

Геномная изменчивость соматических клеток растений. 5. Изменчивость роста и митотического режима 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 клеточных популяций высших растений при введении их в культуру in vitro. В ходе получения пассируемых культур выявлен критический период — период становления штамма. В данном периоде (это, как правило, 2–8-й пассажи) наблюдаются процессы интенсивной адаптации клеточных популяций к автономному росту вне организма. В это время происходит дальнейшая и еще более существенная по сравнению с первичным каллусом перестройка физиологических процессов и структуры клеточных популяций, наблюдается переход от общих для всего организма механизмов регуляции суточной периодичности процессов к внутриклеточным, формируется гомеостатический механизм регуляции, специфический для популяции культивируемых клеток, происходит позитивная селекция клеток, приспособленных к условиям существования in vitro, и элиминация неприспособленных. Эти процессы сопровождаются значительными изменениями темпа роста и других морфологических особенностей клеточных штаммов, длительности клеточного цикла и ритма митотической активности, возрастанием полиморфизма (гетерогенности) клеточных популяций по многим признакам. Сформировавшиеся, адаптированные клеточные штаммы характеризуются, как правило, стабильностью признаков, возникших в периоде становления штамма. Развивается положение о том, что пассируемая клеточная культура представляет собой уникальную биологическую систему — клоновую популяцию, роль организмов в которой исполняют клетки, изначально запрограммированные на выполнение определенных структурных и функциональных задач как часть многоклеточного организма. Она может служить помимо известных областей применения также моделью для изучения особенностей изменчивости и адаптации, а в конечном счете — эволюции клеточных сообществ разного уровня интегрированности, особенно при переходе с высокого уровня на более низкий, т. е. в условиях так называемой «регрессивной эволюции».

Введение. Введение клеток высших растений в культуру *in vitro* — процесс сложный и многоэтапный. Он представляет собой адаптацию клеток к новым условиям существования на основе их дедифференцировки и кардинальной перестройки процессов метаболизма. Далеко не всегда попытки получить пассируемую культуру завершаются успешно. В одних случаях не удается индуцировать даже первые деления клеток *in vitro*, в других — культуры могут прекратить рост и погибнуть на

разных, чаще на первых этапах выращивания. Растущие культуры, даже полученные из одного и того же исходного материала, часто отличаются по типу и темпу роста, особенностями метаболизма, в частности, накоплением веществ вторичного метаболизма. Эти явления, как правило, труднопрогнозируемы и плохо управляемые.

Что лежит в основе этих явлений? Чем определяется успех в получении пассируемых культур? Почему дедифференцированные клетки первичных каллусов в одних случаях могут формировать пассируемую культуру, а в других — нет? Какие изменения происходят в структуре клеточных попу-

ляций в процессе их адаптации к условиям изолированного роста и чем они обусловлены? Попытка ответить на поставленные вопросы и составляет цель настоящей работы. Для этого на примере собственных и литературных данных в обзоре рассмотрена динамика клеточных популяций в процессе их адаптации к условиям роста *in vitro*.

Изменчивость роста при получении пассируемых культур. Успешная индукция каллусообразования, или первых делений изолированных протопластов, далеко не всегда гарантирует получение пассируемой суспензионной или каллусной культуры. Примеров, когда первичный каллус не дал начало культуре, способной к длительному росту в условиях *in vitro*, имеется немало. Это было показано в опытах с кукурузой [1—4], ячменем [5, 6], рожью [7, 8], пшеницей [9, 10], креписом [11, 12], капустой [13], томатами [14], табаком *N. alata* [15], картофелем [16], горохом [17, 18], хлопчатником [19, 20], эксплантами из корнеплодов сахарной свеклы [21], рядом сортов риса [22, 23] и многими другими растениями [24—26].

На сегодня установлено, что способность к росту в пассируемой культуре, темп и тип роста клеточных культур, их способность к разным типам органогенеза и регенерации зависят от состава питательной среды и используемых регуляторов роста, условий выращивания исходных растений и полученного от них каллуса, от тканевой принадлежности и степени дифференциации первичного экспланта, от вида растения, возраста, особенностей его генотипа и других факторов (см., например, [4, 11, 13, 16, 18, 21, 22, 24, 26—38]). Генотипическая компонента при этом является одной из наиболее существенных. В частности, установлено, что практически любой генотип для наиболее полной реализации признаков, в том числе и признаков «темпа роста» и «типа роста» в изолированной культуре, требует соответствующую по составу питательную среду и специфические условия выращивания (температурный и световой режимы, влажность, размер экспланта, соотношение между размером экспланта и количеством питательной среды, длительность пассажа и др.). Средовые влияния здесь достоверны, а показатели взаимодействия генотип × среда еще более высоки и значимы [39]. Однако условия, оптимальные для индукции каллусообразования или выделения и регенерации протопластов, и условия, оптимальные для пассируемого роста этих же генотипов, могут значительно различаться [10, 16, 18, 20, 24, 40—46]. Например, в опытах с рядом злаков (кукуруза, рожь, ячмень, рис, овес, пшеница *Triticum monococcum*, *T. aestivum*, *T. dicoccum*, сорго, просо, райграс,

костер) было показано, что для индукции каллусообразования критическим является наличие в питательной среде ауксинов, а для получения пассируемых культур — цитокининов [47]. При этом разные генотипы характеризуются различной способностью образовывать пассируемую культуру, темп и другие особенности роста такой культуры часто также определяются особенностями исходного генотипа [48—51], а признак «прирост биомассы» каллуса *in vitro* высоконаследуем [30, 52, 53]. Установлена также генетическая обусловленность реакции роста культивируемых клеток на добавление экзогенных ауксинов и цитокининов [54—56]. Гормонезависимость, в частности цитокининнезависимость, является признаком, контролируемым ядром [57], его проявление модулируется, по-видимому, эпигенетически и цитокининнезависимость не является результатом генетических мутаций [58]. Также показано, что уровень метаболизма, например 2,4-Д у каллусов сои, значительно зависит от сорта, происхождения каллусных тканей (семядоли, листья или корни) и возраста исходного растения [59]. Эта реакция может не зависеть от уровня эндогенных фитогормонов. Например, у рапса, сурепицы и листовой капусты ростовая реакция каллусных тканей на экзогенную индолуксусную кислоту (ИУК) не зависела от содержания в исходном материале (междоузлиях) эндогенных ИУК, абсцизовой (АБК) и гибберелловой кислот [60].

Имеются данные о том, что различия в оптимальных условиях для роста пассируемых культур могут обуславливаться эпигенетически. В частности, у табака каллусы, полученные из сердцевинной паренхимы верхней части растений, оказались автотрофны по цитокининам независимо от возраста растений. Сердцевина междоузлий тех же растений, но вычлеченных из нижней части, образовывала различные по потребности в гормонах каллусы в зависимости от возраста — ювенильные растения образовывали цитокининавтотрофные, а цветущие — цитокининзависимые каллусы. Авторы считают, что меристематические ткани обладают способностью образовывать цитокининавтотрофные каллусы, утрачиваемой по мере старения клеток, в данном случае сердцевинной паренхимы [61].

При получении пассируемых культур и их дальнейшем выращивании как на измененной по составу питательной среде, так и на тех же средах, где было индуцировано каллусообразование, описано спонтанное возникновение различных морфологических типов клеточных штаммов — органогенных и неорганизовано растущих, плотных, рых-

лых, различной степени оводненности и окраски, различных по темпу роста и даже прекращающих рост и гибнущих через несколько (как правило, через 2—4) пассажей после введения в культуру *in vitro*. Описано возникновение разных типов каллусов и при культивировании тканей, полученных от одного и того же материала в одних и тех же условиях [12, 17, 62—70]. Наиболее высокая частота возникновения различных новых морфотипов наблюдается в течение первых 3—5, чаще всего до 8—14-го пассажей, и особенно она возрастает при изменении на этом этапе культивирования условий выращивания. В это время возникают иногда также гормонезависимые клеточные линии, ранее называвшиеся «привычными клонами» [24]. Наиболее полная сводка спонтанно возникших морфотипов каллусных тканей составлена на примере риса, для которого выделено и описано 33 таких морфотипа [71].

Одной из причин этого явления может быть изменение метаболизма клеток в условиях *in vitro* и как одно из следствий — изменение реакции, по крайней мере, какой-то части клеточной популяции на условия их выращивания. В частности, в процессе культивирования установлено изменение количества эндогенных регуляторов роста в клетках. Например, у *Pennisetum purpureum* процесс каллусогенеза на участках молодых листьев сопровождался резким возрастанием количества цитокининов в тканях. В тканях незембрионного каллуса цитокининов накапливалось в 2 раза больше, чем в эмбрионном. При переходе каллуса к эмбриогенезу в нем возрастало количество эндогенных ИУК и АБК [72]. Изучение двух типов цитокининезависимых каллусов, возникших из сердцевинной паренхимы табака, показало, что в плотных каллусах активность цитокининов природного типа была выше, чем в рыхлых, в 2 раза [73]. Показаны различия между штаммами с разными типом и темпом роста и по скорости выделения этилена, которые могут достигать одного—двух порядков [74, 75], а также по другим биохимическим, генетическим и цитогенетическим параметрам [63, 64, 66, 76]. В частности, описаны штаммы, отличающиеся уже в первых пассажах по содержанию и спектру фенолов, алкалоидов, углеводов, свободных и связанных аминокислот, ДНК, РНК, белков, определенных ферментов и др. [74, 75, 77—79].

В основе описанных отличий, в том числе и гормонально обусловленных, лежит, по-видимому, различный генетический статус культивируемых клеток. Генетические отличия между клетками могли быть как в исходном материале, проявившись затем *in vitro*, так и возникнуть в процессе

культивирования *in vitro*. Так, было показано, что темп роста каллусных тканей может зависеть от наличия и состояния генов, влияющих на рост интактных растений. В частности, у пшеницы известны гены *Rht* и *Ppd*, отвечающие за высоту растений. В основе их действия лежит изменение метаболизма фитогормонов. Темп роста каллусных тканей пшеницы зависел от наличия того или иного аллеля этих генов в исходном растении, т. е. практически — от генетически обусловленной высоты исходных растений [80, 81]. Подобное явление описано и у ржи [81].

Признаки «темпа роста» и «типа роста» пассируемых клеточных культур, как и многие другие генетически обусловленные признаки, в культуре *in vitro* могут быть и фенотипами, возникшими при выращивании клеточных культур в разных условиях и на разных по составу питательных средах. Возникновение фенотипов индуцируется экзогенными фитогормонами, а также факторами (условиями) выращивания, в том числе и минеральными элементами питательной среды. Следует подчеркнуть, что практически любое изменение факторов окружающей среды приводит к изменению содержания эндогенных фитогормонов [82, 83], что, по-видимому, обуславливает изменение фенотипа пассируемой культуры.

Таким образом, анализ имеющихся литературных данных показывает, что успех в получении пассируемой культуры тканей определяется комплексом причин. На индукцию каллусообразования и получение пассируемой клеточной культуры влияют как генетические факторы, так и множество других внутренних и внешних факторов, в том числе элементов питательной среды. При этом весьма существенную роль играет взаимодействие генотип × среда. В то же время известно, что в процессе культивирования клеток *in vitro* структурно-функциональные особенности их генотипа существенно изменяются, что не может не отражаться на особенностях их роста и, в частности, на успехе в получении культур, способных к росту в условиях длительного пассирования.

Многолетние исследования особенностей формирования пассируемых штаммов и механизмов адаптации клеток к условиям изолированного роста, проведенные в нашей лаборатории, позволили установить явления, в значительной мере общие для популяций культивируемых клеток высших растений. Рассмотрим это на некоторых конкретных примерах.

Были проведены исследования изменчивости темпа роста при введении в культуру *in vitro* тканей ряда видов растений, относящихся к разным

семействам, а именно: *Haplopappus gracilis* (Nutt.) A. Gray и *Crepis capillaris* (L.) Wallr из сем. Asteraceae, *Nicotiana tabacum* L. и *Lycopersicon esculentum* Mill. из сем. Solanaceae, *Zea mays* L. и *Zingiber biebersteiniana* (Claus) P. Smirn. из сем. Poaceae, *Pisum sativum* L. из сем. Fabaceae, *Panax ginseng* C. A. Mey., *Eleutherococcus* (*Acanthopanax*) *senticosus* (Rupr. et Maxim) Harnis и *Aralia mandshurica* Rupr. et Maxim из сем. Araliaceae, шести видов рода *Rauwolfia* L., в том числе *R. serpentina* Benth из сем. Apocynaceae и некоторых других. Наряду с диплоидными растениями в экспериментах с томатами использовали гаплоидные и тетраплоидные формы, с табаком — гаплоиды и гаплопаппусом — тетраплоиды.

Изучение нескольких сотен образцов тканей в процессе пассирования показало, что к концу первого пассажа каллусы, образовавшиеся на эксплантах из разных органов и от растений различного возраста и генотипа, но относящиеся к одному виду, как правило, морфологически значительно не отличались друг от друга. При дальнейшем пассировании штаммы независимо от их происхождения изменялись по ряду признаков, прежде всего по типу и темпу роста. Эти изменения наблюдали, чаще всего, в течение 2—8-го, иногда до 12-го пассажа.

Изучая изменчивость прироста биомассы у каждого отдельного штамма при пассировании, были выделены 5 основных ее типов (рис. 1). К 1-му типу отнесены штаммы, в которых не отмечали существенного изменения прироста биомассы в процессе пассирования. К этой группе относилось большинство штаммов табака, ряд штаммов гаплопаппуса, томатов, кукурузы, гороха, зингерии. У большинства изученных штаммов креписа, томатов, почти у половины изученных штаммов гаглопаппуса и некоторых штаммов табака, кукурузы, гороха, элеутерококка, женьшеня, аралии, разных видов раувольфии изменение темпа роста шло по 2-му типу. В этом случае отмечено снижение прироста биомассы, как правило, в течение 3—6-го, иногда до 8—12-го пассажей. При дальнейшем пассировании прирост увеличивался до уровня первых пассажей, а иногда и до более высокого уровня. Почти третья часть изученных штаммов гаглопаппуса, некоторые штаммы креписа, гороха, кукурузы характеризовались изменением темпа роста по 3-му типу, при котором наблюдались два снижения прироста биомассы в процессе формирования штаммов. В группу 4-го типа вошло большинство штаммов гороха, кукурузы, зингерии, разных видов рода *Rauwolfia* и представителей сем. Araliaceae, а также штаммы гаглопаппуса и креписа,

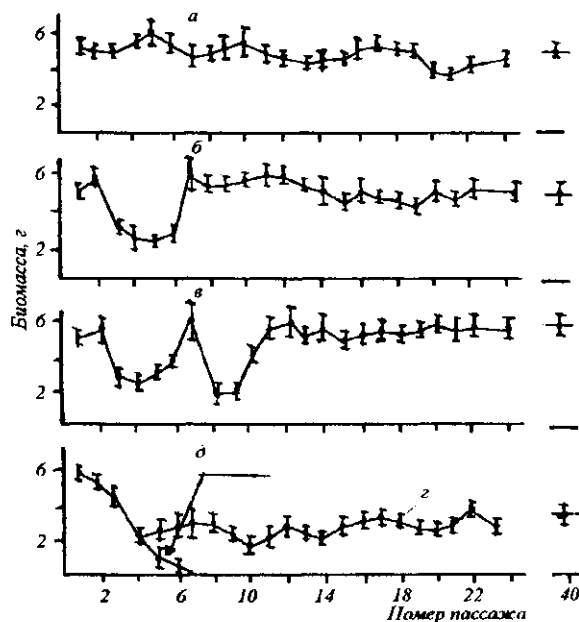


Рис. 1. Основные типы (а — 1-й; б — 2-й; в — 3-й; г, д — 4-й и 5-й) изменчивости прироста биомассы в процессе формирования клеточных штаммов

характеризующиеся, как правило, спонтанным органогенезом. Пятый тип роста (прекращение роста и в дальнейшем гибель ткани) отмечен у некоторых штаммов зингерии, гороха, кукурузы, томатов, у двух штаммов гаглопаппуса, у многих штаммов разных видов раувольфии и разных представителей аралиевых. В пассируемых штаммах, начиная с 8—12-го, изредка более позднего пассажа значительных изменений темпа роста не отмечали.

В культуре тканей томатов, табака, гаглопаппуса и креписа возраст и сортовая принадлежность растения, его плоидность, а также тканевое происхождение исходного экспланта не определяли тип изменчивости прироста биомассы в процессе формирования штаммов. Распределение штаммов по этому признаку носило случайный характер. У гороха, кукурузы и зингерии такая зависимость проявлялась достаточно четко. Рассмотрим это на конкретных примерах.

У гороха способность каллусов к росту в пересадочной культуре не совпадала со способностью к первичному каллусообразованию. Например, сорт Одесский 58, характеризующийся высокой каллусообразующей способностью всех типов эксплантов

на всех изученных средах, оказался практически не способным образовывать пассируемую ткань. В целом, если интенсивность образования первичного каллуса у разных образцов с учетом всех типов изученных сред убывала в направлении Одесский 58 > L1072 > L1288 > Уладовский юбилейный > > L851, то способность к формированию пассируемых тканей и их интенсивность роста при использовании тех же сред убывала в направлении L1288 > > L1072 > Уладовский юбилейный > L851 > Одесский 58. Все каллусные ткани гороха линий L1288 и L1072 относятся к 1—3-му типам изменчивости прироста биомассы за пассаж, сорта Одесский 58 — к 5-му типу, линии L851 — к 4-му и 5-му типам, а тканям сорта Уладовский юбилейный были свойственны все типы изменчивости [17]. Сходную картину наблюдали и у кукурузы. При этом способность к формированию пассируемых тканей и интенсивность их роста убывала в направлении ЧК 218 > Аккорд 72 > Киевский 8 > Меччик Мангальсдорфа > ВИР 27 со сходным для гороха распределением по типам изменчивости прироста биомассы в процессе формирования штаммов [1].

У кукурузы, гороха и зингерии значительное влияние на способность к росту в пересадочной культуре оказывала также тканевая принадлежность исходного экспланта. Все каллусы листового происхождения кукурузы и гороха отнесены нами к 4-му и 3-му типам изменчивости прироста биомассы, тогда как каллусы из других органов характеризовались всеми типами изменчивости. При этом пассируемую ткань листового происхождения удалось получить у гороха лишь от линий L1288 и L1072 и сорта Уладовский юбилейный, а у кукурузы — только у ЧК 218. У зингерии каллус из мезокотила проростков и оси колоса взрослого растения характеризовался 1-м типом изменчивости прироста биомассы, из других органов (лист, стебель) — 4-м и 5-м типами.

Различия в распределении тканей по типам изменчивости прироста биомассы в процессе формирования штаммов, установленные между представителями разных семейств, можно объяснить тем, что, в частности, для злаков и гороха состав используемых питательных сред не был оптимальным. Особенно это можно видеть на примере гороха — на средах, содержащих 2,4-Д, генотипические и тканевые различия в способности к формированию пассируемых тканей проявились меньше, чем на обедненных средах [17].

Всей совокупности данных, полученных при изучении особенностей роста, мы дали следующее объяснение. В первичных эксплантах каллусные клетки еще испытывают зависимость от исходной

ткани. Изменение этого состояния происходит в течение определенного периода времени, что может быть обусловлено способностью клеток сохранять метаболические продукты и использовать или выделять их в течение ряда клеточных поколений после переноса в новую среду. Это так называемый метаболический лаг-период, сохранение эндогенных промежуточных продуктов метаболизма, который четко проявляется также у микроорганизмов [84]. Следовательно, активный рост каллуса в течение 1—3-го пассажей может быть обусловлен тем, что на первых этапах культивирования для клеток каллуса сохраняются условия, сопоставимые с таковыми в интактном организме. После окончательного исчезновения этих условий происходят процессы адаптации клеточных популяций к изменившимся условиям существования, перестройка ее структуры за счет выживания клеток, наиболее приспособленных к условиям изолированного роста. В этом периоде развития штамма часть клеток устраняется от размножения. Указанные процессы и находят свое выражение в снижении темпа роста и/или в увеличении размаха изменчивости по этому признаку практически во всех изученных штаммах (что было нами установлено при определении коэффициента вариации), в появлении отдельных очагов интенсивного роста на фоне медленно растущей или вовсе не растущей каллусной ткани, в возникновении с высокой частотой различных морфотипов каллусных тканей и суспензионных культур. Тип изменчивости роста штамма при получении пассируемой культуры, возможность и скорость адекватной перестройки клеточной популяции применительно к условиям существования *in vitro* определяются не только конкретными условиями их выращивания, но и генотипом исходного растения, в том числе эпигенетическими особенностями первичного экспланта. В ряде случаев по тем или иным причинам популяция не приспособляется и ткань погибает. Адаптированные, сформированные штаммы в постоянных условиях выращивания характеризуются, как правило, стабильным ростом.

Высказанное предположение о том, что в указанном периоде развития штаммов (2—8-й, иногда до 12-го пассажа) происходит интенсивная перестройка физиологических процессов и генетической структуры популяций культивируемых клеток растений, которая и определяет успех в получении пассируемых культур, нашло свое подтверждение при изучении митотического режима культивируемых клеток.

Митотический режим и его изменчивость. Успех в получении пассируемых клеточных штаммов

определяется способностью клеток к длительному размножению в условиях изолированной культуры. Известно, что в культуре *in vitro*, как и в интактных организмах, клетки делятся, как правило, митотически. Поэтому темп и другие особенности роста клеточных штаммов зависят прежде всего от особенностей их митотического режима. Другими словами, для понимания причин успеха или неудачи при введении клеток в культуру *in vitro*, особенностей и механизмов адаптации их к условиям изолированного роста следует в первую очередь рассмотреть особенности изменчивости их митотического режима. При решении этого вопроса нужно исходить из следующих фактов и предположений.

Митотический режим ткани, ее митотическую активность определяет количество клеток, вступающих в единицу времени в митоз. В интактных организмах митотическая активность ритмически изменяется, при этом наблюдают 1—2, реже — 3—4 подъема числа митозов в течение суток [85—90]. Ритмика многих биологических процессов, в том числе суточная (циркадная) ритмика митотической активности, характеризуется стабильностью, гомеостатичностью механизма биологических часов, имеет эндогенную генетическую природу [91—95]. При сохранении ритма характер кривой суточной митотической активности (количество подъемов и время их проявления) может быть разным в меристеме разных органов, например, в меристеме побегов и корней ежи сборной [96]; он может изменяться в зависимости от плоидности растения [97], от температуры, сезона, длительности светового дня и других факторов [89, 97, 98].

Суточная ритмика митотической активности обнаружена и в первичном каллусе различного происхождения. Впервые это было установлено для первичного каллуса топинамбура *Helianthus tuberosus* [99]. Здесь митозы начинались через 36 ч после вычленения экспланта. Они наблюдались через каждые 12 ч, причем, как отмечают авторы, все пролиферирующие клетки, формирующие каллус, делились одновременно. В наших экспериментах с гаглопаппусом в первичном каллусе, образованном как на листовом, так и на стеблевом эксплантах четырехмесячного растения, также был обнаружен четкий ритм митотической активности с одним подъемом в ночное время суток. Максимум числа митозов наблюдали в 20—22 ч (рис. 2, а). Сравнение кривых суточного числа митозов разных первичных каллусов не показало статистически достоверных различий между ними [100—102].

Во 2—3-м пассажах наблюдали нарушение суточного ритма митотической активности, вплоть до аритмии. Статистический анализ кривых суточной

митотической активности пяти изученных штаммов гаглопаппуса, полученных от разных растений разного возраста, выявил существенные отличия между первичным каллусом и вторым пассажем и, особенно высокодостоверно, между первичным каллусом и третьим пассажем. Аритмия числа митозов проявлялась, как правило, в более частом появлении и неритмичном чередовании подъемов их числа, выраженность которой в это время у разных штаммов была разной (рис. 2, б, в; 3). При дальнейшем пассировании этих штаммов в них устанавливался четкий ритм митотической активности, что было показано, начиная с 8-го пассажа. В частности, в 8, 11, 15-м пассажах и в течение 3—4-го года культивирования характер распределения числа митозов был одинаков, статистически достоверно отличаясь от такового во 2—3-м пассажах (рис. 2—4). Детально эти результаты изложены в работе [100].

Анализ результатов изучения многих других сформированных длительно пассируемых клеточных штаммов, полученных от разных видов растений, показал, что им также свойственна циркадная ритмика митотической активности, а также синтеза ДНК (см., например, [103]). Ритмика числа митозов в них не зависела или мало зависела от сезона и условий выращивания (режима освещения, состава питательной среды, в частности, наличия и типа ростовых веществ, глубинного или поверхностного выращивания и др.) и во многих случаях была сходной для культур разного происхождения, например, у нормальных и галловых клеток [104]. В то же время характер кривых суточной митотической активности (количество, время и высота подъемов) мог быть разным у разных видов растений, у разных штаммов и в разное время у одних и тех же культур [99, 102—113].

Изучение ритмики числа митозов в течение пассажа в сформированных штаммах гаглопаппуса выявило, что суточный ритм митотической активности и ее динамика в течение пассажа были сходными в суспензионной и каллусной культурах. Некоторые из этих результатов, приведенных в работе [114], представлены на рис. 5. Как видно из этого рисунка, суточная кривая митозов в начале фазы митотической активности характеризовалась двумя подъемами в 8—10 ч и в 20—24 ч, т. е. с 12-часовыми интервалами. В периоде логарифмического роста (на 5—8 сут) наблюдали тенденцию к слиянию этих подъемов в один подъем митотической активности в ночное время. При выходе на плато — переход в стационарную фазу — пики разделяются, потом один из них, как правило

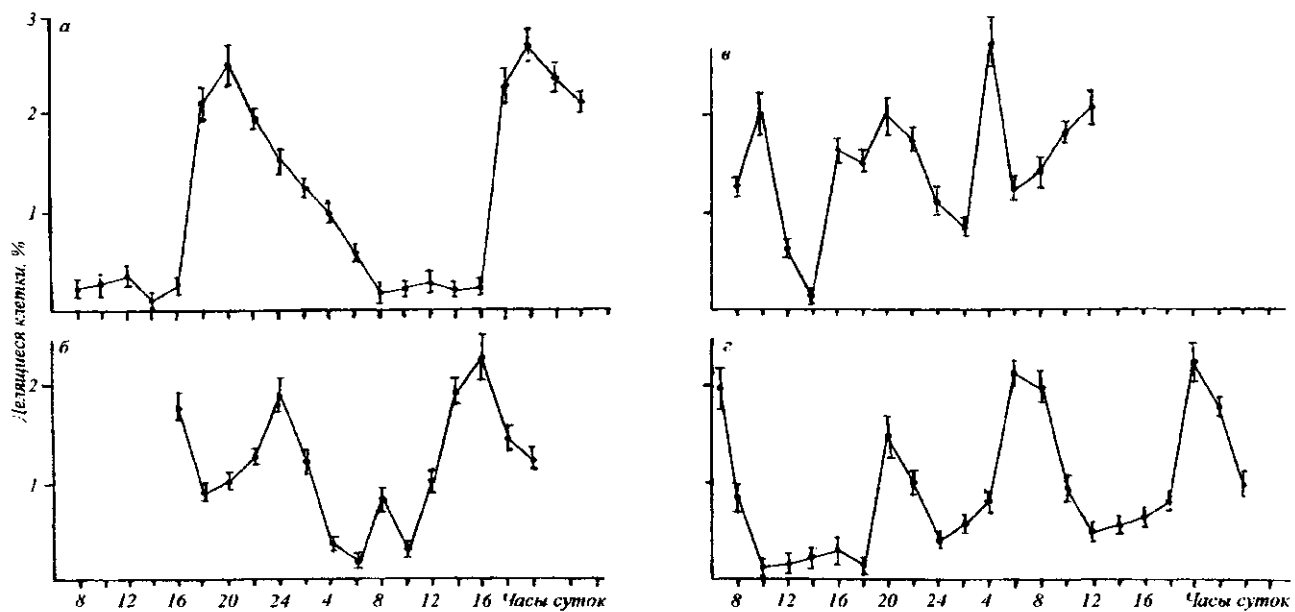


Рис. 2. Динамика суточной митотической активности в процессе формирования одного из клеточных штаммов гаплопеплуса *H. gracilis* (штамм Г4ГР): а — первичный каллус; б, в, г — 2, 3, 8-й пассажи соответственно

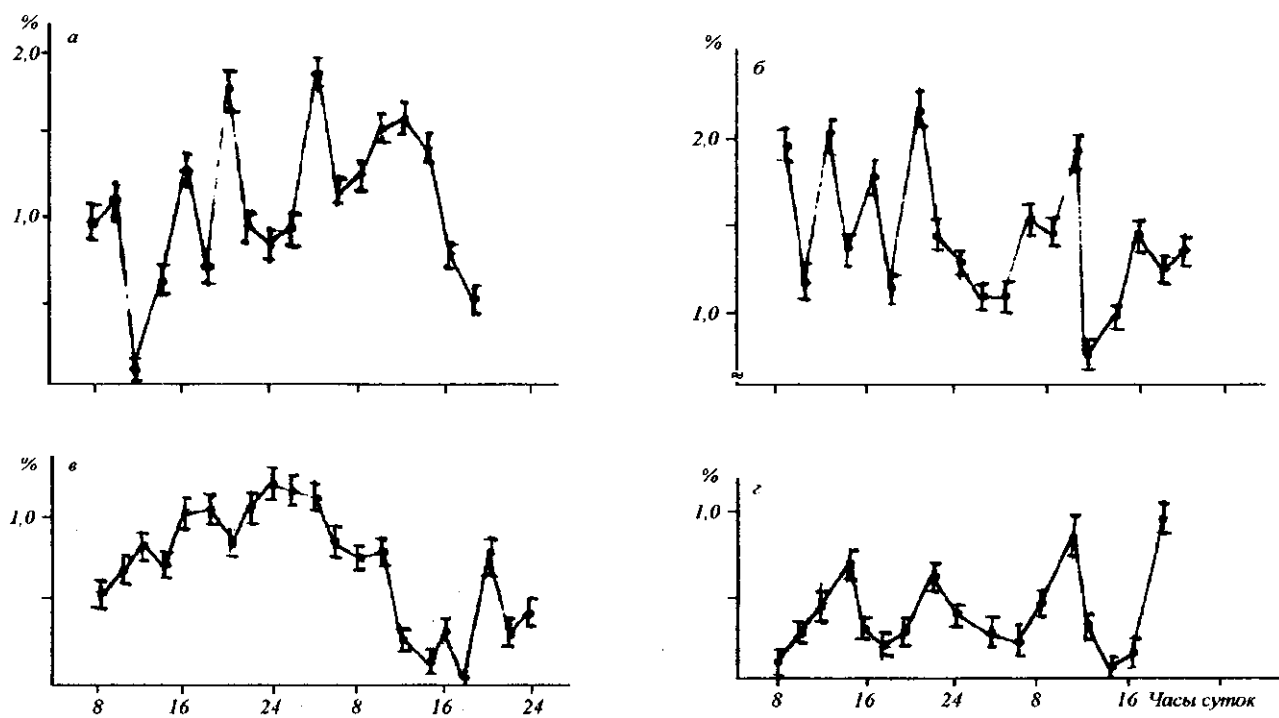


Рис. 3. Динамика суточной митотической активности в 3-м пассаже разных штаммов гаплопеплуса в суспензионной культуре: а-г — штаммы Г4ЛВ; Г6ЛВ; Г4Г-3; Г4СС соответственно (по оси ординат — делющиеся клетки)

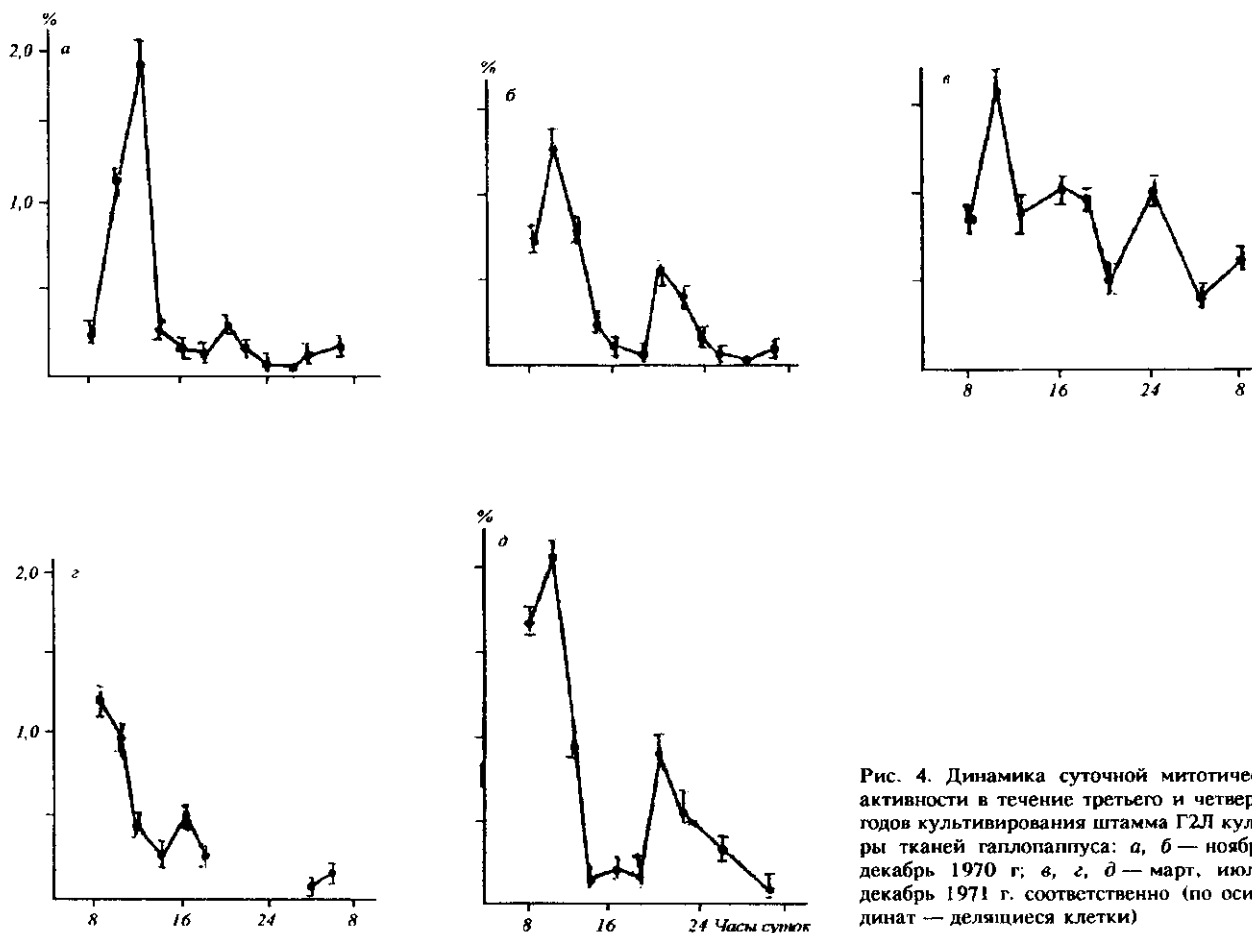


Рис. 4. Динамика суточной митотической активности в течение третьего и четвертого годов культивирования штамма Г2Л культуры тканей гаплогамуса: а, б — ноябрь и декабрь 1970 г; в, г, д — март, июль и декабрь 1971 г. соответственно (по оси ординат — делящиеся клетки)

вечерний, исчезает, а с полным переходом в стационарную фазу исчезает и второй.

Подобное исследование было проведено и на клеточной линии А раувольфии змеиной, выращиваемой к моменту исследования более 15 лет [115]. В этой линии в течение пассажа наблюдали пять достоверных подъемов митотической активности. Косвенные данные (по числу клеток и выходу биомассы) свидетельствуют о том, что за это же время (35—40 сут роста) в культуре происходило около шести клеточных репродукций, из чего следует, что линии А свойственна сравнительно высокая синхронность митотической активности в течение пассажа. В максимуме митотической активности этой линии (на 4—6-е сут роста) было

исследовано суточную ритмику числа митозов. Установлено, что ей также оказался свойственным циркадный ритм. Максимумы подъемов числа митозов наблюдали во второй половине дня — в 14—18 ч. При этом во время максимального «пассажного» подъема митотической активности (на 5-е сут) наблюдали один большой подъем митотической активности, захватывающий все время суток с максимумом в дневное время. Эта картина напоминает описанную выше для сформированных штаммов каллусных тканей и суспензионных культур гаплогамуса, но со сдвигом по времени суток на 12 ч.

Следовательно, сформированным штаммам в отличие от клеточных популяций первых пассажей *in vitro* присуща стабильная ритмика митотическо-

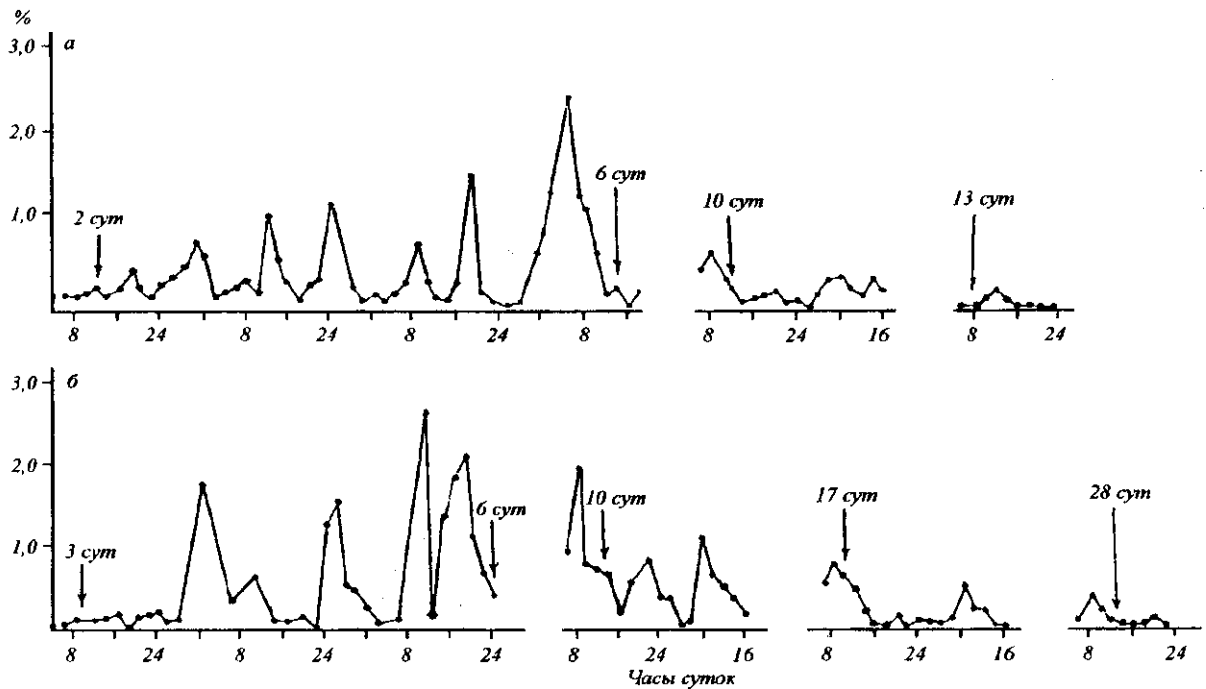


Рис. 5. Динамика суточной митотической активности в течение 11-го и 13-го пассажей в суспензионной (а) и тканевой (б) культурах гаглопаллуса (штамм Г4ТР) (по оси ординат — делящиеся клетки)

го режима и ростовых характеристик. В них отмечали два типа ритмов — «пассажный» и суточный. От пассажа к пассажиру и от суток к суткам в течение пассажа наблюдали ритмичность изученных процессов. При этом суточные ритмы подчинены «пассажным»: с возрастом субкультуры изменялся характер кривой суточной митотической активности (см. рис. 5). «Пассажный» ритм обусловлен изменениями окружающей среды, связанными с субкультивированием. Наличие суточного ритма делений при выращивании в темноте и постоянной температуре свидетельствует о том, что сформированные штаммы культуры тканей и клеток характеризуются, как и интактные организмы, внутриклеточными гомеостатическими механизмами регуляции суточной периодичности митозов, что подтверждается результатами и других исследований (см. [99, 101—113]).

Для того чтобы приблизиться к пониманию механизмов нарушения суточных ритмов в первых пассажах и установления ритмики, специфической для сформированных пассируемых клеточных штаммов одновременно с изучением ритмики числа митозов, была определена длительность клеточного

цикла и некоторые его параметры в процессе формирования одного из штаммов гаглопаллуса, штамма Г4ТР. Продолжительность клеточного цикла и митоза изучали в начале логарифмической фазы роста в суспензионной культуре при помощи колхициновой методики. Продолжительность митоза и интерфазы для всей клеточной популяции, а также длительность клеточного цикла для клеток разных уровней пloidности определяли, согласно [116]. Учитывая непостоянство митотического индекса в контрольном материале (выращиваемом без колхицина) вследствие циркадного ритма числа митозов, время митозов определяли по формуле:

$$t_m = \frac{MI \cdot A}{MI_{kx}}$$

где t_m — продолжительность митоза; A — время действия колхицина; MI — среднелогарифмическое значение митотического индекса в контроле между нулевой точкой и точкой после A времени; MI_{kx} — число митозов после действия колхицина в течение времени A .

Установлено, что в 3-м пассаже суспензионная культура была весьма гетерогенной по длительно-

сти клеточного цикла. Среди диплоидных клеток, составляющих около 80 % популяции, были клетки с длительностью цикла, равной 6, 12, 18 и 22—24 ч, о чем свидетельствуют подъемы в это время частоты тетраплоидных клеток в среде с колхицином (рис. 6, в). Среди триплоидных клеток, составляющих около 8 % популяции, были клетки с длительностью цикла 6 и 22—26 ч, что установлено по появлению гексаплоидных клеток (рис. 6, д). У тетраплоидных клеток, составляющих около 12 %, длина цикла равнялась 6, 12—14, 18 и 22—24 ч (рис. 6, е). В 11-м пассаже изменчивость по этому признаку уменьшилась за счет исчезновения клеток преимущественно с коротким циклом. Длительность цикла у диплоидных клеток составила 14 и 22—24 ч, у тетраплоидных — 12 и 34—36 ч (рис. 6, г, ж).

Определение средней длительности митоза и интерфазы дало сведения, на первый взгляд, противоречащие вышеизложенным. Оказалось, что длительность митоза и длительность интерфазы в 11-м пассаже были в 2 раза короче, чем в 3-м пассаже (таблица), несмотря на то, что в том же 11-м пассаже исчезли клетки именно с самым коротким клеточным циклом (рис. 6, г, ж). Сопоставление этих данных с таковыми, полученными при изучении особенностей роста и приведенными выше, позволило объяснить указанное противоречие следующим образом.

В 3-м пассаже условия существования клеток далеко не оптимальны, что проявляется в снижении темпа роста и/или в увеличении размаха изменчивости по этому признаку, в появлении отдельных очагов интенсивного роста на фоне медленно растущей или вовсе не растущей каллусной ткани, в других изменениях ростовых характеристик. Эти процессы могут быть объяснены перестройкой физиологических процессов и структуры клеточных популяций, их адаптацией к изменившимся по сравнению с интактным растением и первичным каллусом условиям существования. Часть клеток при этом делится медленно, а то и вовсе устраняется от размножения. При определении параметров клеточного цикла это нашло свое отражение в широком размахе изменчивости по его длительности у клеток одного и того же уровня пloidности и в том, что в среднем продолжительность интерфазы и митоза была достаточно длительной. (Факты о том, что размах изменчивости по длине митотического цикла возрастает на первых стадиях культивирования еще не сформированных клеточных штаммов, были получены и на примере гороха [117].) В сформированном штамме, когда в основном завершились процессы адаптации к условиям изолированного роста, что и отмечалось в 11-м пассаже, темп роста был более чем в 3 раза выше по сравнению с 3-м пассажем, средняя длительность митоза сократилась вдвое. При этом

Длительность митоза (t_m) и интерфазы (T) в суспензионной культуре гаплопаннуса *H. gracilis* (штамм Г4ТР)

Время после обработки, ч	Обработка колхицином			Контроль			t_m	T
	Число интерфаз	Число митозов	MI, %	Число интерфаз	Число митозов	MI, %		
<i>3-й пассаж</i>								
0	7891	109	1,36±0,13	7891	109	1,36±0,13	—	—
2	6909	91	1,30±0,14	7852	148	1,85±0,15	2,47	187,5
4	7855	145	1,81±0,15	6967	33	0,47±0,08	2,71	146,8
6	3893	107	2,68±0,26	3998	2	0,05±0,04	—	—
<i>11-й пассаж</i>								
0	5940	60	1,00±0,13	5940	60	1,00±0,13	—	—
2	6901	99	1,41±0,14	6964	36	0,51±0,09	1,07	74,6
4	6886	114	1,63±0,15	4989	11	0,22±0,07	1,42	85,8
6	5890	110	1,83±0,17	4997	3	0,06±0,03	1,47	78,7

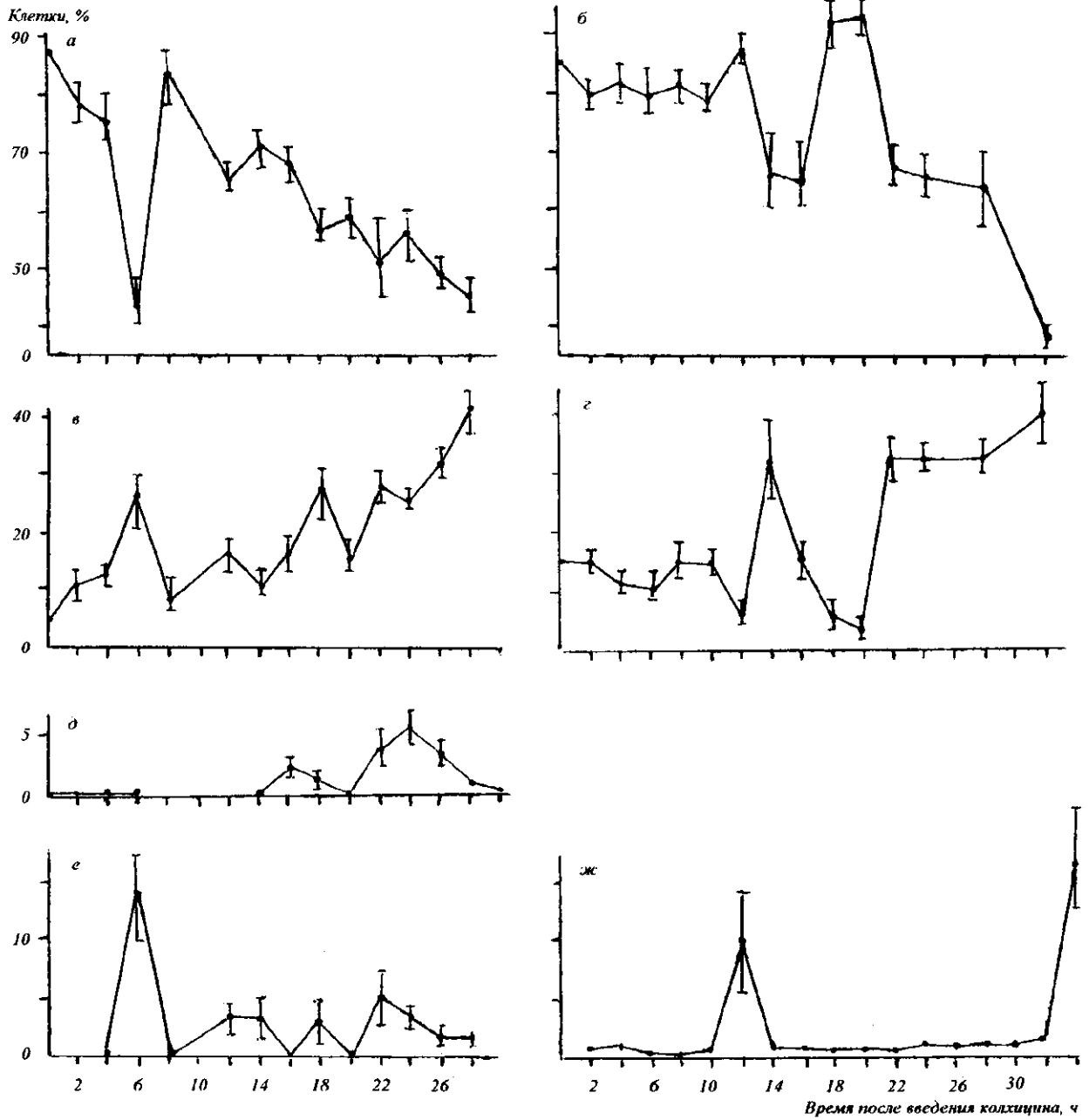


Рис. 6. Динамика частоты клеток с диплоидным (*a, б*), тетраплоидным (*в, г*), гексаплоидным (*д*) и октоплоидным (*е, ж*) числами хромосом при выращивании штамма гаплопапуса Г4ТР в 3-м (*a, в, д, е*) и 11-м (*б, г, ж*) пассажах в жидкой среде, содержащей 0,1 % колхицина

исчезли, по-видимому, не только быстро делящиеся клетки, но и делящиеся медленно, что привело в конечном счете к сокращению среднего значения интерфазы. В результате клеточные популяции сформированных (адаптированных к пассируемому росту) штаммов характеризуются гетерогенностью как по длине митотического цикла, так и по длине отдельных его фаз [111, 118, 119] подобно меристемам изолированных корней и интактных растений [88—90, 120, 121], но размах этой изменчивости значительно ниже, чем в популяциях первых пассажей *in vitro*.

Известно, что длительность клеточного цикла является, как правило, равной или кратной длительности времени между подъемом числа митозов [122]. Сравнение данных, приведенных на рис. 2 и рис. 6, показало такую зависимость и в описанных выше экспериментах. Это позволило предположить, что одним из механизмов аритмии числа митозов в процессе формирования штаммов является выход клеток из-под влияния первичных синхронизаторов в результате нарушения коррелятивных связей организма: отсутствие жесткой регуляции времени вступления клеток в митоз должно находить свое выражение в появлении в популяции клеток с различной длиной клеточного цикла, т. е. в увеличении гетерогенности клеточной популяции по признаку «длительность клеточного цикла», что приводит к аритмии митотической активности. В дальнейшем формируется механизм регуляции, специфический для популяции культивируемых клеток, о чем свидетельствует наличие четкой суточной ритмики с ее особенностями в течение пассажа в сформированных штаммах.

Следовательно, в процессе формирования пассируемых штаммов культивируемых клеток растений наблюдается период, названный нами периодом становления штамма [12, 66], в котором наряду с изменениями, выражающимися, чаще всего, в снижении прироста биомассы, резком увеличении размаха изменчивости по этому признаку, отмечается также изменение ритма митотической активности и длительности клеточного цикла. Нарушение ритмики вплоть до аритмии, дальнейшее ее изменение, формирование циркадного ритма, как правило, отличного от такового, свойственного первичному каллусу, изменение длительности клеточного цикла — эти процессы оказались характерными для формирующихся штаммов культивируемых клеток растений. Описанные явления свидетельствуют о нарушении гомеостаза во время первых пассажей изолированных клеток и тканей, поскольку известно, что в основе гомеостатических механизмов лежит ритмика физиологических про-

цессов, а нарушение ритма может быть свидетельством нарушения физиологического гомеостаза [85, 86, 91—94, 123—126]. Эти нарушения обусловлены резким изменением условий существования клеток при переносе их в изолированную культуру. В частности, как отмечалось выше, происходит нарушение коррелятивных связей организма, изменение морфологических, функциональных и некоторых других особенностей клеток, изменение условий и характера их роста и питания. В это время наряду с другими процессами, определяющими и сопровождающими адаптацию клеточных популяций к пассируемому росту *in vitro*, происходит, по-видимому, переход от общих для всего организма или для некоторых его органов и тканей механизмов регуляции суточной периодичности процессов к внутриклеточным, формированию гомеостатического механизма регуляции, специфического для популяций культивируемых клеток. Другими словами, формирование новой клеточной системы — пассируемой культуры приводит к установлению и нового равновесия между клетками и окружающей средой, что и определяет физиологические особенности сформированного штамма [127, 128].

Заключение. Получение пассируемых клеточных культур высших растений — процесс сложный и многоступенчатый. Он предполагает адаптацию клеток к резко измененным по сравнению с интактным организмом условиям существования, формирование новой биологической системы, в которой клетки, выполняющие в организме лишь некоторые его функции, выполняют функции отдельных организмов, способных к автономному развитию. Это требует кардинальной перестройки как функций и метаболизма клеток, так и структуры клеточной популяции.

На первых этапах культивирования в каллусной ткани, особенно в первичном каллусе, очевидно, сохраняются условия, сопоставимые с таковыми в организме, подвергнутом раневому воздействию (травме). Эти условия находятся в пределах нормы реакции генотипа. В процессе пассирования эти условия исчезают и клетки подвергаются еще более существенному стрессовому воздействию, чем при индукции каллусообразования, поскольку условия автономного роста находятся, по-видимому, за пределами нормы реакции их генотипа. В результате усиления стрессовых воздействий возрастает изменчивость клеток, размах клеточных популяций по различным признакам существенно расширяется и уровень их гетерогенности (полиморфизма) повышается. Адаптация клеточной популяции происходит на основе отбора в такой популяции клеток,

приспособленных к измененным (изменяющимся) условиям. Поскольку клетки, которым благоприятствуют эти условия, вначале составляют, вероятно, незначительную часть популяции, внешне процессы адаптации выражаются в снижении темпа роста, резком увеличении размаха изменчивости культуры по этому признаку, в появлении отдельных очагов более интенсивного роста и различных морфотипов клеточных культур. В ряде случаев таких клеток в популяции нет или они в силу каких-то обстоятельств не способны к интенсивному размножению в данных конкретных условиях. Это выражается в неспособности данной культуры к пассивному росту. Адаптированные сформировавшиеся штаммы характеризуются при дальнейшем пассировании, как правило, стабильностью морфологических признаков, в том числе стабильным ростом.

При изучении динамики клеточных популяций описанные явления находят свое выражение в том, что в течение первых пассажей увеличивается размах изменчивости по длительности клеточного цикла у клеток одного и того же уровня плоидности, возрастает средняя продолжительность клеточного цикла, нарушается ритм клеточных делений. В дальнейшем устанавливается четкий ритм митозов (но характер ритмики может не совпадать с таковым исходного растения и первичного каллуса), сокращается размах и среднее значение длительности клеточного цикла в целом и митоза в частности. Эти процессы обусловлены, вероятно, нарушением коррелятивных связей организма, изменением морфологических, функциональных и некоторых других особенностей клеток, изменением условий и характера их роста, а также, что особенно важно, питания и, как результат всего этого, — выходом клеток из-под влияния первичных синхронизаторов и их дальнейшим приспособлением к изменившимся условиям существования. Подтверждением высказанного предположения могут быть также данные о том, что на всех уровнях организации живой материи (клетка, организм, популяция и т. д.) возникают новые закономерности биологических ритмов [127], а циркадные ритмы, как и клеточные циклы, являются эндогенными самоподдерживающимися колебаниями [126—131].

Таким образом, изменения в клеточных популяциях в процессе пассирования приводят к установлению нового равновесия между культивируемыми клетками и окружающей средой, что и определяет физиологические особенности сформированного штамма. При этом в процессе получения пассируемых культур наблюдается кри-

тический период, названный нами периодом становления штамма. В это время (как правило, это 2—8-й, иногда до 12-го пассажа) происходит перестройка физиологических процессов и структуры клеточных популяций, их адаптация к изменившимся по сравнению с интактным растением и первичным каллусом условиям существования, наблюдается переход от общих для всего организма механизмов регуляции суточной периодичности процессов к внутриклеточным, формируется гомеостатический механизм регуляции, специфический для популяции культивируемых клеток, происходит позитивная селекция клеток, приспособленных к условиям существования *in vitro*, и элиминация неприспособленных. Адаптированная в результате этих процессов к пассируемому росту *in vitro* клеточная популяция представляет собой сообщество эволюционно более низкого уровня интегрированности. Она, по мнению автора, может служить моделью «регрессивной эволюции» не только клеток, как это отмечено в предыдущем сообщении [132], но и клеточных сообществ разного уровня интегрированности.

Кардинальное изменение клеточных функций в процессе введения их в культуру *in vitro*, формирование новых взаимоотношений между клетками и по сути создание новой биологической системы обусловлены не только физиологическими изменениями. Процессы адаптации клеток к новым условиям существования основаны как на изменении функционирования растительного генома, так и в значительной мере на его структурных изменениях. Данные об особенностях и динамике геномных изменений, об их роли в процессе адаптации клеток к условиям изолированного роста будут рассмотрены в следующем сообщении.

В. А. Кунах

Геномна мінливість соматичних клітин рослин. 5. Мінливість росту і мітотичного режиму в процесі адаптації до умов вирощування *in vitro*

Резюме

Зроблено огляд даних про динаміку клітинних популяцій вищих рослин при введенні їх у культуру *in vitro*. В ході одержання пасованих культур виявлено критичний період — період становлення штама. В даному періоді (це, як правило, 2—8-й пасажи) спостерігаються процеси інтенсивної адаптації клітинних популяцій до автономного росту поза організмом. У цей час відбувається подальша і ще більш істотна порівняно з первинним калюсом перебудова фізіологічних процесів і структури клітинних популяцій, спостерігається перехід від спільних для всього організму механізмів регуляції добової періодичності процесів до внутрішньоклітинних, формується гомеостатичний механізм регуляції, специфічний для популяції культивованих клітин, відбувається позитивна селекція клітин, пристосованих до умов існування *in vitro*, та елімінація

неприспособлені. Ці процеси супроводжуються значними змінами темпів росту та інших морфологічних особливостей клітинних штабів, тривалості клітинного циклу і ритму мітотичної активності, зростанням поліморфізму (гетерогенності) клітинних популяцій по багатьох ознаках. Сформовані, адаптовані клітинні штаби характеризуються, як правило, стабільністю ознак, що виникли в період становлення штаба. Розвивається положення про те, що пасована клітинна культура є унікальною біологічною системою — клоновою популяцією, роль організмів у якій виконують клітини, з самого початку запрограмовані на виконання певних структурних і функціональних завдань як частина багатоклітинного організму. Вона може служити, окрім відомих областей застосування, також моделлю для вивчення особливостей мінливості і адаптації, а в кінцевому рахунку — еволюції клітинних угруповань різного рівня інтегрованості, особливо при переході з високого рівня на нижчий, тобто в умовах так званої «регресивної еволюції».

A. Kunakh

Genome variability in plant somatic cells. 5. Growth and mitotic regime variations during adaptation to maintenance *in vitro*

Summary

Data on the dynamics of plant cell populations in the process of their adaptation to the growth conditions *in vitro* have been reviewed. In the course of the passaged culture obtaining a period of strain habituation being critical was discovered. Within this period (commonly the 2—8th passages) the intensive processes of cell population adaptation to autonomous growth outside an organism are evident. At this time there occur further rearrangement of physiological processes and cell population structure, even more essential versus the primary callus. The transition from the diurnal periodicity control mechanisms universal for an organism as a whole to the intracellular ones is observed. The homeostatic control mechanism specific for the population of cultured cells is established. The positive selection of cells, adapted to the *in vitro* existence and elimination of unadapted ones are observed. These events are concurrent with the considerable changes in the growth rate and other morphological peculiarities of the cell strain, duration of the cell cycle and mitotic activity rhythm, the rise in polymorphism (heterogeneity) of the cell population in terms of many characters. Established, adapted cell strains tend to be characterized by the stability of traits originating in the period of strain habituation. The statement is that passaged cell culture presents the unique biological system — the clone population, in which the role of organisms' part is played by the cells originally programmed as a constituent of a multicellular organism to accomplish the certain structural and functional tasks. Apart from being useful in the known fields of application can also serve as a model to study the details of variability and adaptation as well as the evolution of cell associations of different integrity level especially upon the transition from the higher level to the lower one i. e. under the conditions of so called «regressive evolution».

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кунах В. А., Чеченева Т. Н., Моргун В. В. Получение каллусных тканей от разных по генотипу растений кукурузы // Физиология растений.—1980.—27, № 2.—С. 399—403.
2. Wenzler H., Meins F. Mapping regions of the maize leaf capable of proliferation in culture // Somatic Embryo Genesis Carrots: Proc. Workshop (San Miniato, May 28—31, 1985).—Roma, 1985.—P. 181—185.
3. Wenzler H., Meins F. Mapping regions of the maize leaf capable of proliferation in culture // Protoplasma.—1986.—131, N 1.—P. 103—105.
4. Tomes D. T., Smith O. S. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm // Theor. and Appl. Genet.—1985.—70, N 5.—P. 505—509.
5. Koblitz H., Saalbach C. Kalluskulturen aus Apikalmeristemen von Cerste (*Hordeum vulgare*) // Biochem. Physiol. Pflanzen.—1976.—N 170.—S. 97—102.
6. Кармель Н. А., Манешина Т. В. Каллусообразование у разных по генотипу растений ячменя *Hordeum vulgare* L. // Цитология и генетика.—1977.—11, № 6.—С. 486—490.
7. Rybczynski J. J. The effect of the 2,4-D acid on callus formation and rhizogenesis of the immature embryo scutellum of di- and tetraploid rye (*Secale cereale* L.) // Genet. pol.—1978.—19, N 4.—P. 467—485.
8. Rybczynski J. J., Zdunczyk W. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in the genus *Secale*. 1. Somatic embryogenesis and organogenesis from cultured immature embryos of five wild species of rye // Theor. and Appl. Genet.—1986.—73, N 2.—P. 271—276.
9. Takiko Shimada. Plant regeneration from the callus induced from wheat embryo // Jap. J. Genet.—1978.—53, N 5.—P. 371—374.
10. Супонина С. Л. Влияние состава питательной среды на образование каллуса из различных тканей озимой пшеницы // Науч. тр. НИИ с.-х. Центр.—Черноземн. полосы.—1980.—17, № 3.—С. 8—11.
11. Reinert J., Kuster H. J. Diploide, chlorophyllhaltige Gewebekulturen aus Blättern von *Crepis capillaris* (L.) Wallr // Z. Pflanzenphysiol.—1966.—54, N 3.—S. 213—222.
12. Сидоренко П. Г., Кунах В. А. Получение культуры изолированных тканей *Harplorappus gracilis* и *Crepis capillaris* и их цитогенетическая характеристика // Цитология и генетика.—1972.—6, № 6.—С. 483—486.
13. Марьяхина И. Я., Бутенко П. Г. Культура изолированных тканей капусты, генетическая характеристика и получение растений-регенерантов // С.-х. биология.—1974.—9, № 2.—С. 216—227.
14. Внучкова В. А. Изучение условий выращивания каллуса томата в пересадочной культуре и его цитологическая характеристика // Культура клеток растений.—Киев: Наук. думка, 1978.—С. 116—119.
15. Nishiyama I., Taira T. The effects of kinetin and indole acetic acid on callus growth and organ formation in two species of *Nicotiana* // Japan J. Genet.—1966.—41, N 5.—P. 357—365.
16. Трофимец Л. Н., Волкова Т. В., Миренкова Н. Н. Метод культуры тканей в картофелеводстве // Тканевые и клеточные культуры в селекции растений.—М.: Колос, 1979.—С. 123—128.
17. Кунах В. А., Войтюк Л. И., Алхимова Е. Г., Алпатова Л. К. Получение каллусных тканей и индукция органогенеза у *Pisum sativum* L. // Физиология растений.—1984.—31, № 3.—С. 542—548.
18. Вагрова А. М., Ежова Т. А., Хартина Г. А., Гостимский С. А. Получение длительно культивируемых морфогенных каллусов и анализ соматоклональной изменчивости у регенерантов зерновых и овощных сортов гороха // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология.—1991.—№ 1.—С. 28—33.
19. Bajaj Y. P. S., Gill M. S. *In vitro* induction of genetic variability in cotton (*Gossypium* spp.) // Theor. and Appl. Genet.—1985.—70, N 4.—P. 363—368.
20. Лев С. В., Быкова Е. В., Мусатов Д. А. Генотипические различия в реакции каллусных тканей диплоидных и

- тетраплоидных видов хлопчатника на регуляторы роста // Докл. АН УзССР.—1987.—№ 5.—С. 51—53.
21. Бутенко Р. Г., Атанасов А. И. К вопросу о получении культуры ткани сахарной свеклы // Докл. АН СССР.—1971.—197, № 2.—С. 477—479.
 22. Abe T., Sasahara T. Genetical control of callus formation in rice // Plant Tissue Cult.: Proc. 5 Int. Congr. Plant Tissue and Cell Cult. (Tokyo and Lake Yamanaka, July 11—16, 1982).—Tokyo, 1982.—P. 419—420.
 23. Abe T., Futsuhara Y. Genotypic variability for callus formation and plant regeneration in rice *Oryza sativa* L. // Theor. and Appl. Genet.—1986.—72, N 1.—P. 3—10.
 24. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений.—М.: Наука, 1964.—272 с.
 25. 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.
 26. Атанасов А. Биотехнология в растениеводстве.—Новосибирск: Изд-во Ин-та цитологии и генетики, 1993.—241 с.
 27. Jacobsen H. J., Ingensiep H. W., Herit M., Kaul M. L. H. Tissue culture studies in *Pisum sativum* // Plant Cell Cult.: Results and Perspectives.—Amsterdam, 1980.—P. 319—324.
 28. Rapela M. A. Organogenesis and somatic embryogenesis in tissue culture of Argentine maize (*Zea mays* L.) // J. Plant Physiol.—1985.—121, N 2.—P. 119—122.
 29. Goldstein C. S., Kronstad W. E. Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley, *Hordeum vulgare* // Theor. and Appl. Genet.—1986.—71, N 4.—P. 631—636.
 30. Termpleton-Somers K. M., Collins W. W. Heritability of regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) // Theor. and Appl. Genet.—1986.—71, N 6.—P. 835—841.
 31. Ancora G., Ramulu R. S., Devreux M. *In vitro* culture of anthers and stem internodes of *Lycopersicon peruvianum*. Nuclear DNA determination in calli and cytological analysis of regenerated plants // Zeitschr. Pflanzenphysiol.—1977.—82, N 2.—P. 377—388.
 32. Bouzid S. Polymorphisme persistant des cultures de tissus provenant de divers fragments de plusieurs especes de Citrus // C. r. Acad. sci.—1977.—D284, N 21.—P. 2119—2121.
 33. Pandey K. N., Kahlon P. S. Evaluation of genotypic responses of soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars *in vitro* // Genetics.—1980.—94, N 4, pt 2.—P. 79—80.
 34. Nakamura C., Keller W. A. Callus proliferation and plant regeneration from immature embryos of hexaploid triticale // Z. Pflanzenzucht.—1982.—88, N 2.—P. 137—160.
 35. Novak F., Konecna D. Somatic embryogenesis in callus and cell suspension cultures of alfalfa (*Medicago sativa* L.) // Z. Pflanzenphysiol.—1982.—105, N 3.—P. 279—284.
 36. Ежова Т. А., Багрова А. М., Гостимский С. В. Побегообразование в каллусах из верхушек стеблей, эпикотилей, междоузлий и листьев различных генотипов гороха // Физиология растений.—1985.—32, № 3.—С. 513—520.
 37. Radojevic L. Tissue culture of maize *Zea mays* «Cudu» I. Somatic embryogenesis in the callus tissue // J. Plant Physiol.—1985.—119, N 5.—P. 435—441.
 38. Azam M., Biswas A. K. Callus culturing, its maintenance and cytological variations in *Trigonella foenum-graecum* L. // Curr. Sci. (India).—1989.—58, N 15.—P. 844—847.
 39. Lazur M. D., Schaeffer G. W., Baenziger P. S. Cultivar and cultivar × environment effects on the development of callus and polyhaploid plants from another cultures of wheat // Theor. and Appl. Genet.—1984.—67, N 2—3.—P. 273—277.
 40. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений.—Киев: Наук. думка, 1980.—488 с.
 41. Сидоров В. А., Пивень Н. М., Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Соматическая гибридизация пасленовых.—Киев: Наук. думка, 1985.—132 с.
 42. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция.—Киев: Наук. думка, 1990.—280 с.
 43. Roper W. Callus formation from protoplasts derived from cell suspension cultures of *Vicia faba* L. // Z. Pflanzenphysiol.—1981.—101, N 1.—P. 75—78.
 44. Борматау У. Я., Севричезуская А. М. Генетически адозненні калусных культур ібридних ліній цукрових бурякоу на патрєбнасті у елементах жыулення // Весці АН БССР, сер. бяол.—1989.—№ 5.—С. 18—22.
 45. Dhir S. K., Dhir S., Widholm J. M. Regeneration of fertile plants from protoplasts of soybean (*Glycine max* L. Merr.) // Plant Cell Repts.—1992.—11, N 5—6.—P. 285—289.
 46. Мардамыши А. Г., Валиева Р. Д., Иванцов А. И., Ильгулова Д. Ф. Каллусная ткань солодки голой — суперпродукцент флавоноидов // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.—1994.—№ 4.—С. 21.
 47. Yamada Y. Tissue culture studies on cereals // Appl. and Fundam. Aspects Plant Cell, Tissue, and Organ Cult.—Berlin, 1977.—P. 144—159.
 48. Malepszy S., Gaj M. Some aspects of tissue culture of barley // Barley Genet. Newslett.—1979.—9.—P. 60—62.
 49. Bajaj Y. P. S., Saini S. S., Bidani M. Production of triploid plants from the immature and mature endosperm cultures of rice // Theor. and Appl. Genet.—1980.—58, N 1.—P. 17.
 50. Kraus J. E., Handro W., Dietrich S. M. C. Growth, peroxidase activity, and protein content in stem pith and callus tissues from haploid and diploid *Nicotiana tabacum* plants // Physiol. Plant.—1981.—51, N 2.—P. 157—162.
 51. Martins J. S., Sondahl M. R. Early stages of somatic embryo differentiation from callus cells of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in liquid medium // J. Plant Physiol.—1984.—117, N 2.—P. 97—103.
 52. Keys G. J., Collins G. B., Taylor N. L. Genetic variation in tissue cultures of red clover // Theor. and Appl. Genet.—1980.—58, N 6.—P. 265—271.
 53. Keys G. J., Deaton W. R., Collins G. B., Legg P. D. Hybrid vigor in callus tissue cultures and seedlings of *Nicotiana tabacum* L. // J. Hered.—1981.—72, N 3.—P. 172—174.
 54. Maeda E. Multiplication of rice cells freely suspended *in vitro* // Proc. Crop Sci. Soc. Japan.—1969.—38, N 3.—P. 535—546.
 55. Kerbauy G. B., Hell K. G., Handro W. Comparative growth of pith tissue from haploid and diploid plants of *Nicotiana tabacum* // Z. Pflanzenphysiol.—1976.—79, N 5.—P. 455—458.
 56. Mok M. C., Mok D. W. S., Turner J. E. Reversed activities of cytokinin bases and ribonucleosides in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. // J. Plant Physiol.—1985.—121, N 3.—P. 273—280.
 57. Mok M. C., Mok D. W. S., Armstrong D. J., Rabakoarihanta A., Kim Sang-Gu. Cytokinin autonomy in tissue cultures of phaseolus: a genotype-specific and heritable trait // Genetics (USA).—1980.—94, N 3.—P. 675—686.
 58. Meins F., Lutz J. Tissue-specific variation in the cytokinin habituation of cultured tobacco cells // Differentiation.—1979.—15, N 1.—P. 1—6.
 59. Davidonis G. H., Hamilton R. H., Mumma R. O. Comparative metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in cotyledon and leaf callus from two varieties of soybean // Plant Physiol.—1980.—65, N 1.—P. 94—97.

60. *Elmsheuser H. A., Lein C., Neumann K. H.* Untersuchungen über Beziehungen zwischen Hormongehalt und Wachstumsleistung von Explantaten verschiedener Brassica-Arten in Gewebekultur // *Z. Pflanzenphysiol.*—1978.—88, N 1.—S. 25—31.
61. *Jackson J. A., Lyndon R. F. J.* Cytokinin habituation in juvenile and flowering tobacco // *J. Plant Physiol.*—1988.—138, N 5.—P. 575—579.
62. *Yamada T., Shoji T., Sinoto J.* Cytological studies on cultured cells. II. Formation of calli and general behavior of their cells in the tissue culture of *Tradescantia paludosa* // *Bot. Magaz. (Tokyo)*.—1964.—77, N 918.—P. 436—447.
63. *Каллах Х. И., Ярвекюльг Л. Я.* О морфологической и цитологической разнокачественности каллуса гороха // *Цитология и генетика.*—1968.—2, № 5.—P. 408—414.
64. *Каллах Х. И., Ярвекюльг Л. Я.* Цитогенетическая характеристика некоторых штаммов каллуса гороха // *Генетика зерновых и бобовых культур.*—Орел, 1972.—С. 7—16.
65. *Jullien M.* La culture *in vitro* de cellules du tissu foliaire d'*Asparagus officinalis* L.: obtention de souches a embryogenese permanente et regeneration de plantes entieres // *Compt Rend. Acad. Sci.*—1974.—279D, N 9.—P. 747—750.
66. *Кунах В. А.* Цитогенетическая и морфологическая изменчивость штаммов культуры тканей гаплопептуса в процессе их формирования // *Культура клеток растений.*—Киев: Наук. думка, 1978.—С. 108—113.
67. *Radovic L. J., Landra P., Meskovic M.* Isolement de trois souches tissulaires a partir d'embryons immatures d'*Acer negundo* L // *Z. Pflanzenphysiol.*—1980.—99, N 3.—P. 191—198.
68. *Chandler S. F., Vasil I. K.* Optimization of plant regeneration from long term embryogenic callus cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. (*Napier grass*) // *J. Plant Physiol.*—1984.—117, N 2.—P. 147—156.
69. *Seguin-Swartz G., Kott L., Kasha K. J.* Development of haploid cell lines from immature barley, *Hordeum vulgare*, embryos // *Plant Cell Repts.*—1984.—3, N 3.—P. 95—97.
70. *Tyagi A. K., Bharal S., Rashid A., Maheshwari N.* Plant regeneration from tissue cultures initiated from immature inflorescences of a grass *Echinochloa colonum* (L.) Link. // *Plant Cell Repts.*—1985.—4, N 3.—P. 115—117.
71. *Кучеренко Л. А.* Морфологическая разнокачественность каллусных тканей риса и ее связь с регенерационной способностью // *Физиология растений.*—1993.—40, № 5.—С. 797—801.
72. *Rajasekaran K., Hein M. B., Davis G. C., Carnes M. G., Vasil I. K.* Endogenous growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. // *J. Plant Physiol.*—1987.—130, N 1.—P. 13—25.
73. *Kerbaux G. B., Monteiro W. R., Kraus J. E., Hell K. G.* Some physiological and structural aspects of cytokinin-autonomy in the callus of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) // *J. Plant Physiol.*—1988.—132, N 2.—P. 218—222.
74. *Wann S. R., Johnson M. A., Noland T. L., Carlson J. A.* Biochemical differences between embryogenic and nonembryogenic callus of *Picea abies* (L.) Karst. // *Plant Cell Repts.*—1987.—6, N 1.—P. 39—42.
75. *Hagege D., Kevers C., Geuns J., Gaspar T.* Ethylene production and polyamine content of fully habituated sugarbeet calli // *J. Plant Physiol.*—1994.—143, N 6.—P. 722—755.
76. *Кунах В. А.* Полиплоидия в культуре клеток и тканей *in vitro* и ее возможные причины // *Экспериментальная полиплоидия у культурных растений.*—Киев: Наук. думка, 1974.—С. 39—56.
77. *Huang Daniao, Gu Mingguang, Zhang Xueqin, Guo Catyue, Cao Zlyi.* Изменение содержания нуклеиновых кислот и белков у клонов каллуса из пыльцы кукурузы в субкультурах // *Acta. Genet. sin.*—1987.—14, N 2.—С. 114—120.
78. *Gokhale S. P., David S. B.* Studies on two types of calli occurring in *Hollarhena antidysenterica* wall cultures // *Geobios (India)*.—1987.—14, N 2—3.—P. 119—121.
79. *Озолина Н. В., Кузеванов В. Я., Котова Л. Г., Салгев Р. К.* Электрофоретическое изучение белков в морфогенных и неморфогенных каллусах яровой пшеницы // *Физиология и биохимия культур. растений.*—1995.—27, № 4.—С. 254—258.
80. *Mathias R.-J., Brown C., Pearson D., Brooks F. J., Mukasa C. A., Atkinson E.* Plant transformation. Cereal transformation and tissue culture studies // *Annu. Rept., 1987. ARFC. Inst. Plant. Sci., John Innes Inst.—Norwich, 1988.*—P. 16—17.
81. *Ben A. I. M., Worland A. J., Borner A.* *In vitro* culture variation of wheat and rye caused by genes affecting plant growth habit *in vivo* // *Euphytica.*—1992.—61, N 3.—P. 233—240.
82. *Иванов И. И., Трапезников В. К., Кудоярова Г. Р.* Изменение гормонального статуса растений пшеницы под влиянием минерального питания // *Физиология и биохимия культур. растений.*—1994.—26, № 1.—С. 32—36.
83. *Веденичева Н. П., Генералова В. Н., Мусатенко Л. И., Сытник К. М.* Гормональный комплекс частухи подорожниковой, адаптированной к разным условиям водного режима // *Доп. ИАН Украины.*—1995.—№ 12.—С. 100—102.
84. *Браун В.* Генетика бактерий.—М.: Наука, 1968.—446 с.
85. *Елифанова О. И.* Гормоны и размножение клеток.—М.: Наука, 1965.—242 с.
86. *Елифанова О. И., Терских В. В., Полуновский В. А.* Покоящиеся клетки. Свойства и функции в организме.—М.: Наука, 1983.—180 с.
87. *Ярошенко М. Ф.* Адаптация — направляющий фактор эволюции.—Кишинев: Штиинца, 1985.—184 с.
88. *Гриф В. Г., Марс Э. М.* Ритмы митотической активности и клеточные циклы в меристемах растений // *Цитология.*—1994.—36, № 11.—С. 1069—1084.
89. *Гриф В. Г., Марс Э. М.* Влияние ритма освещения на митотический цикл в корневой меристеме растений // *Цитология.*—1996.—38, № 7.—С. 718—25.
90. *Марс Э. М., Гриф В. Г.* Структура клеточного цикла и ритм делений клеток в меристемах растений // *Цитология.*—1996.—38, № 8.—С. 842—853.
91. *Бюнинг Э.* Ритмы физиологических процессов.—М.: Изд-во «Иностран. лит-ра», 1961.—184 с.
92. *Бюнинг Э.* Вступление // *Биол. часы.*—М.: Мир, 1964.—С. 11—26.
93. *Bullough W. S., Rytoma T.* Mitotic homeostasis // *Nature.*—1965.—205, N 4971.—P. 573—578.
94. *Sweeney B. M.* Rhythmic phenomena in plants.—London: New-York: Acad. press, 1969.—186 p.
95. *Lloyd D., Stupfel M.* The occurrence and functions of ultradian rhythms // *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.*—1991.—66, N 3.—P. 275—299.
96. *Лебедев П. В., Уткина И. А., Мельникова М. Ф., Кириллова Г. И.* Суточная ритмика митозов в верхушечных меристемах ежи // *Зап. Сverdл. отд-ние Всесоюз. бот. о-ва.*—1977.—№ 7.—С. 107—110.
97. *Balog C.* The mitotic index in diploid and triploid *Allium* roots // *Cytologia.*—1982.—47, N 3—4.—P. 689—697.
98. *Stephens C. E.* Daily mitotic cycle in the common onion, *Allium cepa* // *Cytologia.*—1984.—49, N 4.—P. 679—684.
99. *Jeoman M. M., Evans P. K., Maik G. G.* Changes in mitotic activity during early callus development // *Nature.*—1966.—209, N 5028.—P. 1115—1116.
100. *Кунах В. А., Пивень Н. М.* Динамика циркадного ритма

- митозов в процессе формирования штаммов *Narlorappus gracilis* в культуре *in vitro* // Цитология и генетика.—1974.—8, № 6.—С. 492—496.
101. Сидоренко П. Г., Пивень М. М. Добова ритміка мітогічної активності клітин у тканинах та суспензійних культурах // Укр. бот. журн.—1973.—30, № 5.—С. 651—654.
 102. Сидоренко П. Г., Викторова Н. В., Пивень Н. М. Изучение ритмики клеточной репродукции в условиях культуры *in vitro* // Культура клеток растений.—Киев: Наук. думка, 1978.—С. 33—37.
 103. Костенюк И. А., Любарец О. Ф., Кунах В. А. Ритмика митотической активности и содержания ядерной ДНК в культуре тканей мака прицветникового (*Papaver bracteatum* Lindl.) // Цитология и генетика.—1993.—27, № 6.—С. 32—39.
 104. Gupta S., Gadgil V. N. Effect of light on growth and mitotic periodicity in tissue cultures // Indian J. Exp. Biol.—1972.—10, N 1.—P. 62—64.
 105. Risser P. G. Somatic mitoses in cells of *Picea glauca* cultivated *in vitro* // Science.—1964.—143, N 3606.—P. 591—592.
 106. Kallak H. Cell division and chromosome numbers in the tissue culture of *Nicotiana tabacum* // Biol. plant.—1968.—10, N 3.—P. 199—204.
 107. Hayashi T. The diurnal rhythm in the mitotic frequency in the tobacco suspension culture // Sci. Papers Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo.—1968.—18, N 1.—P. 33—39.
 108. Фролова Л. В., Каллак Х. И. Суточный ритм митозов в культуре тканей растений // Цитология.—1974.—16, № 3.—С. 377—381.
 109. Singh B. D. Rhythmicity of mitosis in cell suspension cultures of *Narlorappus gracilis* (Nutt.) Gray // Ind. J. Exp. Biol.—1975.—13, N 1.—P. 49—51.
 110. Березниговская Л. Н., Гусев И. Ф., Смородин А. В. Биологические ритмы культуры тканей дурмана индийского и скополии гималайской // Растительные ресурсы.—1976.—12, № 1.—С. 67—72.
 111. Бычкова Г. С., Бутенко Р. Г. Синхронизация клеточных делений в суспензионной культуре женьшеня настоящего (*Panax ginseng* С. А. Mey) с помощью 5-аминоурацила // Культура клеток растений.—Киев: Наук. думка, 1978.—С. 16—22.
 112. Викторова Н. В., Сидоренко П. Г., Фомичева В. М. Ритм репродукции клеток растений *in vitro* и *in vivo* в условиях микрогравитации // Космич. биология и биотехнология.—Киев, 1986.—С. 28—32.
 113. Homma K., Johnson C. H., Hastings J. W. The timing of the circadian gate of cell division in gonauaux polyedra // Photochem. and Photobiol.—1986.—43, Suppl.—P. 26.
 114. Кунах В. А. Особенности митотического режима и роста клеток *Narlorappus gracilis* в культуре *in vitro* // Цитология и генетика.—1973.—7, № 6.—С. 510—513.
 115. Кунах В. А., Каухова И. Е., Алпатов Л. К., Воллосович А. Г. Особенности поведения клеток в культуре тканей *Rauwolfia serpentina* Benth. // Цитология и генетика.—1982.—16, № 5.—С. 6—10.
 116. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений.—М.: Колос, 1970.—256 с.
 117. Van't Hof J., McMillan B. Cell population kinetics in callus tissues of cultured pea root segments // Amer. J. Bot.—1969.—56, N 1.—P. 42—51.
 118. Гродзинский Д. М., Викторова Н. В. Роль гетерогенности популяции клеток высших растений, культивируемых *in vitro*, в кинетике ее размножения // Физиология растений.—1971.—18, № 4.—С. 823—831.
 119. Gould A. R., Bayliss M. W., Street H. E. Studies on the growth in culture of plant cells. XVII. Analysis of the cell cycle of asynchronously dividing *Acer pseudoplatanus* L. cells in suspension culture // J. Exp. Bot.—1974.—25, N 85.—P. 468—478.
 120. Webster P. L., Davidson D. Evidence from thymidine-³H-labeled meristems of *Vicia faba* of two cell populations // J. Cell Biol.—1968.—39, N 2.—P. 332—338.
 121. Phillips H. L., Torrey J. G. Duration of cell cycles in cultured roots of *Convolvulus* // Amer. J. Bot.—1972.—59, N 2.—P. 183—188.
 122. Рыбаков В. П., Романов Ю. А. К анализу метода Кластлера—Шермана и некоторые вопросы клеточной кинетики // Цитология.—1976.—18, № 3.—С. 319—323.
 123. Takahashi J. S., Menaker M. Circadian rhythmicity. Regulation in the time domain // Biol. Regulat. and Dev. Vol. 3B.—New York; London, 1984.—P. 285—303.
 124. Степанова С. И. Биоритмологические аспекты проблемы адаптации.—М.: Наука, 1986.—241 с.
 125. Hock B. Developmental physiology // Progr. Bot. Struct. Bot., Physiol., Genet., Taxon., Geobot.—Berlin, 1989.—Vol 50.—P. 133—157.
 126. Dalmer J. D. The biological rhythms and clocks of intertidal animals.—Oxford: Univ. press, 1995.—232 p.
 127. Winfree A. T. The geometry of biological time // New York etc.: Springer, 1980.—530 p. (Biomathematics, Vol. 8).
 128. Floh E. I. S., Handro W. Variation of histological patterns in tobacco callus during successive subcultures // Can. J. Bot.—1985.—63, N 10.—P. 1794—1800.
 129. Rensing L., Goedeke K. Circadian rhythm and cell cycle: possible entraining mechanisms // Chronobiologia.—1976.—3, N 1.—P. 53—65.
 130. Kloppstech K. Diurnal and circadian rhythmicity in the expression of light-induced plant nuclear messenger RNAs // Planta.—1985.—165, N 4.—P. 502—506.
 131. Schweiger H.-G., Hartwig R., Schweiger M. Cellular aspects of circadian rhythms // J. Cell. Sci.—1986.—81, Suppl., N 4.—P. 181—200.
 132. 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.

УДК 575.2:581.143.6
Поступила в редакцию 30.07.98