, уровень и особенности этой изменчивости достаточно разнообразны.

Другой, не менее важной особенностью, является принципиальная возможность регуляции процессов изменчивости и отбора путем изменения условий культивирования клеток. Применение для этого экзогенных фитогормонов, создание селективных сред, обработка мутагенами, широкомасштабная клеточная селекция и поддерживающий отбор по нужным признакам предоставляют возможность получать клеточные штаммы с некоторыми заданными признаками.

Эти и некоторые другие особенности сформированных популяций культивируемых *in vitro* клеток растений будут рассмотрены в последующих публикациях.

В. А. Кунах

Геномна мінливість соматичних клітин рослин. 6. Мінливість та добір у процесі адаптації до умов вирощування *in vitro*

Резюме

Зроблено огляд даних щодо динаміки генетичної структури клітинних популяцій, а також ролі і особливостей дії добору в процесі адаптації клітин до умов вирощування *in vitro*. Розглянуто вплив умов вирощування, роль генотипу, фітогормонів та інших чинників, що регулюють мінливість і напрямок дії добору. Показано, що адаптація клітин рослин є багатоступеневим процесом. На перших етапах культивування спостерігається фізіологічна адаптація до умов росту *in vitro*, пізніше відбуваються процеси генетичної адаптації, що проявляється в зміні генетичної структури клітинних популяцій. В репрезентативних вибірках штамів у процесі адаптації спостерігаються всі типи еволюції генетичної структури популяцій — дивергенція, конвергенція і паралелізм. Виділено три періоди в процесі адаптації: первинної популяції ізольованих клітин, становлення штаму, сформованого штаму. Поділ на періоди визначається типом, напрямом та жорсткістю добору, що діє в клітинній популяції. Для сформованих (адаптованих) штамів характерною є наявність фізіологічного і генетичного гомеостазу, обумовленого здебільшого дією стабілізуючого добору. Зроблено висновок стосовно того, що адаптація клітин до умов тривалого вирощування у пасивованій культурі — це процес формування нової біологічної системи в

результати дії основних рушійних факторів еволюції — мінливості, спадковості, добору і, очевидно, дрейфу генів (генотипів). Загалом вивчене явище може являти собою модель глибокої (але зворотної) регресивної еволюції біологічної системи — від багатоклітинного рівня до одноклітинного.

V. A. KunaKh

Genome variability in the somatic plant cells. 6. Variability and selection in the course of adaptation to *in vitro* conditions

#### Summary

Data on the dynamics of the cell population genetic structure as well as the role and peculiarities of the selection effects in the course of the cell adaptation to *in vitro* conditions have been reviewed. Effect of the growth conditions, role of the genotype, phytohormones and other factors that control the variability and selection trends have been discussed. The plant cell adaptation has been shown to be the multistage event. The physiological adaptation to the conditions of maintenance *in vitro* is observed on the early steps of the culturing, later on there occur the processes of the genetic adaptation manifested as a change in the cell population genetic structure. In the course of adaptation the representative strain samples exhibit all types of the population genetic structure evolution i. e. divergence, convergence and parallelism. Three periods in the adaptation process have been revealed: (i) the primary population of isolated cells, (ii) the strain formation and (iii) the established strain. These periods are determined by the type, mainstream, and rigidity of the selection operating in the cell population. The established (adapted) strains are characterized by the physiological and genetic homeostasis that preferentially results from the action of stabilizing selection. It has been concluded that cell adaptation to the conditions of long-term maintenance in the passaged culture is the process of formation of the novel biological system as a result of the effect of the major driving factors of evolution, viz., variability, heredity, selection and possibly gene (genotypes) drift. On the whole, the phenomenon studied may provide a model of the profound (but reversible) regressive evolution of the biological system — from the multicellular level to the unicellular one.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 3. Каллусообразование *in vitro* // Биополимеры и клетка.—1997.—13, № 5.—С. 362—371.
2. 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.
3. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 5. Изменчивость роста и митотического режима в процессе адаптации к условиям выращивания *in vitro* // Биополимеры и клетка.—1999.—15, № 5.—С. 343—359.
4. Кунах В. А. Цитогенетическая характеристика культуры ткани гаплопалпы // Культура изолированных органов, тканей и клеток растений.—М.: Наука, 1970.—С. 155—158.
5. Сидоренко П. Г., Кунах В. А. Характер изменчивости кариотипа в популяции клеток культуры ткани *Narlorappus gracilis* при длительном пассировании // Цитология и генетика.—1970.—4, № 3.—С. 235—241.
6. Сидоренко П. Г., Кунах В. А. Получение культуры изолированных тканей *Narlorappus gracilis* и *Crepis capillaris* и их цитогенетическая характеристика // Цитология и генетика.—1972.—6, №6.—С. 483—486.
7. Кунах В. А. Полиплоидия в культуре клеток и тканей *in vitro* и ее возможные причины // Эксперим. полиплоидия у культур растений.—К.: Наук. думка, 1974.—С. 39—56.
8. Губарь Е. К., Кунах В. А. Кариотипическая изменчивость культивируемых клеток скерды (*Crepis capillaris* L. Wallr.) // Генетика.—1992.—28, № 6.—С. 51—61.
9. Зосимович В. П., Левенко Б. А., Юркова Г. Н., Легейда В. С. Выделение штаммов *Crepis capillaris* различной пloidности в культуре ткани // ДАН СССР.—1972.—203, № 5.—С. 1188—1189.
10. Sacristan M.D. Clonal development in tumorous cultures of *Sacristan capillaris* // Naturwissenschaften.—1975.—62.—P. 139—140.
11. Каллак Х. И., Баннер М. А. Цитогенетическая характеристика длительно культивированного каллуса креписа // Уч. зап. Тартуского ун-та.—1979.—№ 499.—С. 18—29.
12. Каллак Х. И. О кариотипической дифференцировке каллусных клеток в длительной культуре // Уч. зап. Тартуского ун-та.—1983.—№ 583.—С. 25—36.
13. Vapper M., Kallak H. Karyotypic differentiation of long-term callus culture of *Crepis capillaris* // Biol. plant.—1986.—28, N 6.—P. 417—423.
14. Каллак Х. И., Ярвекюльг Л. Я. О морфологической и цитологической разнокачественности каллуса гороха // Цитология и генетика.—1968.—2, № 5.—С. 408—414.
15. Каллак Х. И., Ярвекюльг Л. Я. Цитогенетическая характеристика некоторых штаммов каллуса гороха // Генетика зерновых бобовых культур.—Орел, 1972.—С. 7—16.
16. Kallak H., Jarvekulg L. Changes in chromosome complement in long-term pea callus cultures // Acta biol. Acad. Sci. hung.—1977.—28, N 2.—P. 183—189.
17. Kallak H., Jarvekulg L., Vapper M. Plant tissue culture as a convenient model studying various cytogenetic problems // Genetics in Soviet Estonia.—Таллин, 1978.—P. 26—38.
18. Knösche R., Günther G. Untersuchungen zur spontanen Polyploidisierung einer Gewebekultur von *Pisum sativum*. I. Der Nachweis von Restitutionszyklen // Biol. Zbl.—1980.—99, N 3.—S. 311—323.
19. Кунах В. А., Алхимова Е. Г., Войтюк Л. И. Изменчивость числа хромосом в каллусных тканях и регенерантах гороха // Цитология и генетика.—1984.—18, № 1.—С. 20—25.
20. Левенко Б. А., Кунах В. А., Юркова Г. Н. Цитогенетическое изучение каллусной ткани гаплоидного происхождения // Эксперим. полиплоидия у культур растений.—К.: Наук. думка, 1974.—С. 173—180.
21. Кунах В. А., Левенко Б. А., Зосимович В. П. Культура *in vitro* пыльников *Nicotiana tabacum*. II. Цитогенетический анализ длительно пассируемой ткани, образовавшейся из пыльников // Цитология.—1978.—20, № 2.—С. 166—172.
22. Кунах В. А., Левенко Б. А., Алпатов Л. К., Зосимович В. П. Изменчивость числа хромосом в процессе формирования штаммов каллусной ткани из листьев гаплоидных растений табака // Цитология.—1979.—21, № 1.—С. 107—112.
23. Кунах В. А., Легейда В. С. Цитогенетическое изучение цитокининнезависимого штамма культуры клеток табака // Эксперим. генетика растений.—К.: Наук. думка, 1982.—С. 74—79.
24. Кунах В. А. Особенности культуры изолированных тканей растений как клеточной популяции в связи с перспективой применения ее в генетике и селекции // Эксперим. генетика растений.—К.: Наук. думка, 1977.—С. 112—122.
25. Зосимович В. П., Левенко Б. А., Кунах В. А., Юркова Г. Н. Цитогенетическое изучение каллусных тканей томата от растений различной пloidности // Культура клеток растений.—К.: Наук. думка, 1978.—С. 97—104.
26. Koorneef M., van Diepen J. A. M., Hanhart C. J., Kieboom-

- De Waart A. C., Martinelli L., Schoenmakers H. C. H., Wijbrandt J. Chromosome instability in cell and tissue cultures of tomato haploids and diploids // *Euphytica*.—1989.—43, N 1—2.—P. 179—186.
27. Чугункова Т. В., Дубровная О. В., Шевцов И. А. Цитогенетические особенности каллусных культур диплоидной и тетраплоидной кормовой свеклы // *Цитология и генетика*.—1995.—29, № 2.—С. 49—54.
28. Чугункова Т. В., Дубровная О. В. Цитогенетический анализ каллусных культур и растений-регенерантов, полученных из эксплантов сахарной свеклы различной ploidy // *Цитология и генетика*.—1998.—32, № 4.—С. 9—15.
29. Lavania U. C., Srivastava S. Ploidy dependence of chromosomal variation in callus cultures of *Hyoscyamus muticus* L. // *Protoplasma*.—1988.—145, N 1.—P. 55—58.
30. Lavania U. C., Srivastava S. Evolutionary genomic change paralleled by differential responses of 2x and 4x calli cultures // *Experientia*.—1990.—46, N 3.—P. 322—324.
31. Савченко Е. К., Бадаева Е. Д., Кунах В. А., Бадаев Н. С. Карипотипический полиморфизм родственных линий кукурузы // *ДАН УССР. Сер. Б.*—1982.—№ 7.—С. 69—72.
32. Савченко Е. К., Кунах В. А. Сравнительная характеристика культуры тканей двух родственных линий кукурузы, различающихся по количеству гетерохроматина // *Культура клеток растений и биотехнология*.—М.: Наука, 1986.—С. 214—218.
33. Gubar E. K., Kunakh V. A. C-banding in *Zea mays* // *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Maize*.—Berlin; Heidelberg: Springer, 1994.—Vol. 25.—P. 366—381.
34. Левенко Б. А., Юркова Г. Н., Кунах В. А., Зосимович В. П. Малохромосомный злак *Zingeria* — новый модельный объект для культуры клеток и тканей растений // *ДАН СССР*.—1976.—228, № 1.—С. 209—210.
35. Легейда В. С., Левенко Б. А., Березенко Н. П., Лиферова В. В., Щибря Г. Р. Получение и изучение каллусной ткани при культивировании пыльников черешни и земляники // *Цитология и генетика*.—1976.—10, № 6.—С. 492—496.
36. Левенко Б. А., Юркова Г. Н., Кунах В. А., Легейда В. С. Поведение пыльников пшеницы и ржи в изолированной культуре // *Эксперим. генетика растений*.—Киев: Наук. думка, 1977.—С. 123—130.
37. Загорска Н., Димитров Б. Цитогенетическое изучение популяций клеток табака в культуре *in vitro*, полученных от растений разной ploidy // *Культура клеток растений*.—Киев: Наук. думка, 1978.—С. 93—97.
38. Negritiu I., Jacobs M., Cattoir A. *Arabidopsis thaliana* L., espèce modele en genétique cellulaire // *Physiol. veget.*—1978.—16, N 3.—P. 365—379.
39. Ono K., Tsukida T. Haploid callus formation from anther cultures in a cultivar of *Paeonia* // *Jap. J. Genet.*—1978.—53, N 1.—P. 51—55.
40. Chen C. C., Cheng C. M. Changes in chromosome number in microspore callus of rice during successive subcultures // *Can. J. Genet. and Cytol.*—1980.—22, N 4.—P. 607—614.
41. Boucaud M.-T., Gautlier J.-M. Cytophotometric study and statistical analysis of ploidy evolution in cultured tissues of *Nicotiana tabacum* // *Physiol. plant.*—1981.—51, N 2.—P. 207—214.
42. Singh B. D. Variation in chromosome number and structure in plant cells during *in vitro* culture // *Proc. Int. Symp. Plant Tissue and Cell Culture. Application to Crop Improvement (Czechoslovakia, 24—29 Sept. 1984)*.—Olomouc, 1984.—P. 305—314.
43. Sree Ramulu K., Dijkhuis P., Roest S., Bokelmann G. S., De Groot B. Early occurrence of genetic instability in protoplast cultures of potato // *Plant Sci. Lett.*—1984.—36, N 1.—P. 79—86.
44. Юркова Г. Н., Левенко Б. А., Новожилов О. В. Уровень ploidy клеток каллусной ткани пшеницы однозернянки // *Цитология и генетика*.—1985.—19, № 3.—С. 202—206.
45. Юркова Г. Н., Левенко Б. А., Новожилов О. В. Ploidy каллусной ткани твердой и мягкой пшеницы // *Цитология и генетика*.—1985.—19, № 4.—С. 264—267.
46. Escandon A., Martinez A., Caso O. H., Pomar M. C. Regeneration of aneuploid plants from tetraploid ( $2n = 24$ ) *Tradescantia crassifolia* Cav. through callus culture // *J. Plant Physiol.*—1985.—119, N 5.—P. 467—472.
47. D'Amato F. Spontaneous mutations and somaclonal variation // *Nucl. Tech. and in vitro Cult. Plant Improv. Proc. Int. Symp. (Vienna, 19—23 Aug.)*.—Vienna, 1986.—P. 3—10.
48. Pijnaker L. P., Hermelink J. H. M., Ferwerda M. A. Variability of DNA content and karyotype in cell cultures of an interdiaploid *Solanum tuberosum* // *Plant Cell Repts.*—1986.—5, N 1.—P. 43—46.
49. Быкова Е. В., Лев С. В., Мусаев Д. А. Цитогенетическое исследование каллусных тканей некоторых видов хлопчатника в длительно пассируемой культуре // *Цитология и генетика*.—1988.—22, № 3.—С. 49—51.
50. Schneider I. Zur karyotypischen Variabilität in Zell- und Gewebekulturen von haploidem *Nicotiana plumbaginifolia* // *Biol. Zbl.*—1989.—108, N 3.—P. 249—255.
51. Franklin C. I., Mott R. L., Yuke T. M. Stable ploidy levels in long-term callus cultures of loblolly pine // *Plant Cell Repts.*—1989.—8, N 2.—P. 101—104.
52. Taha R. M., Francis D. The relationship between polyploidy and organogenetic potential in embryo and root-derived tissue cultures of *Vicia faba* L. // *Plant, Cell, Tissue and Organ Cult.*—1990.—22, N 3.—P. 229—236.
53. Gözükmizi N., Ari S., Oraler G., Okatan Y., Unsal N. Callus induction, plant regeneration and chromosomal variations in barley // *Acta bot. neerl.*—1990.—39, N 4.—P. 379—387.
54. Раклявичене Д., Урбонайте Б. Содержание ядерной ДНК в процессе дедифференциации клеток каллуса табака в зависимости от типа ауксина и ploidy экспланта // *Физиология и биохимия культ. растений*.—1995.—27, № 5—6.—С. 367—373.
55. Jha S. Cytological analysis of embryogenic callus and regenerated plants of *Urginea indica* Kunth., indian squill // *Caryologia*.—1989.—42, N 2.—P. 165—173.
56. Shyamaprasad C., Sumitra S. Polyploidization of chromosomes of *Urginea indica* *in vitro* callus // *Indian J. Exp. Biol.*—1980.—18, N 11.—P. 1324—1325.
57. Sopory S. K., Tan B. H. Regeneration and cytological studies of anther and pollen calli of dihaploid *Solanum tuberosum* // *Z. Pflanzenzücht.*—1979.—82, N 1.—P. 31—35.
58. Хохлов С. С., Тырнов В. С., Гришина Е. В., Давоян Н. И., Зайцева М. И., Звержанская Л. С., Селиванов А. С., Суханов В. М., Шишкинская Н. А., Гусева А. И. Гаплоидия и селекция.—М.: Наука, 1976.—222 с.
59. Tawakley M., Sundhavani A. K., Reddy G. M. Chromosomal instability in callus of wild and cultivated genotypes of *Cicer* // *Indian J. Exp. Biol.*—1992.—30, N 7.—P. 628—631.
60. Ramulu K. S., Dijkhuis P., Hanisch Ten Gate, Groot B. Patterns of DNA and chromosome variation during *in vitro* growth in various genotypes of potato // *Plant Sci.*—1985.—41, N 1.—P. 69—78.
61. Balzan R. Karyotype instability in tissue culture derived from the mesocotyl of *Zea mays* seedlings // *Caryologia*.—1978.—31, N 1.—P. 75—87.
62. Кунах В. А. Особенности структурного мутагенеза в попу-



- лящих культивируемых клеток растений // Успехи соврем. генетики.—М.: Наука, 1984.—Вып. 12.—С. 30—62.
63. Митрофанов Ю. А. Индуцированная изменчивость хромосом эукариот.—М.: Наука, 1994.—142 с.
  64. Внучкова В. Л. Разработка метода получения растений-регенерантов томата в условиях культуры ткани / Тканевые и клеточные культуры в селекции растений.—М.: Колос, 1979.—С. 14—23.
  65. Zhang D. L., Li K. Q., Gu W., Hao L. F. Chromosome aberration and ploidy equilibrium of *Vicia faba* in tissue culture // Theor. and Appl. Genet.—1987.—75, N 1.—P. 132—137.
  66. Singh B. D. Origin of aneuploid variation in tissue culture of *Haplopappus gracilis* and *Vicia hajastana* // Caryologia.—1981.—34, N 3.—P. 337—343.
  67. Sacristan M. D. Karyotypic changes in callus cultures from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* (L) Wallr // Chromosoma.—1971.—33.—P. 273—283.
  68. Sheridan W. F. Long term callus cultures of *Lilium*: relative stability of the karyotype // J. Cell Biol.—1974.—63, N 2.—P. 313.
  69. Pages D., Jelaska S., Tomaseo M., Devide L. Triploidy in callus culture in *Vicia faba* L. investigated by the Giemsa C-banding technique // Experientia.—1978.—34, N 8.—P. 1016—1017.
  70. Ashmore S. E., Gould A. R. Karyotype evolution in tumour derived plant tissue culture analysed by Giemsa C-banding // Protoplasma.—1981.—106, N 34.—P. 297—308.
  71. Gould A. R. Chromosome instability in plant tissue cultures studied with banding techniques // Proc. V Int. Congr. Plant Tissue and Cell Cult. (Tokyo and Lake Yamanaka, 1982).—Tokyo, 1982.—P. 431—432.
  72. Ashmore S. E., Shapcot A. S. Cytogenetic studies of *Haplopappus gracilis* in both callus and suspension cell cultures // Theor. and Appl. Genet.—1989.—78, N 2.—P. 249—259.
  73. Ogiwara Y. Tissue culture in *Haworthia*. V. Characterization of chromosomal changes in cultured callus cells // Jap. J. Genet.—1982.—57, N 5.—P. 499—511.
  74. Singh R. J. Chromosomal variation in immature embryo derived calluses of barley (*Hordeum vulgare* L.) // Theor. and Appl. Genet.—1986.—72, N 5.—P. 710—716.
  75. Бабаева С. А., Петрова Т. Ф., Гапоненко А. К. Цитогенетика культивируемых *in vitro* соматических клеток и растений-регенерантов *Triticum durum* Desf. // Цитология и генетика.—1994.—28, № 4.—С. 25—30.
  76. Zorinyants S. E., Nosov A. V., Badaeva E. D., Smolenskaya I. N., Badaev N. N. Cytogenetic analysis of a long-term *Triticum Timofeevii* (Zhuk.) Zhuk. cell suspension culture // Plant Breeding.—1995.—114, N 5.—P. 219—225.
  77. Winfield M. O., Karp A., Lazzeri P. A., Davey M. R. Chromosome 5D instability in cell lines of *Triticum tauschii* and morphological variation in regenerated plants // Genome.—1995.—38, N 4.—P. 737—742.
  78. Mohanty B. D., Ghosh P. D., Maity S. Chromosome behaviour in long term callus culture in *Hordeum vulgare* L. // C.S.—1986.—N 41.—P. 10—11.
  79. Губарь Е. К., Кунах В. А. Изменения в распределении гетерохроматина в хромосомах диплоидных клеток *Crepis capillaris* L. Wallr. в культуре *in vitro* // ДАН УССР, сер. Б.—1988.—№ 9.—С. 66—69.
  80. Singh B. D. Effects of physical conditions of medium on karyotypes of cell populations *in vitro* // The Nucleus.—1975.—18, N 1—2.—P. 61—65.
  81. Singh B. D., Harvey B. L. Selection of diploid cells in suspension cultures of *Haplopappus gracilis* // Nature.—1975.—253, N 5491.—P. 453.
  82. Ernst S., Scheibner K., Diettrich B., Luckner M. Androgenetic cell cultures and plants from anthers of *Digitalis lanata* // J. Plant Physiol.—1990.—137, N 2.—P. 129—134.
  83. Demoise C. F., Partanen C. R. Effects of subculturing and physical condition of medium on the nuclear behavior of a plant tissue culture // Amer. J. Bot.—1969.—56, N 2.—P. 147—152.
  84. Kaneko K. Karyological studies on callus cells of *Haplopappus gracilis* // Kromosomo.—1974.—N 95.—P. 2943—2949.
  85. Kaneko K. Karyological studies in callus cells from stem, anther and ovule cultures of *Haplopappus gracilis* // Bull. Fukuoka Univ. Educ. Nat. Sci.—1975.—25.—P. 77—87.
  86. Hashim Z. N., Campbell W. F., Carman J. G. Normalization of the DNA content of telophase cells from wheat calli by nutrient modifications // Theor. and Appl. Genet.—1991.—82, N 4.—P. 413—416.
  87. Шамина З. Б., Фролова Л. В. Цитогенетическое изучение культуры ткани гаплопappa при длительном культивировании // Культура изолир. органов, тканей и клеток растений.—М.: Наука, 1970.—С. 149—154.
  88. Binarova P., Dolezel J. Alfalfa embryogenic cell suspension culture: Growth and ploidy level stability // J. Plant Physiol.—1988.—133, N 5.—P. 561—566.
  89. Павлова М. К., Пивень М. М., Шунта Л. В., Мариновська Л. В., Тимохина Н. Т., Малюк В. I. Репродукция *in vitro* клѳтин *Beta vulgaris* L. при спланованих модифікаціях поживного середовища. 2. Перенесення культури з твердого в рідке середовище // Укр. бот. журн.—1977.—34, № 2.—С. 134—137.
  90. Малюк В. I., Павлова М. К., Тимохина Н. Т., Пивень М. М., Шунта Л. В., Мариновська Л. В. Репродукция *in vitro* клѳтин *Beta vulgaris* L. при спланованих модифікаціях поживного середовища. 4. Оптимізація середовища // Укр. бот. журн.—1977.—34, № 4.—P. 340—347.
  91. Попов А. С., Волкова Л. А. Криосохранение и некоторые изменения культур клеток диоскори на среде без витаминов // Физиология растений.—1994.—41, № 6.—С. 923—928.
  92. Casale O. I., Garcia de Garcia E. Variaciones citogeneticas del calle de tejide cotiledonar de *Canavalia ensiformis* L. // Acta biol. venez.—1981.—11, N 1.—P. 1—19.
  93. Chung G. Effect of chemical and physical factors on the chromosome number in *Nicotiana* anther callus cultures *in vitro* // Cytologia.—1972.—7.—P. 381—386.
  94. Кулиева Ф. Б., Шамина З. Б. Сравнительное цитогенетическое изучение культуры ткани креписа при различных условиях культивирования // Физиология растений.—1972.—19, № 2.—С. 372—374.
  95. Gordon S. A., Kremer P., Venketeswaran S. Growth and cytological responses to white and far-red light of *Haplopappus* cells in suspension culture // Radiat. Bot.—1974.—14, N 1.—P. 17—22.
  96. Kohler K.-H., Binh Le Tran, Kahl M. Wechselwirkungen von Licht und Phytohormonen bei der Gewebekultur // Potsdam. Forsch., B.—1988.—N 57.—S. 128—132.
  97. Sitbon M. Production of haploid *Gerbera jamesonii* plants by *in vitro* culture of unfertilized ovules // Agronomie.—1981.—1, N 9.—P. 807—812.
  98. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 1. Изменчивость в онтогенезе // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 6.—С. 5—35.
  99. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 2. Изменчивость в природе // Биополимеры и клетка.—1995.—11, № 6.—С. 5—40.
  100. Shimada T. Chromosome constitution of tobacco and wheat callus cells // Jap. J. Genet.—1971.—46, N 4.—P. 235—241.
  101. Кунах В. А., Сидоренко П. Г., Зосимович В. П. Влияние

- кинетина на репродукцию клеток различной пloidности // Успехи полиплоидии.—К.: Наук. думка, 1977.—С. 203—215.
102. Кунах В. А., Алпатов Л. К. Роль фитогормонов в изменчивости числа хромосом в культуре тканей *Naplorappus gracilis* // ДАН СССР.—1979.—245, № 4.—С. 967—970.
  103. Ghosh A., Gadhil V. N. Selection pressure theory and predominance of diploidy in suspension culture // Indian J. Exp. Biol.—1980.—18, N 9.—P. 958—961.
  104. Reddy L. V., Peterson P. A. Effect of age and genetic background on the *in vitro* maize endosperm callus initiation // Maydica.—1987.—32, N 2.—P. 151—161.
  105. Sengupta J., Sen S. Comparative analysis of the effect of growth hormone on morphology and cytology of callus culture of *Crepis tectorum* L. // Caryologia.—1987.—40, N 3.—P. 221—227.
  106. Li Shisheng, Zhang Yuling. Хромосомная изменчивость каллуса и растений-регенерантов пшеницы // Acta Genet. Sin.—1991.—18, N 4.—P. 332—338.
  107. Nayak S., Sen S. Growth, chromosome number and DNA content in callus of *Ornithogalum thyrosides* as influenced by different auxins // Cytobios.—1993.—76, N 306—307.—P. 209—216.
  108. Honisch ten Cate C. H., Ramulu K. S. Callus growth, tumour development and polyploidization in the tetraploid potato cultivar Bentje // Plant Sci.—1987.—49, N 3.—P. 209—216.
  109. Кунах В. А., Зосимович В. П. Влияние кинетина на уровень и типы абераций хромосом в культуре тканей *Naplorappus gracilis* // Генетика.—1977.—13, № 8.—С. 1355—1365.
  110. Соловьян В. Т., Попович В. А., Кунах В. А. Переустройство генома культивируемых клеток *Crepis capillaris* L. (Wallr) // Генетика.—1989.—25, № 10.—С. 1768—1775.
  111. Bassiri A., Carlson P. S. Isozyme patterns in tobacco plant parts and their derived calli // Crop Sci.—1979.—19, N 6.—P. 909—914.
  112. Burmeister G., Hasel W. Comparison of the  $\beta$ -glycosidases from *Cicer arietinum* L. cell cultures and whole seedlings // Planta med.—1980.—40, N 1.—P. 40—48.
  113. Berlin M. B. Variation in nuclear DNA content of isonicotinic and hydrazide-resistant cell lines and mutant plants of *Nicotiana tabacum* // Theor. and Appl. Genet.—1982.—63, N 1.—P. 57—63.
  114. Cullis C. A., Cleary W. Fluidity of the flax genome // Plant Genet.: Proc. 3rd Annu. ARCO Plant Cell Res. Inst.—UCLA Symp. Plant Biol. (Keystone, Colo, Apr. 13—19, 1985).—New York, 1985.—P. 303—310.
  115. Cullis C. A. The generation of somatic and heritable variation in response to stress // Amer. Natur.—1987.—130, Suppl.—P. 62—73.
  116. Floh E. I. S., Handro W., Morgante J. S. Isozymic patterns of peroxidase and IAA-oxidase in cultured tissues of tobacco plants of different ploidy // Rev. bras. biol.—1989.—49, N 3.—P. 627—632.
  117. Bogani P., Simoni A., Bettini P., Pellegrini M. G., Schipani C., Simeci C., Storti E., Buiatti M. Hormones and permanent epigenetic changes in tomato somaclones // Atti/Assoc. genet. ital.—1992.—38.—P. 59.
  118. Ву Дык Куанг, Шамина З. Б. Цитогенетический анализ клонов, полученных от индивидуальных клеток и протопластов кукурузы // Цитология и генетика.—1985.—19, № 1.—С. 26—32.
  119. Кулаева О. Н. Фитогормоны как регуляторы активности генетического аппарата и синтеза белка у растений // Новые направления в физиологии растений.—М.: Наука, 1985.—С. 62—84.
  120. Сидорова К. К. Развитие идей Н. И. Вавилова в исследованиях по экспериментальному мутагенезу // Успехи соврем. биологии.—1993.—113, № 3.—С. 259—268.
  121. Картель Н. А., Лобанок Е. В., Фомичева В. В. Фитогормоны и фитопатогенность бактерий.—Минск: Наука і тэхніка, 1994.—112 с.
  122. Пустовойтова Т. Н., Баврина Т. В., Ложникова В. Н., Жданова Н. Е. Использование трансгенных растений для выяснения роли цитокининов в устойчивости к засухе // ДАН СССР.—1997.—354, № 5.—С. 702—704.
  123. Виленский Е. Р., Щербаков В. К. Роль фитогормонов в естественном и индуцированном мутационном процессе // Цитология и генетика.—1985.—19, № 3.—С. 214—217.
  124. Щербаков В. К. Физиолого-биохимические защитно-восстановительные системы растений и их значение для селекции // Вестн. с.-х. науки.—1982.—№ 11.—С. 48—58.
  125. Захаров И. А., Шварцман П. Я. Экспериментальное изучение мутагенеза // Развитие эволюционной теории в СССР. 1917—1970 гг.—Л.: Наука, 1983.—С. 79—82.
  126. Ajala F. J. An evolutionary dilemma: fitness of genotypes versus fitness of populations // Canad. J. Genet. and Cytol.—1969.—11, N 2.—P. 439—456.
  127. Leigh E. G. Natural selection and mutability // Amer. Natur.—1970.—104, N 937.—P. 301—305.
  128. Гродзинский Д. М. Надежность растительных систем.—К.: Наук. думка, 1983.—368 с.
  129. Суходолец В. В. Природа адаптивных эволюционных изменений: приспособленность и экологический потенциал // Генетика.—1998.—34, № 12.—С. 1589—1596.
  130. Татаринов Л. П. Очерки по теории эволюции.—М.: Наука, 1987.—252 с.
  131. Константинова Т. Н., Аксенова Н. П., Баврина Т. В., Чайлахян М. Х. О способности каллусов стебля табака к образованию вегетативных и генеративных почек в культуре *in vitro* // ДАН СССР.—1969.—187, № 2.—С. 466—469.
  132. Fidgeon C. F., Wilson G. Uptake and accumulation of  $\alpha$ -naphthalene acetic acid by cell suspensions of *Gallium mollugo* L. // J. Exp. Bot.—1988.—39, N 199.—P. 241—249.
  133. Беляев Д. К. Дестабилизирующий отбор // Развитие эволюционной теории в СССР: 1917—1970 гг.—Л.: Наука, 1983.—С. 266—277.
  134. Трут Л. Н. Эволюционная концепция Д. К. Беляева—десять лет спустя // Генетика.—1997.—33, № 8.—С. 1060—1068.
  135. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция.—Киев: Наук. думка, 1990.—280 с.
  136. Соловьян В. Т., Захленюк О. В., Кунах В. А. Перестройки генома раувольфии в процессе культивирования *in vitro* // Биополимеры и клетка.—1990.—6, № 1.—С. 103—106.
  137. Соловьян В. Т., Спиридонова Е. В., Кунах В. А. Геномные перестройки в культивируемых клетках *Rauwolfia serpentina*. Множественный характер геномных изменений // Генетика.—1994.—30, № 2.—С. 250—254.
  138. Соловьян В. Т., Спиридонова Е. В., Кунах В. А. Геномные перестройки в культивируемых клетках *Rauwolfia serpentina*. II. Связь с межвидовой изменчивостью // Генетика.—1994.—30, № 3.—С. 399—403.
  139. Kunakh V. A. Somaclonal variation in *Rauwolfia* // Biotechnology in agriculture and forestry. Somaclonal variation in crop improvement. II.—Berlin: Springer, 1996.—Vol. 36.—P. 315—332.
  140. Соловьян В. Т. Приспособление клеток к неблагоприятным факторам. Характеристика адаптивных ответов // Биополимеры и клетка.—1990.—6, № 4.—С. 32—42.

141. Соловьян В. Т. Приспособление клеток к неблагоприятным факторам. Индукция геномных перестроек // Биополимеры и клетка.—1991.—7, № 1.—С. 50—54.
142. Chattopadhyay D., Sharma A. K. Chromosomal variation in callus tissues in culture of *Coccinia indica*, a dioecious cucurbit // Cytobios.—1992.—71, N 286—287.—P. 171—180.
143. Вахтин Ю. Б. Генетическая теория клеточных популяций.—Л.: Наука, 1980.—168 с.
144. Вахтин Ю. Б., Пинчук В. Г., Швембергер И. Н., Бутенко З. А. Клонально-селекционная концепция опухолевого роста.—К.: Наук. думка, 1987.—216 с.
145. Бродский В. Я. Формы изменчивости в клеточной популяции такие же, как в популяции организмов. Биология сердечных миоцитов // Онтогенез.—1994.—25, № 5.—С. 29—43.
146. Мамаева С. Е. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре // Цитология.—1996.—38, № 8.—С. 787—814.
147. Браун В. Генетика бактерий.—М.: Наука, 1968.—446 с.

УДК 575.2:581.143.6

Поступила в редакцию 17.03.99