

Геномная изменчивость соматических клеток растений.

4. Изменчивость в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro*

В. А. Кунах

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Сделан обзор данных об особенностях геномной изменчивости при индукции процессов дедифференцировки и каллусообразования. Рассмотрены роль генотипа и состояния генома в клетках исходного экспланта, влияние факторов среды, причины, механизмы и возможные пути регуляции этой изменчивости. Показано, что индукция процессов дедифференцировки и дальнейшей пролиферации клеток предполагает перепрограммирование генома, «ювенилизацию» его состояния. Высказана гипотеза о регрессивной эволюции генома в процессе развития программы дедифференцировки. Способность к такой эволюции лежит в основе свойственного многим растениям цикла развития дифференцировка—дедифференцировка—редифференцировка. Существование такого цикла, его регулируемость как в природе, так и в эксперименте ставит под сомнение тезис о запрограммированном числе клеточных циклов, о необратимости старения, о фатуме запрограммированной клеточной смерти и апоптоза. Подчеркивается особая важность и актуальность изучения молекулярных механизмов процессов дедифференцировки и ювенилизации на примере растений. Это, по мнению автора, позволит глубже разобраться в общебиологических механизмах старения и смерти.

Введение. Каллусообразование — это результат дедифференциации и активного деления и роста дедифференцированных, неорганизованно растущих клеток. Процессы дедифференцировки, каллусообразования и редифференцировки можно индуцировать, культивируя *in vitro* даже такие высокодифференцированные клетки, как замыкающие клетки устьиц листа, зрелой пыльцы или эндосперма. У многих видов растений эти процессы генетически детерминированы и проявляются при определенных воздействиях как в природе, так и в эксперименте [1]. В экспериментах *in vitro* образующаяся из первичного экспланта клеточная масса именуется первичным каллусом (primary callus), который при определенных условиях может дать начало пассируемой культуре.

Дедифференцировка и каллусообразование как *in vivo*, так и *in vitro* сопровождаются существенны-

ми перестройками структурно-функциональных особенностей клетки. Данные гистологических, цитоморфологических, цитохимических, биохимических и некоторых других исследований этих процессов детально изложены в ряде монографий [2—5].

Впервые наличие в культуре *in vitro* клеток с геномными нарушениями, а именно: с полиплоидным и анеуплоидным числами хромосом, различных аномалий митоза было показано Готре в 1935 г. [6]. Позже было доказано, что высокий уровень геномной изменчивости — это одна из характерных особенностей клеточных культур. Она обнаруживается не только при изучении кариотипа (числа и морфологии хромосом), но и на уровне ДНК как ядерной, так и хлоропластной и митохондриальной [7—24].

Геномная нестабильность *in vitro* имеет двойную природу. Определенная часть геномных изменений, обнаруживаемых в первичном каллусе, воз-

никала в клетках в процессе онтогенеза растения либо как запрограммированные изменения генома при их дифференцировке, либо как незапрограммированные, случайные нарушения и мутации, возникшие при воздействии различных внутренних и внешних экстремальных (стрессовых) факторов. Детально анализ таких геномных изменений изложен в наших предыдущих сообщениях (см. [25, 26]).

Возникают геномные нарушения в культуре по ряду причин и *de novo*. В частности, установлено, что ранение, механическое повреждение, без которых лишь в редких случаях получают культуру клеток *in vitro*, могут вызывать генетические изменения (см. обзор [26]). При получении первичного каллуса выделенные экспланты подвергаются и другим воздействиям как физическим, так и химическим и пребывают в условиях существования, отличных от таковых в интактном организме. Эти воздействия часто превышают пределы нормы реакции исходного генотипа, что приводит к повышению уровня геномной изменчивости. На основе полученных экспериментальных данных было сформулировано положение о том, что сам процесс индукции каллуса является мутагенным [16].

Мы склонны считать, что значительная доля геномных изменений и нарушений, наблюдаемых при дедифференцировке и каллусообразовании, является результатом запрограммированных в клетке процессов. Известно, что в процессе дифференцировки в геноме происходят существенные изменения. В результате специализации функций, сопровождаемой и, по-видимому, обусловленной такими изменениями, многие из дифференцированных клеток в норме не способны к пролиферации. Однако растения нередко попадают в такие условия, когда организм может выжить или оставить потомство лишь в результате пролиферации дифференцированных клеток. Эти условия, видимо, и индуцируют работу механизмов геномных перестроек, конечным результатом которых является возврат клеточного генома в структурно-функциональное состояние, свойственное или близкое к таковому меристематических клеток или зиготы. Без большей части таких изменений, перестроек и нарушений геном дифференцированной клетки, особенно высокоспециализированной, не способен обеспечить нормальную репродукцию и, в конечном счете, тотипотентность.

В данной работе представлен анализ основных особенностей и литературных данных об особенностях геномной изменчивости при индукции каллусообразования и в первичном каллусе, на основе которого и была предложена высказанная гипотеза.

Изменчивость на уровне ДНК. Установлено, что ранение индуцирует селективную экспрессию генов [27—29], и уже на первых этапах изоляции клеток происходит радикальная перестройка ферментных систем, синтез новых белков, в том числе стрессовых и каллусоспецифических [27, 30—32]. Эти процессы сопровождаются дополнительным синтезом ДНК [33—36]. По некоторым данным, вначале происходит преимущественная репликация митохондриальной ДНК [37]. При этом в ней возникают существенные перестройки, уровень которых находится под ядерным контролем, зависит от продолжительности культивирования, и они могут передаваться растениям-регенерантам [21, 38]. Относительно ядерной ДНК установлено, что в клетках исходного экспланта, в том числе в клетках и протопластах, находящихся в стадии G_2 , перед митозом происходит репликация ДНК [39—41] и, по-видимому, лишь клетки, прошедшие репликацию, способны в дальнейшем делиться [34, 42]. Конечным результатом этих процессов *in vivo* является пролиферация клеток, приводящая к заживлению раны [5].

На первых этапах пролиферации клеток наблюдается дифференциальная репликация последовательностей как в ядерной, так и в пластидной и митохондриальной ДНК. В результате количество копий разных генов в одной клетке изменяется по-разному, а одни и те же гены в клетках различных и даже родственных видов представлены неодинаковым конечным числом копий [22, 43—46].

Например, у риса число копий одних генов и последовательностей ДНК увеличивалось в несколько раз, других — в несколько десятков раз, третьих — до 10 000 раз [47, 48]. Амплификация высокоповторяющихся последовательностей ДНК может приводить и к появлению внехромосомных молекул, размножаемых в дальнейшем автономно [49]. У пророска *Scilla sibirica* количество копий гена халконсинтазы резко снижалось, а содержание рДНК увеличивалось [50]. Эти изменения были обратимыми: в ДНК дифференцированных тканей растений-регенерантов количество исследованных копий уменьшалось или соответственно увеличивалось до уровня исходного растения [47, 50]. В других случаях некоторые из возникших при введении клеток в культуру изменений количества копий определенных последовательностей ДНК наблюдались и у растений-регенерантов, как это описано для кукурузы [51], и особенно убедительно — у льна [52—54].

Условия культивирования *in vitro* приводят к существенным изменениям в метилировании нуклеиновых кислот как ДНК [19, 55, 56], так и РНК,

в частности тРНК [57]. Этим, по-видимому, и объясняется изменение генной экспрессии: известно, что одним из механизмов регуляции транскрипции у растений является метилирование ДНК [56, 58, 59].

Изменения метилирования нуклеиновых кислот наблюдаются на первых этапах индукции каллуса (дедифференциации клеток), сохраняются при дальнейшем его росте и в определенных случаях могут быть переданы растениям-регенерантам [19, 55, 56, 60]. Отдельные гены, например гены рРНК, могут быть как гипо-, так и гиперметилованы, что и продемонстрировано на каллусных культурах озимой пшеницы [61] и петунии [62], а степень метилирования тРНК может коррелировать с потенциалом дифференциации отдельных тканей [57]. Уровень метилирования ДНК может быть различен у разных клеточных линий, даже произошедших от одного клона, а также у разных типов клеток одной линии (штамма). При этом клетки — предшественники соматических зародышей в суспензионной культуре моркови характеризовались самым низким содержанием 5-метилцитозина [63].

Однако известны случаи, когда уровень метилирования ДНК в каллусных клетках был таким же, как и в исходном материале. Например, у *Pennisetum purpureum* по этому признаку не отличались клетки нижней части молодых листьев и полученные от них каллусные клетки, не было выявлено отличий и между эмбрионными и неэмбрионными каллусами [64]. Процессы метилирования не были определяющими и при повышенном уровне полиморфизма ДНК (ПДРФ) у растений риса, регенерированных из протопластов [65].

Анализ нескольких сотен соматоклональных линий кукурузы показал, что у некоторых из них предположительно в результате гипометилирования в отличие от интактных растений были активированы подвижные генетические элементы типа Ac (Activator) и Spm (Suppressor-mutator) [66—68]. Исследования других соматоклональных вариантов кукурузы показали, что соматоклональная изменчивость может и не быть связанной с изменением числа или локализации Ac-гомологичных последовательностей. Однако в этом случае авторы не исключают возможности возникновения *in vitro* обнаруженных мутаций в результате перемещения других подвижных элементов [69].

На основе изложенных и других подобных результатов была предложена следующая гипотеза. Физиологические изменения, происходящие в клетках при переводе их в культуру *in vitro*, ведут к снижению метилирования ДНК, что активует

мобильные генетические элементы и таким образом вызывают генетические изменения типа дупликаций, делеций, транслокаций хромосом и др. [67]. Мобильные генетические элементы могут служить механизмом, посредством которого клеточная популяция реагирует на стрессовые изменения условий среды увеличением частоты мутаций [15, 70, 71]. При этом генетические изменения происходят как на уровне числа и структуры хромосом, так и на уровне генов. Частота генных мутаций в культуре клеток может быть очень высокой — в отдельных случаях она достигает в расчете на locus 10^{-2} и выше (см., например, [15, 19]).

Изменчивость числа хромосом. Результаты исследования особенностей хромосомной изменчивости клеток при каллусообразовании весьма противоречивы. Значительное число экспериментальных данных свидетельствует о том, что уже среди первых митозов после индукции дедифференциации наблюдается миксоплоидия с широким размахом по числу хромосом и наличием различных аномалий митоза. В не меньшем числе публикаций приведены данные о том, что среди первых клеточных делений уровень нарушений невелик и лишь при дальнейшей пролиферации, особенно в процессе пассирования *in vitro*, отмечается возрастание уровня и расширение спектра хромосомных аномалий. Причина противоречивости полученных данных заключается в использовании разного исходного материала и/или разных условий индукции каллусообразования.

Состояние генома в клетках различных органов и тканей растения может быть разным. Отличия возникают в онтогенезе как в результате запрограммированных изменений в процессе дифференциации клеток, так и в результате накопления мутаций. Количество и спектр этих геномных изменений зависят от многих факторов — вида растения, особенностей его генотипа, возраста и условий произрастания, типа ткани и уровня специализации клеток и т. п. [25]. Условия индуцирования дедифференциации и каллусообразования не только выявляют определенную часть этих изменений при вступлении клеток в митоз, но и в ряде случаев приводят к возникновению новых перестроек.

При использовании в качестве исходного материала заведомо диплоидных клеток в первичном каллусе наблюдаются, за редким исключением, диплоидные митозы. Это показано на примере не только онтогенетически молодых тканей и органов (меристемы, зародыши, молодые листья, некоторые части проростков и др.), но и при использовании высокодифференцированных клеток тех видов рас-

тений и/или тканей, которые в онтогенезе не подвержены полиплоидизации.

Например, диплоидным каллус был при его получении из нормальных и опухолевых (корончатый галл) тканей стебля подсолнечника [72], из покоящихся корнеплодов топинамбура [73], в клетках которого перед началом пролиферации содержание ДНК было близким 4С [74], из различных органов скерды *Crepis capillaris* [75, 76], из участков листьев и луковиц птицемлечника *Ornithogalum thyrsoides* [77] и других растений, дифференцированным тканям которых не свойственна полиплоидизация (примеры таких растений описаны нами ранее (см. [25]). В таких первичных каллусах в течение всего периода их роста, как правило, не отмечали существенных изменений числа хромосом. Для примера в табл. 1 приведены наши данные по двум контрастным по геномной изменчивости *in vitro* объектам — гаплопаппусу и табаку.

Однако при использовании в качестве первичных эксплантов сердцевинной паренхимы того же вида табака, клетки которой подвержены полиплоидизации, было установлено следующее. Число хромосом в первых после индукции каллусообразования митозах варьировало от 40 до 215 при $2n = 48$. Ди- и тетраплоидные клетки составляли 12,5 и 17,5 % изученных клеток соответственно. Клетки более высоких уровней пloidности (содержащие более 100 хромосом) составляли около 50 %. Вто-

рой митоз отмечали через 1—2 дня после первого. Частота встречаемости клеток с более чем 100 хромосомами снизилась во втором митозе вдвое (до 22,7 %). Культивируемая в дальнейшем ткань состояла на 70 % из клеток с числом хромосом от 77 до 96 [78].

Проведенные позже исследования показали, что у *N. tabacum* клетки верхушечной меристемы являются диплоидными и содержат 2С—4С ДНК, клетки сердцевинной паренхимы ниже меристемы на 300 мкм — 2С—8С, ниже на 10—20 см — 2С—16С, а у основания стебля — в основном 8С—16С. Экспланты сердцевинной паренхимы из основания стебля каллус не образовывали. Такие же клетки из верхних частей стебля приступали к делению через 5 дней и после первого деления содержали 2С—8С ДНК. В исходной паренхиме *in vivo* количество двухъядерных клеток было незначительным, *in vitro* их доля значительно возрастала, появлялись также лопастные ядра, наблюдали фрагментацию ядер. Фрагменты ядер содержали 2С—8С ДНК. На основании этого был сделан вывод, что в исходных миксоплоидных эксплантах первые деления *in vitro* претерпевают в основном диплоидные и тетраплоидные клетки. Клетки более высоких уровней пloidности претерпевают редукцию числа хромосом вследствие фрагментации ядер и лишь после этого приступают к делению [79].

Интересные данные получены также на примере гороха *Pisum sativum*. У этого растения показано

Таблица 1
Динамика изменений числа клеток разных уровней пloidности в первичных каллусах, полученных из участков молодых листьев, % (собственные данные)

Возраст каллуса, сут	Число изученных метафаз, шт.	Число наборов хромосом, n						
		1	< 2	2	> 2	3	4	> 4
<i>Haplopappus gracilis</i> ($2n = 4$)								
7	40	2,5±2,5	—	90,0±4,7	—	2,5±2,5	5,03±3,4	—
12	80	1,3±1,3	—	95,0±2,4	2,5±1,7	—	1,3±1,3	—
20	56	—	—	92,8±5,5	1,8±1,8	3,6±2,5	1,8±1,8	—
25	120	0,8±0,8	—	84,2±3,3	0,8±0,8	7,5±2,4	5,8±2,1	0,8±0,8
35	120	1,7±1,2	0,8±0,8	94,3±2,1	0,8±0,8	0,8±0,8	1,7±1,2	—
45	58	—	—	91,3±3,7	—	1,7±1,7	3,5±2,5	3,5±2,5
<i>Nicotiana tabacum</i> ($2n = 48$)								
15	122	—	4,9±2,0	95,1±2,0	—	—	—	—
40	43	—	4,7±3,2	93,0±3,9	—	—	2,3±2,3	—

отсутствие полиплоидных клеток в листьях и достаточно высокая их частота в корнях и семядолях. В наших экспериментах каллус, образовавшийся на участке листа, более чем на 90 % состоял из диплоидных клеток. Каллус стеблевого происхождения на треть состоял из полиплоидных клеток. В каллусе из участков корней наблюдали более широкий размах изменчивости по числу хромосом (от n до $6n$), при этом доля тетраплоидных митозов превышала 30 % (рис. 1).

Другими исследователями были изучены клетки каллуса, возникающего на изолированных семядолях гороха при их культивировании в кварцевом песке, т. е. без влияния обычных элементов выращивания клеток *in vitro*, в частности, компонентов питательной среды. Каллус образовывали клетки прокамбиальных тяжей и специализированные запасные клетки прираневой зоны семядоли. В первом случае митозы были диплоидными. Специализированные клетки начинали делиться позже и уже среди первых их делений обнаруживали полиплоидные митозы, перестройки хромосом и анома-

лии митоза. Геномные изменения возникали также и *de novo*, о чем свидетельствовало среди прочего появление клеток с диплохромосомами в последующих делениях каллусных клеток [80].

У гаглопиппуса все 27 изученных нами первичных каллусов, полученных из наземных вегетативных органов (верхушечная меристема, участки листьев и стеблей) растений разного возраста — от проростков до цветущих растений, состояли на 74—94 % из диплоидных клеток. Каллус из различных участков гипокотыля был полиплоидным; в нем наблюдали в основном тетраплоидные и октоплоидные митозы (рис. 2).

У арабидопсиса каллус, полученный из семян, в отличие от каллусов листового и стеблевого происхождения состоял практически полностью из диплоидных клеток [81]. Однако в опытах с проростками *Nigella sativa* наиболее стабильным был каллус из листьев. Он содержал, кроме диплоидных, незначительное количество тетраплоидных клеток. В клетках каллуса из стеблей уровень плоидности достигал $12n$, из семян — $8n$ [82].

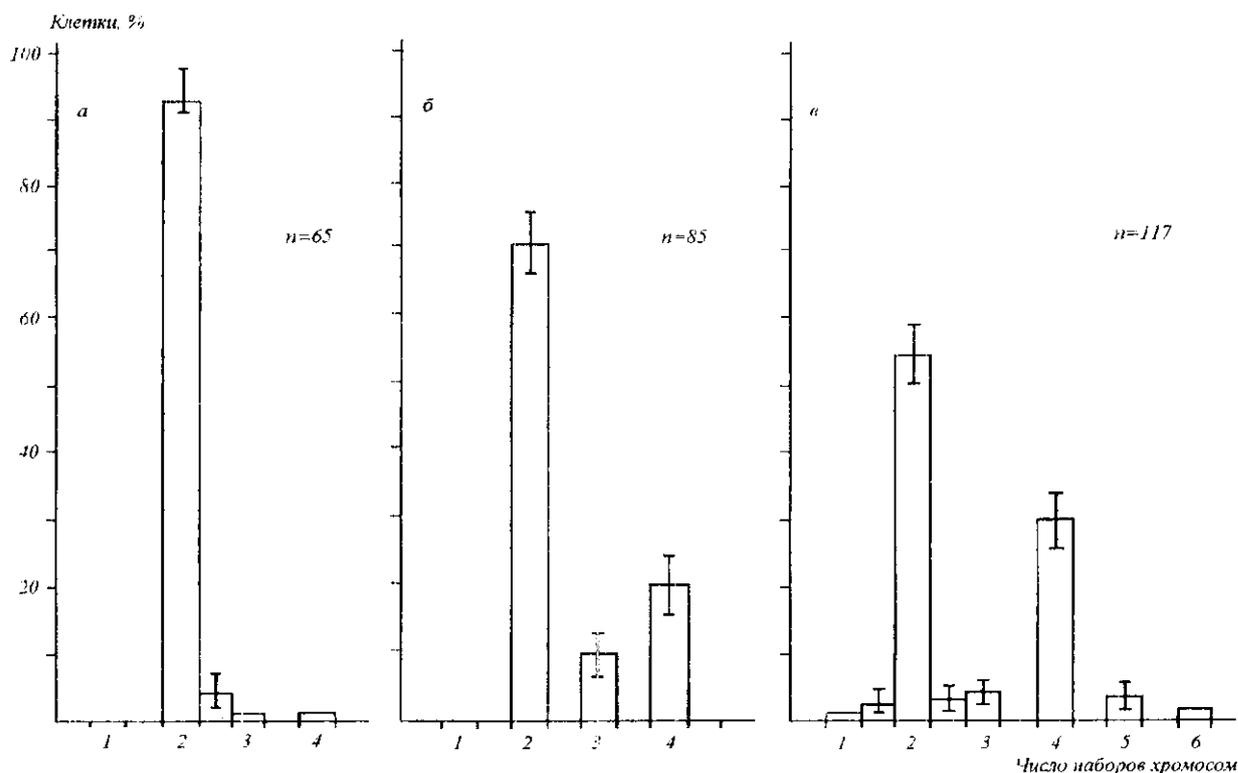


Рис. 1. Распределение по числу наборов хромосом клеток первичного каллуса, полученного из участков листа (а), стебля (б) и корня (в) гороха линии 1.1288 на среде Мурасиге-Скуга, содержащей 5 мг/л 2,4-Д. n — здесь и далее число изученных метафаз

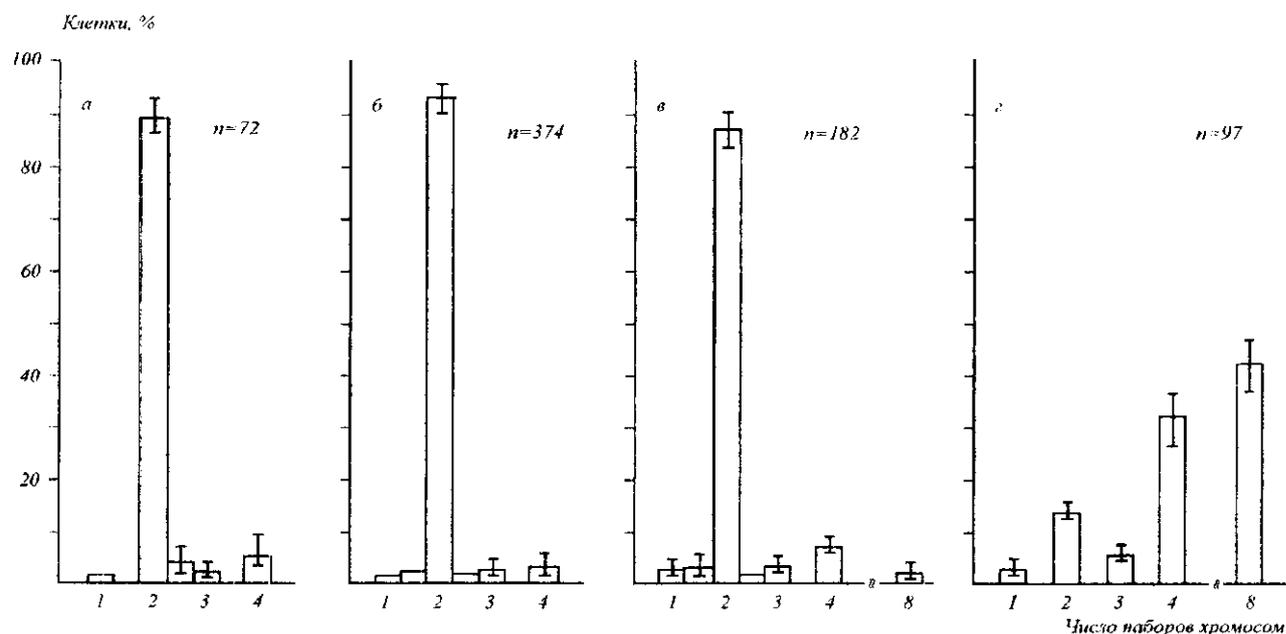


Рис. 2. Распределение по числу наборов хромосом клеток первичного каллуса *Haploappus gracilis*, полученного на среде Эриксона из верхушечной меристемы (а), участков листа (б), стебля (в) и гипокотыля (г) трехмесячного растения

У традесканции *T. paludosa* три изученных нами первичных каллуса, образовавшихся на разных смежных участках одного молодого листа, существенно различались между собой по плоидности (рис. 3). Это можно объяснить различной степенью дифференцировки клеток, находящихся в разных участках листа. Подобно тому, как это было показано при изучении способности к каллусообразованию участков листьев кукурузы [83].

У ячменя при изучении каллуса из узлов стеблей вначале делились лишь диплоидные клетки, а спустя некоторое время появлялись тетраплоидные митозы. Это обусловлено тем, что прежде всего каллус формировался из эпидермиса и кортикальной паренхимы стеблей и был диплоидным, а позже — из клеток медулярной паренхимы стеблей и состоял из тетраплоидных клеток [84].

Уровень и типы изменчивости зависят также от вида растения и от особенностей его генотипа. Например, сравнение четырех видов арабидопсиса показало, что из пыльников во всех случаях формировались анеуплоидные каллусы, а из прорастающих семян — в основном диплоидные. При этом уровень изменчивости по числу хромосом был разным у разных видов и даже внутри одного вида у разных каллусов, полученных из аналогичных экс-

плантов [85]. У двух видов картофеля, *Solanum tuberosum* и *S. phureja*, в участках листьев, образующих каллус *in vitro*, полиплоидные клетки возникли в результате эндоредупликации. Число циклов редупликации было видоспецифичным, а уровень полиплоидизации зависел от начального уровня плоидности генотипа, в том числе от доли полиплоидизированных ядер в исходном миксоплоидном участке листа [41]. Сходные результаты были позже получены в аналогичных опытах с люцерной [42]. При культивировании протопластов, полученных из зародышей двух сортов риса разновидности *japonica*, были установлены различия в плоидности культивируемых клеток. У одного сорта каллусы были диплоидными, а у другого — миксоплоидными и содержали диплоидные, тетра-, окто- и анеуплоидные клетки. Авторы считают, что полиплоидные клетки могли возникнуть в результате эндополиплоидии при выращивании протопластов в культуре *in vitro* [86].

В наших экспериментах с горохом, где исходным материалом служили гетерогенные по плоидности ткани — участки корней проростков, первичный каллус трех изученных образцов (сорта Одесский 58, Уладовский юбилейный и линия L1288) не отличался по числу хромосом. Во всех случаях

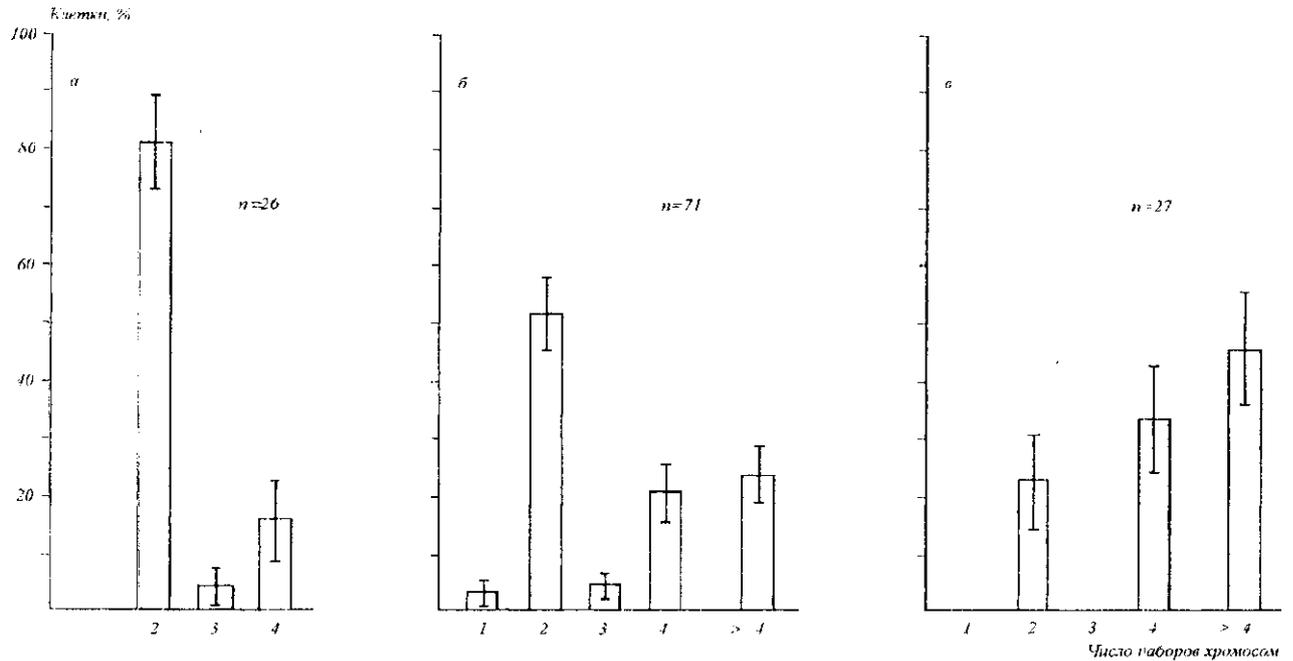


Рис. 3. Распределение по числу наборов хромосом клеток первичных каллусов, полученных на среде Мурасиге-Скуга из разных участков одного листа *Tradescantia paludosa*

доминировали диплоидные и тетраплоидные клетки при размахе изменчивости по числу хромосом от n до $6n$ [87]. Однако у кукурузы были установлены различия в ploидности каллусов, полученных из участков стеблей проростков разных сортов и линий, среди которых были чистые, гибридные и мутантные линии. Каллус мутантных и гибридных линий отличался более высокой частотой полиплоидных или соответственно анеуплоидных клеток. Было высказано предположение о том, что стабильность генома *in vitro* у кукурузы может быть связана с количеством С-гетерохроматина в хромосомах: сорта и линии с меньшим количеством гетерохроматина отличались более стабильным числом хромосом, однако труднее вводились в культуру *in vitro* [88, 89].

Уровень и темп хромосомной изменчивости *in vitro* зависят от начального уровня ploидности исходного растения и экспланта. У представителей разных видов, сортов, форм и генотипов или даже при использовании одного растения, но разных

исходных эксплантов зависимость темпа полиплоидизации от начального уровня ploидности может быть разной. Например, у *Crepis capillaris* темп полиплоидизации клеток первичного каллуса на эксплантах от гаплоидного растения был выше, чем на аналогичных эксплантах от диплоида [90]. У картофеля при изучении четырех дигаплоидов и одного тетраплоидного сорта высокая частота спонтанного удвоения числа хромосом (42—50 %) наблюдалась в клетках культуры клубнедисков у трех дигаплоидных генотипов, а у четвертого дигаплоида и тетраплоида удвоения не происходило [91].

Мы изучали первичные каллусы, полученные из участков листа диплоидного растения табака *N. tabacum* (сорт Самсун), из его незрелых пыльников и из участков листа трех гаплоидов, полученных при культивировании тех же пыльников. Было установлено, что четыре каллуса из листьев диплоида не отличались между собой по числу хромосом. В них преобладали диплоидные митозы (87—

93 %), встречались также тетраплоидные (до 2 %), гиподиплоидные (2,3—4,7 %) и гаплоидные (2,3—4,9 %) клетки. В тех же условиях каллусы гаплоидного происхождения существенно различались между собой (рис. 4). Подобно описанным выше данным, полученным на Tradescantia (см. рис. 3), различия были установлены и между образцами из разных участков одного листа (рис. 4, а—в). У некоторых каллусов значительной была доля гипогаметоидных клеток, достигавшая в одном случае 43 % (рис. 4, д). Подобные результаты были получены и при изучении первичных каллусов из пыльников. Однако доля диплоидных митозов в них была в ряде случаев значительно выше [92]. Общим для каллусов табака гаплоидного происхождения, особенно из пыльников, было сравнительно небольшое количество анеуплоидных клеток.

Сходные данные получены при анализе каллусов томата, индуцированных на участках листьев гаплоидного, диплоидного и тетраплоидного растения, а также полученных из пыльников диплоида. Отличие от табака заключалось в большем размахе изменчивости всех титров первичных каллусов томатов по числу хромосом и в более высокой частоте клеток как с редуцированным, так и с увеличенным числом хромосом (табл. 2). Это, по-видимому, обусловлено особенностями томата как объекта исследования. Они заключаются в том, что различным его органам, в том числе и листьям, свойственна миксополиплоидия (голисоматия). При этом частота клеток с различными С-уровнями ДНК у диплоидных и тетраплоидных растений практически одинакова в пределах от 2С до 16С и более и достигает, например, в черешках стареющих листьев уровня 123С. Это свидетельствует о том, что у томата в норме в ходе онтогенеза происходят процессы как редукции, так и эндоредупликации, а сама миксополиплоидия контролируется генетически как число эндоредупликаций и находится под влиянием условий выращивания растения [93].

Иная картина наблюдается у сахарной свеклы. Первичный каллус, полученный из участков молодых листьев сорта Верхняячская 031, более чем на 90 % состоял из диплоидных клеток. Каллус из пыльников состоял преимущественно из гаплоидных клеток (около 52 %), достаточно часто в нем встречались диплоидные (34 %), реже — тетраплоидные (10 %) и в единичных случаях — клетки с числом хромосом более 4n (около 4 %). В данном каллусе в отличие от каллусов, полученных из пыльников табака и томатов, вовсе не встречались клетки с числом хромосом менее гаплоидного набора и анеуплоидные клетки.

Следовательно, начальный уровень ploидности экспланта может существенно влиять не только на темпы полиплоидизации, но и на процессы редукции числа хромосом при каллусообразовании. При этом у разных видов растений зависимость процессов изменчивости числа хромосом от начального уровня ploидности имеет разную степень выраженности.

Уровень геномной изменчивости клеток первичного каллуса зависит также от условий выращивания растений и даже от стадии клеточного цикла исходного экспланта [94, 95]. Это, видимо, обусловлено тем, что условия выращивания могут существенно влиять на особенности геномной изменчивости в онтогенезе. Например, как у диплоидных, так и у тетраплоидных растений томата число эндоредупликаций в клетках листьев и семядолей, а отсюда и особенности миксополиплоидии (полисоматии) их тканей были разными при выращивании растений в теплице и *in vitro* [93]. Подобные данные получены и для других растений [25]. Вероятно, именно поэтому, например, у земляники *Fragaria ananassa* листовые экспланты растений, выращиваемых *in vitro*, по сравнению с таковыми однолетних тепличных растений образовывали каллус, характеризующийся повышенным уровнем геномной изменчивости, в частности анеуплоидией [95].

Структурная изменчивость хромосом. В первичном каллусе выявлена повышенная частота структурных перестроек хромосом, выявляющихся как в метафазах, так и в анафазах митоза. В частности, известно, что уровень спонтанных аберраций хромосом, регистрируемых в анафазах митоза в интактных растениях, в норме редко превышает 1 %. В первичном каллусе частота таких мутаций, как правило, значительно выше. Например, по нашим данным, приведенным в табл. 3, уровень анафазных аберраций в первичном каллусе гороха превышал 26 %, в каллусе из участка листа креписа — 14 %, участка листа гаплоида табака — 7 %, а у остальных изученных растений различных уровней ploидности был в пределах 2—4 %.

У разных видов растений отличия наблюдались не только в уровне, но и в спектре аберраций, что свидетельствует о разных механизмах их образования. Так, например, у гороха, креписа и диплоида табака, где клетки с фрагментами составляли среди аберрантных анафаз 80 % и более (табл. 4), основным механизмом возникновения хромосомных аберраций были разрывы хромосом с образованием фрагментов. В каллусе от диплоида гаплопепуса и гаплоида табака основными механизмами были транслокации и, очевидно, цикл мостов раз-

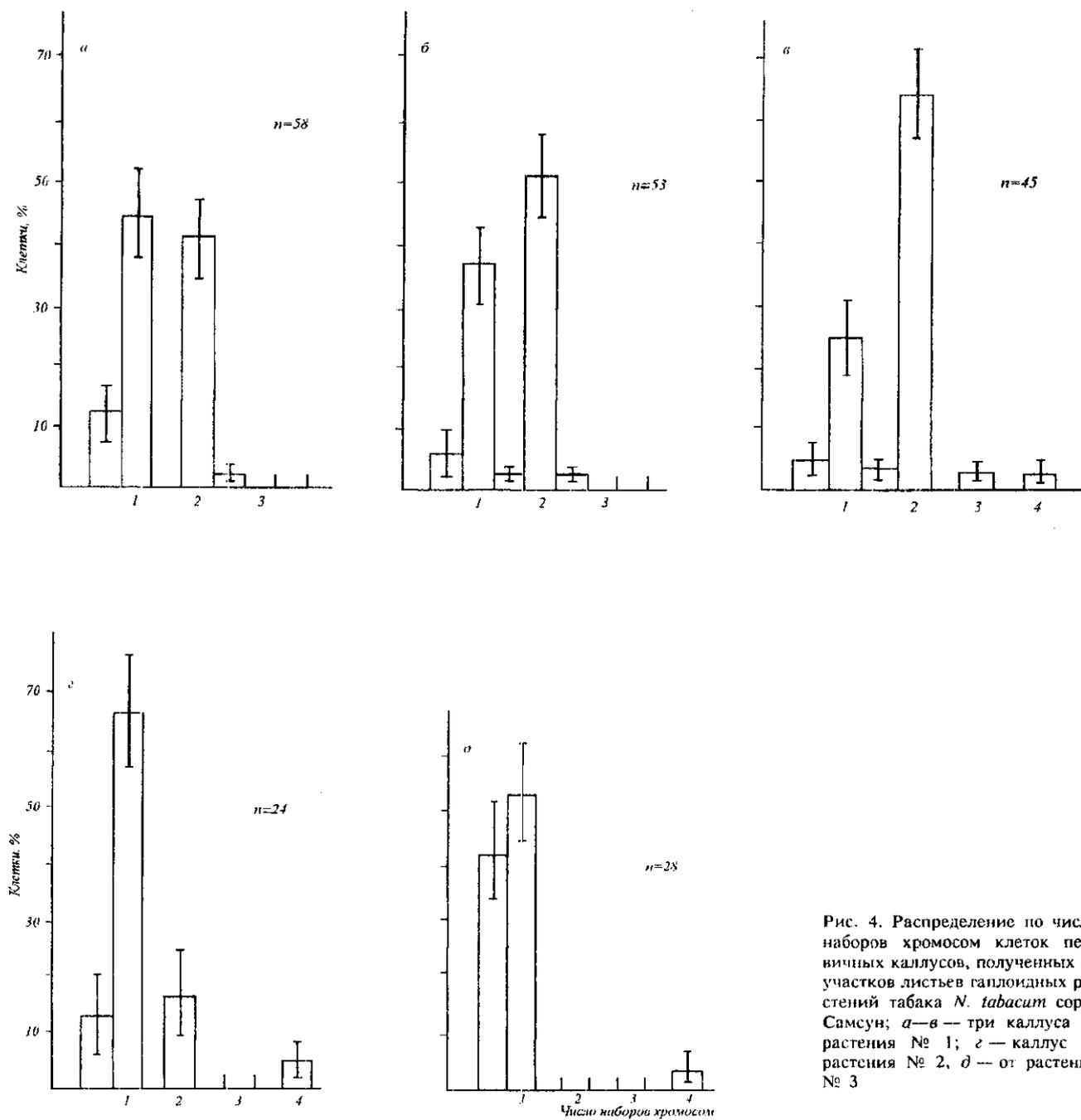


Рис. 4. Распределение по числу наборов хромосом клеток первичных каллусов, полученных из участков листьев гаплоидных растений табака *N. tabacum* сорта Самсун; а-в — три каллуса от растения № 1; г — каллус от растения № 2, д — от растения № 3

Таблица 2

Распределение по числу хромосом клеток первичных каллусов томата *Lycopersicon esculentum*, полученных на среде МС

Индекс каллуса	Число изученных метафаз, шт.	Число наборов хромосом, n (%)				
		< 1	1	< 2	2	> 2
<i>Каллус из листьев гаплоида</i>						
№ 51	22	18,2±8,2	45,4±10,6	13,6±7,3	18,2±8,2	—
№ 55	97	15,8±3,7	71,0±4,6	6,5±2,3	6,5±2,3	—
№ 55а	96	16,7±3,8	67,7±4,8	8,3±2,8	7,3±2,7	—
№ 56	117	33,4±4,4	37,0±4,5	19,8±3,7	10,2±2,8	—
№ 57	110	39,6±4,7	39,1±4,6	12,5±3,1	9,1±2,7	—
№ 58	94	48,9±5,1	43,6±5,2	3,2±1,8	4,3±2,1	—
№ 61	35	8,5±4,7	48,6±8,4	22,9±7,1	8,5±4,7	11,4±5,4
№ 65	160	6,3±2,1	56,9±3,9	19,4±3,1	9,4±2,3	—
№ 66	60	6,7±3,2	58,3±6,4	13,3±4,4	18,3±4,9	1,7±1,6
<i>Каллус из листьев диплоида</i>						
№ 100	50	2,0±1,9	58,0±6,9	12,0±4,6	28,0±6,3	—
№ 102	100	10,0±3,0	23,0±4,2	27,0±4,4	35,0±4,8	—
№ 103	101	6,9±2,5	27,7±4,5	34,7±4,7	22,7±4,2	2,9±1,7
№ 110	100	1,0±1,0	31,0±4,6	6,0±2,4	57,0±5,0	—
№ 111	37	18,9±6,7	13,5±5,6	2,7±2,7	59,4±8,2	2,7±2,7
<i>Каллус из листьев тетраплоида</i>						
№ 72	33	—	3,0±3,0	3,0±3,0	27,3±7,8	—
№ 73	50	2,0±2,0	2,0±2,0	6,0±3,4	20,0±5,7	2,0±2,0
№ 74	95	3,2±1,8	9,5±3,0	18,9±4,0	30,5±4,7	1,0±1,0
№ 76	52	—	3,8±2,4	13,5±4,7	19,2±5,4	7,7±3,7
№ 83	53	—	3,8±2,4	11,2±4,3	5,6±3,1	16,8±5,1
<i>Каллус из пыльников диплоида</i>						
№ 1	105	4,8±2,1	17,1±3,7	20,0±3,9	34,3±4,6	7,5±2,6
№ 2	40	10,0±4,7	27,5±7,1	25,0±6,8	15,0±5,6	10,0±4,7
№ 3	200	4,0±1,4	20,0±2,8	12,5±2,3	17,0±2,7	1,0±0,7

Индекс каллуса	Число изученных метафаз, шт.	Число наборов хромосом, n (%)				
		3	4	> 4, но < 8	8	> 8
<i>Каллус из листьев гаплоида</i>						
№ 51	22	—	—	—	—	—
№ 55	97	—	—	—	—	—
№ 55а	96	—	—	—	—	—
№ 56	117	—	—	—	—	—
№ 57	110	—	—	—	—	—

Окончание табл. 2

Индекс каллуса	Число изученных метафаз, шт.	Число наборов хромосом, <i>n</i> (%)				
		3	4	> 4, ис < 8	8	> 8
№ 58	94	—	—	—	—	—
№ 61	35	—	—	—	—	—
№ 65	160	—	8,1±2,2	—	—	—
№ 66	60	1,7±1,6	—	—	—	—
<i>Каллус из листьев диплоида</i>						
№ 100	50	—	—	—	—	—
№ 102	100	4,0±2,0	—	1,1±1,0	—	—
№ 103	101	3,0±1,7	0,9±0,9	—	—	—
№ 110	100	—	5,0±2,2	—	—	—
№ 111	37	—	2,7±2,0	—	—	—
<i>Каллус из листьев тетраплоида</i>						
№ 72	33	3,0±3,0	48,5±8,7	6,1±4,1	9,1±5,0	—
№ 73	50	8,0±3,8	44,0±7,0	8,0±3,8	—	8,0±3,8
№ 74	95	5,3±2,3	27,4±4,6	3,2±1,8	—	1,0±1,0
№ 76	52	3,8±2,4	38,4±6,7	11,4±4,3	—	1,9±1,9
№ 83	53	5,7±3,1	47,2±6,9	5,6±3,1	5,6±3,1	—
<i>Каллус из пыльников диплоида</i>						
№ 1	105	1,9±1,3	7,6±2,5	1,0±1,0	4,8±2,1	1,0±1,0
№ 2	40	5,0±3,4	7,5±4,2	—	—	—
№ 3	200	5,0±1,5	19,0±2,7	1,0±0,7	15,5±2,6	5,0±1,5

Примечание. Данные получены совместно с Б. А. Левенко и Г. Н. Юрковой.

рыв—слияние—мост, о чем свидетельствует подавляющее число среди аберраций клеток с мостами без фрагментов (76—82 %). Мы не исключаем определенной роли в этих процессах и митотического кроссинговера, существенный вклад которого в уровень хромосомных перестроек *in vitro* признается рядом исследователей [20].

Перечисленные процессы, несомненно, приводят к изменению морфологии хромосом. Однако среди первых митозов *in vitro* появление таких хромосом в метафазах отмечается редко. Не установлено в первичном каллусе существенных изменений и при использовании С-метода дифференциального окрашивания хромосом, как это было показано нами на примере скерды *C. capillaris* [96].

Изменения морфологии хромосом, часто обусловленные перманентным наличием цикла разрыв—слияние—мост, обнаруживаются (и в ряде случаев в весьма значительных количествах) в клетках пассируемых культур [9, 92, 96—99].

Влияние факторов среды. Изложенный материал свидетельствует о том, что уровень и спектр геномной изменчивости при дедифференцировке и каллусообразовании зависят от вида растения и состояния генома в исходных клетках. Существенно влияют на эти процессы и конкретные условия индукции каллусогенеза — температура, освещенность, состав питательной среды и др. [8, 10—13, 16—18, 20, 36, 52, 100].

На плоидность клеток первичного каллуса мо-

Таблица 3

Уровень и типы aberrаций хромосом в первичных каллусах разных видов растений (собственные данные)

Вид растения	Исучено алияфаз, шт.		Аберрантные анафазы, %			
	Всего	С aberrациями	Всего	С мостами без фрагментов	С фрагментами	С мостами и фрагментами
<i>Harporappus gracilis</i>						
диплоид	1511	44	2,9±0,4	2,4±0,4	0,5±0,2	—
тетраплоид	182	7	3,8±1,4	2,2±1,1	1,1±0,8	0,5±0,5
<i>Nicotiana tabacum</i>						
гаплоид	748	54	7,2±0,9	5,5±0,8	1,5±0,4	0,3±0,2
диплоид	289	9	3,1±1,0	0,7±0,5	2,1±0,8	0,4±0,4
<i>Lycopersicon esculentum</i>						
гаплоид	391	10	2,6±0,8	1,0±0,5	1,3±0,6	0,3±0,3
<i>Pisum sativum</i>						
диплоид	229	60	26,2±2,9	2,2±1,0	22,3±2,8	1,7±0,9
<i>Crepis capillaris</i>						
диплоид	340	49	14,4±1,9	2,6±0,9	11,8±1,7	—

гут оказывать влияние минеральный состав и тип (жидкая или агаризованная) питательной среды. В частности, на примере гаплопаппуса *H. gracilis* было установлено, что каллус, полученный из участка стебля, на твердой среде Уайта состоял на 93,7 % из диплоидных клеток, а в жидкой среде Уайта и на твердой — Мурасиге-Скуга (МС) диплоидные и тетраплоидные клетки составляли примерно по 50 % [101]. Выращивание каллусных клеток, полученных и из других органов (стебля, пыльников, семяночек), на агаре и в суспензии с применением тех же сред показало, что частота полиплоидных и анеуплоидных клеток была выше при использовании суспензионных культур [102].

В наших экспериментах с гаплопаппусом участки листьев на агаризованной среде Эриксона образовали каллус, состоящий более чем на 90 % из диплоидных клеток. В аналогичных условиях, но на среде с минеральной основой по Уайту и особенно с макроэлементами по МС частота диплоидных клеток была значительно ниже и не превышала 60 %. На среде Уайта значительно чаще, чем на среде Эриксона, встречались триплоидные клетки, а на среде МС — тетраплоидные и клетки более высоких уровней полиплоидности. По анеуплоидным клеткам различий между изученными каллусами установлено не было (рис. 5). Подобное влияние минерального состава среды на хромосомную из-

менчивость клеток было показано и в других экспериментах, например на джете [103].

Значительно сказывается на процессах изменчивости наличие, концентрация и соотношение стимуляторов роста и особенно фитогормонов, а также сахарозы. Полиплоидизирующее и мутагенное влияние кокосового молока, дрожжевого экстракта и других подобных, не четко определенных по химическому составу добавок, мы здесь рассматривать не будем, поскольку этот эффект давно установлен и проанализирован (см., например, [8, 14]). Возможная роль сахарозы и других сахаров как факторов соматической изменчивости, мутагенов и регуляторов генной экспрессии изложена в работах [104—106].

Суммируя накопленные на сегодня многочисленные данные о влиянии фитогормонов на уровень и спектр геномной изменчивости в процессах дедифференциации и каллусообразования, мы здесь лишь подчеркнем их ведущую роль в этих процессах. Более детально и подробно это изложено в наших предыдущих обзорах [1, 25, 26].

Определяющее значение фитогормонов обусловлено не только тем, что именно они индуцируют пролиферацию клеток, контролируя их деление [107, 108]. Показано, например, что 2,4-Д и НУК стимулируют также эндополиплоидию, политению и амитозы [109—111]; 2,4-Д в ряде случаев вызы-

Таблица 4
Спектр aberrаций хромосом в первичном каллусе разных видов растений (собственные данные)

Вид растения	Число aberrантных анафаз, шт.	Тип aberrаций				
		Одиночные мосты			Парные мосты	
		1	2	> 2	1	2
<i>Нарцисс gracilis</i>						
диплоид	44	27	2	5	2	—
тетраплоид	7	4	—	—	—	—
<i>Nicotiana tabacum</i>						
гаплоид	54	30	4	3	3	1
диплоид	9	2	—	—	—	—
<i>Lycopersicon esculentum</i>						
гаплоид	10	3	1	—	—	—
<i>Pisum sativum</i>						
диплоид	60	2	1	—	2	—
<i>Crepis capillaris</i>						
диплоид	49	9	—	—	—	—

Вид растения	Число aberrантных анафаз, шт.	Тип aberrаций				Сумма типов aberrаций, %		
		Фрагменты			Одиночные мосты с фрагментами	Мосты без фрагментов	Фрагменты	Мосты с фрагментами
		1	2	> 2				
<i>Нарцисс gracilis</i>								
диплоид	44	6	2	—	—	81,8	18,2	—
тетраплоид	7	2	—	—	1	57,1	28,6	14,3
<i>Nicotiana tabacum</i>								
гаплоид	54	8	2	1	2	75,9	20,4	3,7
диплоид	9	2	2	2	1	22,2	66,7	11,1
<i>Lycopersicon esculentum</i>								
гаплоид	10	4	1	—	1	40,0	50,0	10,0
<i>Pisum sativum</i>								
диплоид	60	41	8	2	4	8,3	85,0	6,7
<i>Crepis capillaris</i>								
диплоид	49	37	3	—	—	18,4	81,6	—

вает мейозоподобные процессы [112] и мутации [12]; кинетин и БАП — дополнительную репликацию ДНК и мутации (см. [25, 26], а также [100]).

Вместе с тем нами получены данные о том, что

повышенная концентрация кинетина (1 по сравнению с 0,02 мг/л) существенно не влияла на уровень хромосомных aberrаций и на число хромосом в клетках первичного каллуса *H. gracilis* [113,

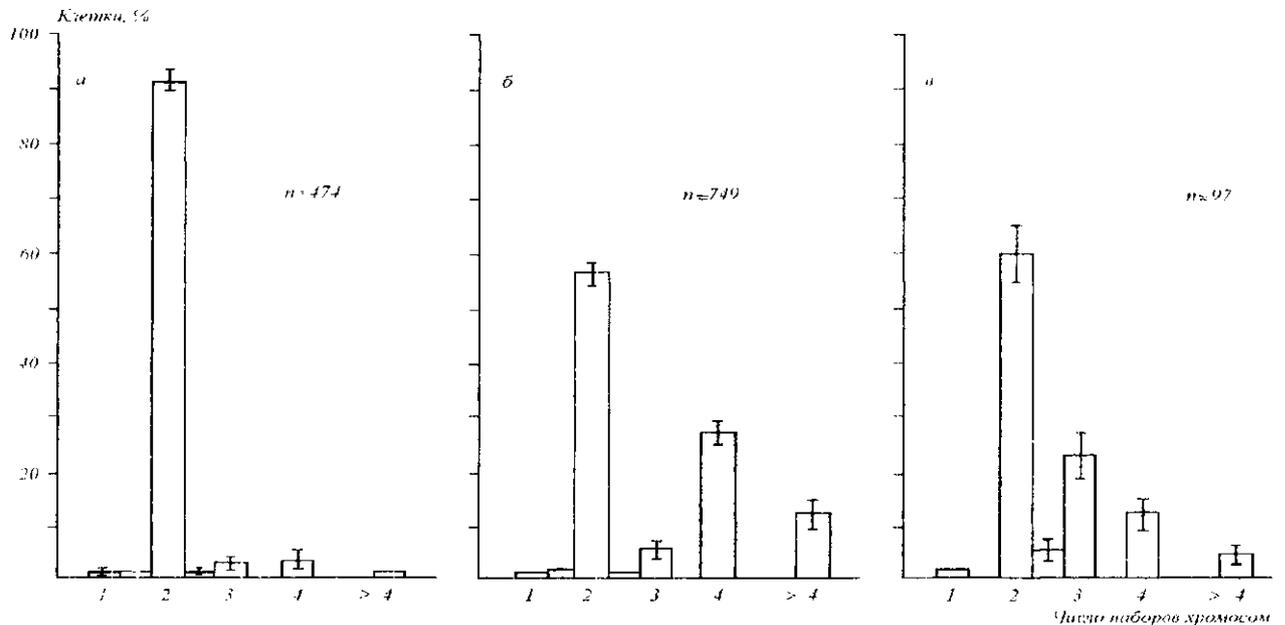


Рис. 5. Распределение по числу наборов хромосом клеток первичного каллуса, полученного из участков листа трехмесячного растения *H. gracilis* на среде Эриксона (а), Мурасиге-Скуга (б) и Уайга (в)

114]. Другими исследователями также показано, что гормональный состав среды существенно не влияет на кариологическое поведение клеток [115]. Более того, нами получены данные о том, что при иницировании каллусообразования на участках листа и стебля взрослого растения *H. gracilis* на среде без гормонов частота диплоидных митозов была почти вдвое ниже, а тетраплоидных — выше, чем на среде с ауксином и цитокинином. Частота каллусообразования на безгормональной среде была ниже, более низким был и темп роста каллуса [116]. По-видимому, травма (ранение), вычленение из организма и влияние компонентов среды (но без гормонов) могут индуцировать дедифференциацию и пролиферацию далеко не всех и к тому же в значительной мере не диплоидных клеток исходного экспланта. Гормоны же в оптимальных дозах и соотношении в комплексе с другими факторами каллусообразования стимулируют эти процессы:

значительно эффективнее и, видимо, прежде всего в диплоидных клетках, в ряде случаев не вызывая на первых этапах каких-либо заметных перестроек генома. Такие перестройки могут появляться в дальнейшем через несколько суток после начала пролиферации. Это свойственно в первую очередь тем эксплантам, клетки которых являются изначально диплоидными, как это было показано, например, на чесноке [110], и не всем видам растений, о чем свидетельствуют результаты, изложенные в следующем разделе.

Подводя итог рассмотрению данных о влиянии гормонов, можно в целом согласиться со следующей схемой событий, предложенной Шаминой [12]. Изолирование клеток из интактного растения, нарушая гормональную регуляцию, индуцирует аномалии в функционировании митотического аппарата. Эти аномалии реализуются в клетках различной пloidности, присутствующих в исход-

ных эксплантах. В зависимости от состава и соотношения экзогенных фитогормонов происходит реализация компетентности к делению разных типов клеток. На первом этапе культивирования, по-видимому, все три причины приводят к возрастанию миксоплоидии, повышению хромосомных aberrаций.

Изложенные и другие многочисленные сведения, имеющиеся в литературе, позволяют сегодня говорить не только о существенном влиянии условий индукции каллусообразования и роста клеток на уровень и спектр геномной изменчивости *in vitro*. Они свидетельствуют о возможности использования факторов среды и условий роста в качестве регуляторов изменчивости клеток как при индукции каллусообразования, так и особенно при длительном пассировании клеточных культур, что было продемонстрировано во многих экспериментах [17, 52, 53, 113, 114, 116—121].

Возможные причины и механизмы геномной изменчивости при дедифференциации и каллусообразовании. Приведенные данные свидетельствуют о том, что при индукции каллусообразования не только проявляются накопленные в онтогенезе геномные изменения, но и могут возникать новые реорганизации и перестройки генома. Механизмы возникновения таких перестроек на первых этапах клеточной пролиферации различны. Рассмотрим некоторые из них.

После реактивации метаболизма условиями изолирования клеток, где ведущую роль играют ранение, фитогормоны и сахара, появлению первых митозов предшествует синтез ДНК [36, 39, 40, 79, 122, 123]. Количество ДНК при этом может возрастать в зависимости от генотипа, тканевой принадлежности исходного экспланта и состава среды по-разному, в ряде случаев многократно. Например, у *Lobularia maritima* при культивировании дистальных половинок листьев образование каллуса в первые дни ограничивалось диплоидными меристематическими клетками сосудов. Одновременно в клетках паренхимы, окружающих жилки листьев, происходила эндоредупликация, что обуславливало возрастание эндополиплоидии при росте каллуса [124]. У гороха в клетках наружной коры участков корня количество ДНК удваивалось, а во внутренней коре к моменту первого деления — увеличивалось в 8 раз [125]. В результате среди первых митозов в культивируемых сегментах первичного корня гороха наблюдали клетки с числом хромосом от $2n$ до $32n$, а также клетки с диплохромосомами и политенными хромосомами. Последние встречались преимущественно в клетках кожицы [126]. Гаплоидные наборы диплохромосом

наблюдали также в первых делениях гаплоидных протопластов дурмана и табаков *N. plumbaginifolia* и *N. sylvestris* [127, 128]. Удвоение хромосом в результате эндоредупликации до первого митоза *in vitro* дало возможность получать гомозиготные растения пестунии и пшеницы из культивируемой пыльцы [129].

Многократная эндоредупликация хромосом может приводить и к возникновению ядер с политенными хромосомами [126, 130]. Выявленность этого явления зависит от генотипа исходного растения. Например, политения *in vitro* была обнаружена лишь у некоторых образцов ячменя [130]. По мнению некоторых исследователей, формирование мегахромосом обусловлено интенсивным накоплением гетерохроматина, как это было обнаружено, например, в ряде каллусных образцов сахарной свеклы [131].

У других растений, в частности, у *Vicia faba*, *N. tabacum*, *N. glauca*, *N. bigelovii* показано, что быстрая инициация синтеза ДНК нередко сопровождается фрагментацией ядер (амитозами), в результате которых образуются многоядерные клетки, а также экстрезией (выбросом ядерного материала за пределы клетки). Двух- и многоядерные клетки потом могут делиться на несколько клеток. Сверхсинтез ДНК, в ряде случаев достигающий уровня более $64C$, является необходимым условием последующей фрагментации ядер. В целом у ряда объектов пролиферация клеток *in vitro* обязана, в основном, амитозу, а митотическая активность проявляется после фрагментации ядер [33, 35, 79, 115, 122, 132, 133].

Описанные явления, в особенности ядерная фрагментация с последующими митозами, являются, по мнению некоторых исследователей, главной причиной широкого варьирования числа хромосом в клетках формирующегося первичного каллуса, в частности, появления анеуплоидных клеток [14, 134, 135]. Одной из причин нарушений нормального функционирования веретена деления, приводящих к изменению числа хромосом, в том числе к митотической реституции, может быть частичное или полное выпадение синтеза рРНК в некоторых каллусных клетках. Утрата синтеза рРНК происходит вследствие инактивации генов в результате повышенной конденсации ядерного хроматина в каллусных клетках, которая особенно четко наблюдается в первые дни культивирования [130, 136].

Большинство перечисленных и многие другие типы геномных перестроек, нарушений и отклонений от нормального хода митоза наиболее часто возникают и отмечаются при индукции каллусообразования как *in vivo*, так и *in vitro* в высококодиф-

ференцированных тканях и клетках, в тех тканях, которым свойствен высокий уровень геномной изменчивости в онтогенезе [2, 110, 130, 137—139]. Это можно объяснить следующим образом.

Геном растений в онтогенезе подвергается существенным изменениям. Изменения, происходящие на разных стадиях дифференциации, например, амплификация отдельных последовательностей ДНК, являются обратимыми. На поздних стадиях дифференциации происходят более существенные изменения, в частности редукция последовательностей, которые в норме считаются необратимыми (см., например, [140]). При введении в культуру *in vitro* таких клеток индуцируемые процессы дедифференциации и пролиферации предполагают, очевидно, перепрограммирование генома, его возврат в состояние, характерное для недифференцированных клеток. Это сопровождается не только различными типами переустройств, но и избавлением клетки от необратимых изменений генома. По-видимому, этим и можно объяснить факты, свидетельствующие о том, что именно на ранних этапах каллусообразования (до и во время первых митозов, в том числе при культивировании протопластов) наиболее часто возникают мутации и происходят такие процессы, как дополнительный, зачастую весьма значительный синтез ДНК, амплификация отдельных последовательностей и эндоредупликация хромосом, экструзия и цитомиксис, диминуция хроматина и потеря тканеспецифических В-хромосом, фрагментация ядер и их слияние в многоядерных клетках, различные аномалии митоза и цитокинеза, образование микроядер при отсутствии aberrантных анафаз, сегрегация ядерного материала в профазе и метафазах не только полиплоидных, но и диплоидных клеток, приводящая к редукции числа хромосом, соматический мейоз и кроссинговер и др. [10, 50, 130, 141—147]. Имеются и другие данные, свидетельствующие о том, что именно при инициации каллуса, в том числе из протопластов, резко возрастало количество клеток с измененным числом хромосом и иными аномалиями, а затем в ряде случаев большинство таких клеток элиминировало [78, 141, 148, 149]. Не исключено, что перечисленные выше процессы приводят не только к перепрограммированию генома, его реорганизации и, в конечном счете, «ювенилизации», но и могут в дальнейшем обеспечивать наблюдаемое в ряде случаев сохранение стабильного кариотипа в популяциях культивируемых клеток.

Подтверждением вышеизложенного предположения может служить также то, что при использовании меристематических и других тканей с высо-

кой митотической активностью тех же видов растений, каллусообразование у которых на дифференцированных тканях сопровождается высокой изменчивостью, первые *in vitro* митозы не требуют дополнительного синтеза ДНК и в них не наблюдается реорганизации генома (см., например, [110, 150]).

Изложенное выше позволяет также заключить, что для установления программы дедифференцировки, включающей в необходимых случаях более или менее значительные геномные преобразования, направленные в целом на «ювенилизацию» генома, необходимыми условиями являются травма и наличие сахарозы, сенсibiliзирующие клетки к фитогормонам, и, как правило, фитогормоны, обеспечивающие пролиферацию клеток. Явления геномной изменчивости, наблюдаемые на первых этапах каллусообразования, в большинстве своем, по нашему мнению, являются следствием реализации программы дедифференцировки и подобно способности к каллусообразованию они, по-видимому, являются запрограммированными. Не исключено, что индукторами этой программы изменчивости могут быть те же факторы, которые являются индукторами дедифференциации, т. е. травма, гормоны и сахароза.

Заключение. Каллусогенез, в основе которого лежит дедифференцировка клеток и дальнейшая их пролиферация, у многих видов растений, прежде всего двудольных, — эволюционно закрепленная генетически детерминированная адаптивная реакция на травму, направленная на восстановление поврежденного организма. Она обусловлена небольшим числом взаимодействующих генов, возможно, и моногенно [1].

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. Различия в геномной изменчивости клеток первичных каллусов обусловлены, прежде всего, генотипическими особенностями растения (вид, сорт, линия, форма и др.), состоянием генома в клетках исходного экспланта, глубиной геномных перестроек, произошедших при дифференцировке клеток. Особенно значительная реорганизация генома на всех уровнях изучения (хромосомном, геномном, молекулярном) наблюдается у тех растений и при использовании тех тканей в качестве исходного экспланта, у которых в процессе онтогенеза происходит существенное переустройств-

во генома. Влияют на эти процессы *in vitro* конкретные условия индукции каллусогенеза и особенно состав питательной среды. Например, при каллусообразовании на аналогичных эксплантах, но в разных условиях установлены геномные различия между каллусами. С другой стороны, в аналогичных условиях различные экспланты могут формировать каллусы, заметно генетически не отличающиеся. И, наконец, для успешного получения каллуса с наименьшим уровнем геномных перестроек, например диплоидного, при использовании разных генотипов одного вида растения в ряде случаев необходимы и разные условия каллусообразования. Поэтому можно предположить, что в особенностях протекания геномной изменчивости при дедифференцировке основным, как и при индукции каллусообразования, является взаимодействие генотип — среда. Это взаимодействие основано на том, что ранение (травма), компоненты питательной среды, прежде всего, фитогормоны и, вероятно, сахара, другие условия изолирования влияют на экспрессию генов, определяющих каллусообразование. Эти же факторы, видимо, детерминируют и включение определенных элементов мутаторной системы.

Процессы изменчивости, наблюдаемые при индукции дедифференцировки, скорее всего, являются, в основном, запрограммированными. Они в определенной степени подобны таковым, протекающим в интактных организмах в премейотических митозах и особенно в материнских клетках пыльцы, когда перед началом формирования половых клеток в ряде случаев происходит «нормализация» генома за счет экстрезии, цитомиксиса, амитозов и других явлений. Уровень, спектр и в конечном счете направленность изменчивости при каллусообразовании, очевидно, определяются главным образом теми же факторами и механизмами, которые действуют в онтогенезе при дифференцировке [151], и экспрессия изменчивости является контролируемой [143]. Индукторы дедифференциации являются индукторами и процессов этой изменчивости.

Анализ накопленных многочисленных данных свидетельствует о том, что при дедифференцировке и каллусообразовании происходит упрощение организации клеток и особенностей их метаболизма, утрата важных, даже основных морфологических и физиологических признаков, свойственных исходным дифференцированным клеткам [2—6]. Поэтому исходя из общепринятых эволюционных терминов [152] каллусогенез можно справедливо считать регрессивным путем развития клеток, геномные изменения, наблюдаемые при этом, — регрессив-

ными, а явление в целом — регрессивной эволюцией генома. Способность к этим процессам, вероятно, и определяет возможность дедифференцировки клеток и, в конечном счете, — каллусообразования.

Однако, по-видимому, не все виды и формы растений и не все типы их клеток и тканей способны к процессам регрессивной эволюции. Например, у злаков, являющихся эволюционно более продвинутыми видами растений, более ярко выражены явления запрограммированной клеточной смерти и апоптоза, а каллусообразование им обычно не свойственно. У них, видимо, либо отсутствует, либо слабо выражена способность к «ювенилизации» генома. Как правило, лишь у онтогенетически молодых тканей и органов таких растений можно *in vitro* вызвать пролиферацию и каллусообразование, воздействуя экстремальными факторами и сильными синтетическими аналогами фитогормонов [1]. Еще труднее у них индуцируется органогенез и регенерация. Возможно, это связано именно с отсутствием генетической детерминации процессов «ювенилизации» генома, а индуцируемая условиями изолирования клеток геномная изменчивость далеко не всегда способствует реализации тотипотентности.

В целом наблюдаемые при каллусообразовании *in vitro* 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. Развитие этих процессов представляется нам следующим образом.

Начальным индуктором дедифференциации является травма. Реакция на травму — запуск процессов изменчивости, сопровождающих дедифференцировку клеток и первые этапы их пролиферации. В клетках изменяется компетентность к фитогормонам, сахарозе и другим регуляторам роста. Использование таких веществ *in vitro* в оптимальных для целей экспериментатора дозах не только ускоряет и усиливает, но и искажает запрограммированное течение процессов изменчивости. Иными словами, наблюдаемая при каллусообразовании *in vitro* геномная изменчивость — это гипертрофированное и, по-видимому, несколько искаженное про-

явление процессов, происходящих в природе при индукции дедифференцировки и пролиферации клеток.

Проблемы дифференцировки и дедифференцировки, старения, запрограммированной клеточной смерти, апоптоза и иммортализации (клеточного бессмертия) представляют особый интерес как для биологической науки, так и для общества в целом. Уникальной моделью для изучения этих процессов являются растения. Установленная у них обратимость процессов дифференцировки и старения, возможность многократного повторения цикла дифференцировка—дедифференцировка—редифференцировка ставит под сомнение тезис о жестко запрограммированном числе клеточных циклов, о необратимости старения, о фатуме запрограммированной клеточной смерти и апоптоза.

Однако исследование этих проблем с использованием растений ведется сегодня недостаточно. Не изучены механизмы рассмотренных процессов, совершенно не ясна их молекулярная основа. Как ни удивительно, но все еще не ясны механизмы гормональной регуляции цикла дифференцировка—дедифференцировка—редифференцировка и сопровождающей его реорганизации генома. Практически не изучена роль даже таких ключевых ферментов изменчивости, как нуклеазы, рекомбиназы, топоизомеразы, теломеразы и др., а имеющиеся данные не только скудны, но и неоднозначны (см., например, [153]). Важно отметить, что познание молекулярных механизмов рассмотренных процессов на столь удобной модели, как растение, будет иметь не меньшее общеприкладное и общечеловеческое значение, чем другие основополагающие открытия, сделанные именно на растениях и положившие начало новым наукам — генетике, цитологии, вирусологии, генетической инженерии, биотехнологиям. И если эта работа будет иметь не только познавательное значение, но и инициирует новые исследования в этой области — ее главная задача будет выполнена.

В. А. Кунах

Геномна мінливість соматичних клітин рослин. 4. Мінливість у процесі дедиференціації і калусоутворення *in vitro*

Резюме

Зроблено огляд даних стосовно особливостей геномної мінливості при індукції процесів дедиференціації і калусоутворення. Розглянуто роль генотипу і стану геному в клітинах вихідного експланту, вплив чинників середовища, причини механізмів та можливі шляхи регуляції цієї мінливості. Показано, що індукція процесів дедиференціації і подальшої проліферації клітин передбачає перепрограмування геному, «ювенілізацію» його стану. Запропоновано гіпотезу щодо регресивної еволюції геному в процесі розвитку програми дедифе-

ренціації. Здатність до такої еволюції лежить в основі властивого багатьом рослинам циклу розвитку диференціація—дедиференціація—редиференціація. Існування такого циклу, його регульованість як у природі, так і в експерименті ставить під сумнів тезу про запрограмоване число клітинних циклів, про незворотність старіння, про фатум запрограмованої клітинної смерті та апоптозу. Підкреслюється особлива важливість та актуальність вивчення молекулярних механізмів процесів дедиференціації і ювенілізації на прикладі рослин. Це, на думку автора, дозволить краще розібратися в загальнобіологічних механізмах старіння і смерті.

В. А. Кунах

Genome variability in plant somatic cells. 4. Variability in the process of dedifferentiation and callus formation *in vitro*

Summary

Peculiarities of the genome variations upon induction of the dedifferentiation and callus formation events have been reviewed. Role of the genotype and the genome state in cells of the original explant, nutrient medium stimuli, determinants, mechanisms and possible ways to control these variations have been discussed. Initiation of the dedifferentiation processes and further cell proliferation was shown to suggest the reprogramming of the genome, «juvenilization» of its state. Genome regressive evolution in the course of the development of the dedifferentiation program was hypothesized. Capacity for such evolution seems to underly the differentiation—dedifferentiation—redifferentiation developmental cycle peculiar to many plants. Existence of such a cycle, its potential to be control-liable both in nature and experiment appear to question the concept about the programmed number of the cell cycles, the irreversibility of ageing, the fatality of the programmed cell death and apoptosis. Utmost importance and actuality of the studies on molecular mechanisms of the dedifferentiation and juvenilization processes in plants has been emphasized. Author believes that this would allow better understanding of the fundamental biological mechanisms involving ageing and death.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 3. Каллусообразование *in vitro* // Биополимеры и клетка.—1997.—13, № 5.—С. 362—371.
2. Кренке Н. П. Регенерация растений.—М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1950.—676 с.
3. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений.—М.: Наука, 1964.—272 с.
4. Кордюм Е. Л., Недуха Е. М., Сидоренко П. Г. Структурно-функциональная характеристика растительной клетки в процессе дифференцировки и дедифференцировки.—К.: Наук. думка, 1980.—116 с.
5. Сарнацкая В. В. Физиологические аспекты опухолевого роста растений.—К.: Наук. думка, 1993.—152 с.
6. Gautheret R. J. La culture *in vitro*: bref aperçu historique // C. r. Acad. agr. France.—1980.—66, N 8.—P. 621—627.
7. Partanen C. R. Plant tissue culture in relation to developmental cytology // Int. Rev. Cytol.—1963.—15.—P. 215—243.
8. Reinert J. Neue Ergebnisse und Probleme mit Gewebekulturen aus höheren Pflanzen // Ber. Dtsch. bot. Ges.—1965.—78, N 11.—S. 1—10.
9. Зосимович В. П., Кунах В. А. Уровень, типы и происхождение аберраций хромосом в культуре изолированных тканей растений // Генетика.—1975.—11, № 6.—С. 37—46.
10. Фролова Л. В., Шамина З. Б. Цитогенетическая характеристика культуры тканей растений из семейства бо-

- бовых // Цитология и генетика.—1974.—8, № 5.—С. 413—418.
11. Шамина З. Б. Генетическая изменчивость растительных клеток *in vitro* // Культура клеток растений.—Киев: Наук. думка, 1978.—С. 80—93.
 12. Шамина З. Б. Генетическая изменчивость в популяциях соматических клеток растений в культуре: Дис. ... д-ра биол. наук.—Ленинград, 1988.—34 с.
 13. Фролова Л. В. Особенности популяций культивируемых клеток // Культура клеток растений.—М.: Наука, 1981.—С. 5—16.
 14. D'Amato F. Spontaneous mutations and somaclonal variation // Nucl. Techn. and *in vitro* Cult. Plant Improv.: Proc. Int. Symp. (Vienna, 19—23 Aug., 1985).—Vienna, 1986.—P. 3—10.
 15. Orton T. J. Somaclonal variation: theoretical and practical considerations // Gene Manipul. Plant Improv.: 16th Stadler Genet. Symp.—New York; London, 1984.—P. 427—468.
 16. Orton T. J. Genetic instability in celery tissue and cell cultures // Iowa State J. Res.—1987.—61, N 4.—P. 481—498.
 17. Mestre J.-C., Petiard V. La nature de la variabilité des cellules végétales en culture; les diverses causes possibles de son expression // Bull. Soc. Bot. Fr. Actual. Bot.—1985.—132, N 3—4.—P. 67—78.
 18. Сидоров В. А., Сидорова Н. В. Соматическая изменчивость — источник генетического разнообразия у растений // Цитология и генетика.—1987.—21, N 3.—С. 230—236.
 19. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция.—Киев: Наук. думка, 1990.—280 с.
 20. Morrison R. A., Whitaker R. J., Evans D. A. Somaclonal variation: its genetic basis and prospects for crop improvement // Opportunities Phytochem. Plant Biotechnol.: Proc. 27th Annu. Meet. Phytochem. Soc. N. Amer. (Tampa, Fla, June 21—26, 1987).—New York; London, 1988.—P. 1—18.
 21. Hartman C., Winfield M., Corre F. et al. A comparative study of the mitochondrial genome organization in *in vitro* cultures of diploid, tetraploid, and hexaploid *Triticum* species // Theor. and Appl. Genet.—1996.—93.—P. 968—974.
 22. Wersuhn G. Obtaining mutants from cell cultures // Plant Breed.—1989.—102, N 1.—P. 1—9.
 23. He Qi-gian, Lin Xin-zhi. Изменчивость хлДНК и мтДНК в культуре тканей люцерны // Acta agron. sin.—1994.—20, № 1.—С. 33—38.
 24. Мардамыян А. Г., Матвеева Е. В. Сравнительный анализ копииности низкомолекулярных митохондриальных ДНК гороха посевного (*Pisum sativum* L.) // Физиология растений.—1997.—44, № 3.—С. 445—448.
 25. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 1. Изменчивость в онтогенезе // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 6.—С. 5—35.
 26. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 2. Изменчивость в природе // Там же.—1995.—11, № 6.—С. 5—40.
 27. Meyer Y. L'induction du développement mitotique chez les protoplastes de mésophylle de Tabac cultivés «in vitro»: contrôle hormonal // Bull. Soc. Bot. Fr.—1985.—132, N 1.—P. 87—102.
 28. Botella M. A., Quesada M. A., Medina M. I. et al. Induction of a tomato peroxidase gene in vascular tissue // FEBS Lett.—1994.—347, N 2—3.—P. 195—198.
 29. Smith C. M., Davies E. Wound-induced electrical signaling and systemic gene expression in plants // Plant Physiol.—1994.—105, N 1, Suppl.—P. 67.
 30. Зеленева И. В., Поликарповкина Р. Т., Реймерс Ф. Э. и др. Ферментные системы каллюсной и суспензионной культуры в сравнении с исходным материалом — междуузлиями интактного растения // Докл. АН СССР.—1979.—248, № 2.—С. 509—512.
 31. Swarnkar P. L., Bohra S. P., Chandra N. Biochemical studies on initiation of callus in *Solanum surattense* // Plant Physiol.—1986.—126, N 2—3.—P. 293—296.
 32. Xinyu Wang, Shiyu Zhang. Изменения в составе изоферментов в эксплантах молодых соцветий пшеницы и ячменя при дедифференцировке // J. Lanzhou Univ.—1991.—27, № 2.—P. 108—112.
 33. Buiatti M., Durante M., Geri G. et al. Amplificazione nelle prime fasi della sdifferenziazione di midollo di *Nicotiana glauca* // Boll. Zool.—1975.—42, N 4.—P. 438—439.
 34. Le Tran B., Kohler K.-H. Untersuchungen über die DNA-Synthese während der Frühphase der Kallusbildung bei *Zea mays* Wurzeln // Biochem. Physiol. Pflanzen.—1976.—170, N 3.—S. 189—200.
 35. De Martinis P., Brunori A., Devreux M. DNA synthesis in dedifferentiating pith cells of *Nicotiana tabacum* // G. Bot. ital.—1977.—111, N 4—5.—P. 255.
 36. Chriqui D. Données nouvelles sur les mécanismes de la dédifférenciation chez les végétaux // Arch. Anat. Microsc. et morphol. exp.—1983.—72, N 3.—P. 248—249.
 37. Masuda K., Kikuta Y., Fujino K., Okazawa Y. Preferential synthesis of mitochondrial DNA during the initial stage of tissue growth in potato explant cultures // J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.—1994.—66, N 1.—P. 13—25.
 38. Nakui Y., Nakamura S. Изменчивость мтДНК в ауксин-устойчивой клеточной культуре табака // Sci. Repts Fac. Agr. Kobe Univ.—1991.—19, N 2.—P. 107—112.
 39. Cionini P. G., Zolfino C., Cavallini A. Extra DNA synthesis in the dedifferentiating cells of *Vicia faba* roots // Protoplasma.—1985.—124, N 3.—P. 213—218.
 40. Chen Chi-Chang, Lee Feng-Ming, Kao Yen-Yu. Endoreduplication in leaf protoplasts of haploid *Nicotiana plumbaginifolia* cultured *in vitro* // Genome.—1988.—30, N 5.—P. 615—620.
 41. Pijnaker L. P., Sree Romulu K., Dijkhuis P., Ferwerd M. A. Flow cytometric and karyological analysis of polysomaty and polyploidization during callus formation from leaf segments of various potato genotypes // Theor. and Appl. Genet.—1989.—77, N 1.—P. 102—110.
 42. Хрусталева Л. И., Карлов Г. И. Кинетика полиплоидизации клеток в первичном каллусе у различных генотипов люцерны // Цитология и генетика.—1995.—29, № 2.—С. 31—36.
 43. Dührssen E., Schafer A., Neumann K.-H. Qualitative differences in the DNA of some higher plants, and aspects of selective DNA replication during differentiation // Plant Syst. and Evol.—1979.—Suppl., N 2.—P. 95—103.
 44. Geri C., Durante M., Parenti R., Buiatti M. Amplificazione di DNA e fumorogenesi in tessuti vegetali // Atti Assoc. genet. ital.—1980.—26.—P. 157—159.
 45. Sala F., Biasini M. G. Heritable variability induced by the *in vitro* culture and genetic improvement of cultivated plants // J. bot. ital.—1986.—120, N 1—6.—P. 43—54.
 46. Escandon A. S., Hopp H. E., Haine G. Differential amplification of five selected genes in callus cultures of two shrubby *Oxalis* species // Plant Sci.—1989.—63, N 2.—P. 177—185.
 47. Kikuchi S., Takaiwa F., Oono K. Variable copy number DNA sequences in rice // Mol. and Gen. Genet.—1987.—210, N 3.—P. 373—380.
 48. Zheng K. L., Castiglione S., Biasini M. G. et al. Nuclear DNA amplification in cultured cells of *Oryza sativa* L. // Theor. and Appl. Genet.—1987.—74, N 1.—P. 65—70.
 49. Cuzzoni E., Ferretti L., Giordani C. et al. Extrachromosomal

- amplification of a repeated DNA sequence in cultured rice (*Oryza sativa* L.) cells // *G. Bot. Ital.*—1989.—123, Suppl. N 2.—P. 160—161.
50. Deamling B., Clermont L. Changes in DNA content and chromosomal size during cell culture and plant regeneration of *Scilla siberica*: selective chromatin diminution in response to environmental conditions // *Chromosoma*.—1989.—97, N 6.—P. 439—448.
 51. Rivin C. J., Gould A. Quantitative changes in the genome of maize embryos in tissue culture // *Genetics (USA)*.—1984.—107, N 3, pt 2.—P. 89—90.
 52. Callis C. A., Cleary W. DNA variation in flax tissue culture // *Can. J. Genet. and Cytol.*—1986.—28, N 2.—P. 247—251.
 53. Callis C. A. The generation of somatic and heritable variation in response to stress // *Amer. Natur.*—1987.—130, Suppl.—P. 62—73.
 54. Cebret S. Kierunkowosc rekombinacyjnych zmian wewnatz-genomowych // *Kosmos*.—1987.—36, N 3.—P. 593—605.
 55. Gobel E., Brown P. T. H., Lorz H. *In vitro* culture of *Zea mays* L. and analysis of regenerated plants // *Nucl. Techn. and in vitro Cult. Plant Improv.: Proc. Int. Symp. (Vienna, 19—23 Aug., 1985)*.—Vienna, 1986.—P. 21—27.
 56. Башкина Е. А., Александрюк Н. И., Курнос М. Д. и др. Метилирование ДНК в суспензионной культуре клеток табака при обработке фитогормонами // *Биол. науки*.—1980.—№ 4.—С. 103—110.
 57. Jones L. H., Scott T. K. Transfer ribonucleic acid modification and its relationship to tumorous and nontumorous plant growth // *Plant Physiol.*—1981.—67, N 3.—P. 535—538.
 58. Ванюшин Б. Ф. Метилирование ДНК и клеточная дифференцировка у высших растений // *Рост растений и дифференцировка*.—М., 1981.—С. 176—192.
 59. Sjakste T. G., Rushal I. D. Action of cytokinins on the higher plant nuclei // *Latv. Zinatnu. Akad. Vestis. B.*—1992.—N 7.—P. 49—52.
 60. Vyskot B., Gazdova B., Siroky J. Methylation patterns of two repetitive DNA sequences in tobacco tissue cultures and their regenerants // *Biol. plant.*—1993.—35, N 3.—P. 321—327.
 61. Ковальская В. С., Сидорова Н. В. Характер метилирования генов рДНК в каллусной ткани озимой пшеницы // *Пробл. теор. и прикл. генетики в Казахстане: Материалы. Респ. конф. (Алма-Ата, 18—22 нояб., 1990)*.—Алма-Ата, 1990.—С. 62—63.
 62. Anderson S., Lewis-Smith A. C., Smith S. M. Methylation of ribosomal RNA genes on *Petunia* hybrid a plants, callus cultures and regenerated shoots // *Plant Cell Repts.*—1990.—8, N 9.—P. 554—557.
 63. Palmgren G., Mattsson O., Okkels F. T. Specific levels of DNA methylation in various tissues, cell lines and cell types of *Daucus carota* // *Plant Physiol.*—1991.—95, N 1.—P. 174—178.
 64. Morrish F. M., Vasil I. K. DNA methylation and embryogenic competence in leaves and callus of napiergrass (*Pennisetum purpurcum* Schum) // *Ibid.*—1989.—90, N 1.—P. 37—40.
 65. Brown P. T. H., Kyoizuka J., Sukekiyo Y. et al. Molecular changes in protoplast-derived rice plants // *Mol. and Gen. Genet.*—1990.—223, N 2.—P. 324—328.
 66. Phillips R. L., Peschke V. M. Discovery of Ac activity among progeny of tissue culture-derived maize plants // *Plant Transposable Elem.: Proc. Int. Symp. (Madison, Wisc., Aug. 22—26, 1987)*.—New York; London, 1988.—P. 305—315.
 67. Hodgson J. Making the transition to applied technology // *Bio/Technology*.—1990.—8, N 8.—С. 714.
 68. Peschke V. M., Phillips R. L. Activation of the maize transposable element suppressor-mutator (Spm) in tissue culture // *Theor. and Appl. Genet.*—1991.—81, N 1.—P. 90—97.
 69. Williams M. E., Hepburn A. G., Widholm J. M. Somaclonal variation in the maize inbred line is not associated with changes in a number or location of Ac-homologous sequences // *Ibid.*—N 2.—P. 272—276.
 70. Vodkin L. O. Transposable element influence on plant gene expression and variation // *Biochem. Plants: Comprehensive treatise*.—San-Diego etc., 1989.—Vol. 15.—P. 83—132.
 71. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge // *Dyn. Genome: Barbara McClintock's Ideas Century Genet.*—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1992.—P. 361—380.
 72. Butcher D. N., Sogeki A. K., Tommerup S. C. Factors influencing changes in ploidy and nuclear DNA levels in cells from normal, crown-gall and habituated cultures of *Helianthus annuus* L. // *Protoplasma*.—1975.—86.—P. 295—308.
 73. Dodds J. H., Phillips R. DNA and histone content of immature tracheary elements from cultured artichoke explants // *Planta*.—1977.—135, N 3.—P. 213—216.
 74. Jeoman M. M., Evans P. K., Naik G. G. Changes in mitotic activity during early callus development // *Nature*.—1966.—209.—P. 1115—1116.
 75. Reinert J., Kuster H. J. Diploide, chlorophyllhaltige Gewebekulturen aus Blättern von *Crepis capillaris* (L.) Wallr. // *Z. Pflanzen. physiol.*—1966.—54, N 3.—S. 213—222.
 76. Brassard D. Neoformation de bourgeons vegetatifs et inflorescentiels a partir de disques foliaires du *Crepis capillaris* L. Wallr. cultures *in vitro* // *Ibid.*—1979.—93, N 1.—P. 69—81.
 77. Nayak S., Sen S. Cytological and cytophotometric analysis of direct explant and callus derived plants of *Ornithogalum thyrsoides* Jacq // *Cytologia*.—1991.—56, N 2.—P. 297—302.
 78. Shimada T., Tabata M. Chromosome numbers in cultured pith tissue of tobacco // *Jap. J. Genet.*—1967.—42, N 3.—P. 195—201.
 79. Brassard D. Etude cytophotometrique des variations du contenu en DNA nucleaire au cours de la dedifferentiation de la moelle de Tabak (*Nicotiana tabacum*) cultivee *in vitro* // *Compt. rend. Acad. Sci.*—1974.—278D, N 20.—P. 2517—2520.
 80. Михайлов О. Ф., Ессенова В. П. Некоторые данные по цитогенетическому анализу каллуса, возникающего у регенерирующих семядолей гороха // *Пробл. онкологии в терат. растений*.—Л.: Наука, 1975.—С. 52—54.
 81. Negrutiu D., Beefink F., Jacobs M. *Arabidopsis thaliana* as a model system in somatic cell genetics. I. Cell and tissue culture // *Plant Sci. Lett.*—1975.—5.—P. 293—304.
 82. Chand S., Roy S. C. Study of callus tissues from different parts of *Nigella sativa* (*Ranunculaceae*) // *Experientia*.—1980.—36, N 3.—P. 305—306.
 83. Wenzler H., Meins F. Mapping regions of the Maize leaf capable of proliferation in culture // *Protoplasma*.—1986.—131, N 1.—P. 103—105.
 84. Ruiz M. L., Vazquez A. M. Chromosome number evolution in stem derived calluses *Hordeum vulgare* L. cultured *in vitro* // *Ibid.*—1982.—111, N 2.—P. 83—86.
 85. Amos J. A., Scholl R. L. Induction of haploid callus from anthers of four species of *Arabidopsis* // *Z. Pflanzenphysiol.*—1978.—90, N 1.—P. 33—43.
 86. Nishibayashi S., Nayashi Y., Kyoizuka J., Shimamoto K. Chromosome variations in protoplast-derived calli and in plants regenerated from the calli of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) // *Jap. J. Genet.*—1989.—64, N 5.—P. 355—361.
 87. Кунах В. А., Алхимова Е. Г., Войтук Л. И. Изменчивость числа хромосом в каллусных тканях и регенерантах гороха // *Цитология и генетика*.—1984.—18, N 1.—С. 20—25.
 88. Савченко Е. К., Кунах В. А. Сравнительная характери-

- стика культуры тканей двух родственных линий кукурузы, различающихся по количеству гетерохроматина // Культура клеток растений и биотехнология.—М.: Наука, 1986.—С. 214—218.
89. 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.
 90. Sacristan M. D. Karyotypic changes in callus cultures from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* L. // Chromosoma.—1971.—33.—P. 373—283.
 91. Mozafari J., Wolyn D. J., Ali-Khan S. T. Chromosome doubling via tuber disk culture in dihaploid potato as determined by confocal microscopy // Plant Cell Repts.—1997.—16.—P. 229—333.
 92. Кунах В. А., Левенко В. А., Зосимович В. П. Культура *in vitro* тыльчиков *Nicotiana tabacum*. II. Цитогенетический анализ длительно пассируемой каллусной ткани, образовавшейся из тыльчиков // Цитология.—1978.—20, N 2.—С. 166—172.
 93. Smulders M. J. M., Rus-Kortekaas W., Gilissen L. J. W. Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants // Plant Sci.—1994.—97, N 1.—P. 53—60.
 94. Ho M., Stern H. Studies of meiosis *in vitro*. I. *In vitro* culture of meiotic cells // Develop. Biol.—1967.—16, N 1.—P. 36—53.
 95. Nehra N. S., Kartha K. K., Stushnoff C. Nuclear DNA content and isozyme variation in relation to morphogenic of strawberry (*Fragaria ananassa*) callus cultures // Can. J. Bot.—1991.—69, N 2.—P. 239—244.
 96. Губарь Е. К., Кунах В. А. Кариотипическая изменчивость культивируемых клеток скерды (*Crepis capillaris* L. Walbr.) // Генетика.—1992.—28, N 6.—С. 51—61.
 97. Кунах В. А. Особенности структурного мутагенеза в популяциях культивируемых клеток растений // Успехи совр. генетики.—М.: Наука, 1984.—Вып. 12.—С. 30—62.
 98. Toncelli F., Martini G., Giovino G., Nuti Ronchi V. Role of permanent dicentric systems in carrot somatic embryogenesis // Theor. and Appl. Genet.—1985.—70, N 4.—P. 345—348.
 99. Li Ruzhong, Stelly D. M., Trolinder N. L. Cytogenetic abnormalities in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cell cultures // Genome.—1989.—32, N 6.—P. 1128—1134.
 100. Ono K. Rice tissue cultures // Annu. Rept. Nat. Inst. Agrobiol. Res.—1985.—N 1.—P. 27—28.
 101. Kaneko K. Karyological studies on callus cells of *Haplorappus gracilis* // Kromosoma.—1974.—N 95.—P. 2943—2949.
 102. Kaneko K. Karyological studies in callus cells from stem, anther and ovule cultures of *Haplorappus gracilis* // Bull. Fukuoka Univ. Educ. Nat. Sci.—1975.—25.—P. 77—87.
 103. Ghosh P. K., Chatterjee A. *In vitro* induction and maintenance of epicotyl derived callus culture of jute (*Corchorus olitorius* L.) // Ind. Biol.—1990.—22, N 1.—P. 38—39.
 104. Черезанова Л. В., Мелик-Саркисов О. С., Овчинникова В. Н. Цитогенетический эффект сахаров // Генетика.—1991.—27, N 8.—С. 1372—1378.
 105. Pijnacker L. P., Ferwerda M. A. Effect of sucrose on polyploidization in early callus cultures of *Solanum tuberosum*. // Plant, Cell, Tissue and Organ Cult.—1990.—21, N 2.—P. 153—157.
 106. Martin T., Hellmann H., Schmidt R. et al. Identification of mutants in metabolically regulated gene expression // Plant J.—1997.—11, N 1.—P. 53—62.
 107. Inze D., Ferreira P., Hemeryk A., Montagu V. Control of cell division in plants // Biochem. and Trans.—1992.—20, N 1.—P. 80—84.
 108. Козы Е. И. Участие ауксинов в регуляции экспрессии генов бактерий и растений // Генетика.—1997.—33, N 5.—С. 565—576.
 109. Chriqui D., Bercetche J. Facteurs hormonaux et phénomènes amitotiques dans les explants végétaux cultivés *in vitro* // Bull. Soc. bot. Fr. Actual. bot.—1985.—132, N 3—4.—P. 152.
 110. Должелл Й., Новак Ф. Й. Кариологические изменения в ходе дедифференцировки клеток чеснока (*Allium sativum* L.) // Культура клеток растений и биотехнология.—М.: Наука, 1986.—С. 20—25.
 111. Jha S., Sen S. Induction of mitoses in polytene nuclei and hormonal effect on nuclear changes during callus initiation in diploid *Urginea indica* Kunth. (Liliaceae) // Genetica.—1990.—80, N 1.—P. 9—15.
 112. Giorgetti L., Pitto L., Tonelli M. G. et al. Auxin-induced formation of homeotic structures (anther- and pistil-like) in cultured explants of different plant species // Atti/Assoc. genet. ital.—1991.—37.—P. 201—202.
 113. Кунах В. А., Зосимович В. П. Влияние кинетина на уровень и типы аберраций хромосом в культуре тканей *Haplorappus gracilis* // Генетика.—1977.—13, N 8.—С. 1355—1365.
 114. Кунах В. А., Сидоренко П. Г., Зосимович В. П. Влияние кинетина на репродукцию клеток различной ploidy // Успехи полиплоидии.—К.: Наук. думка, 1977.—С. 203—215.
 115. Bennici A., Caffaro L. Karyological behavior during the first phases of de differentiation and habituation in *Nicotiana bigelovii* // Protoplasma.—1985.—124, N 1—2.—P. 130—136.
 116. Кунах В. А., Алпатова Л. К. Роль фитогормонов в изменчивости числа хромосом в культуре тканей *Haplorappus gracilis* // ДАН СССР.—1979.—245, N 4.—С. 967—970.
 117. Кунах В. А., Захленюк О. В. Диплоидизация культуры тканей растений с помощью 5-урацилил-тиоурейдоглюкозы (тиацила) // ДАН СССР.—1984.—279, N 5.—С. 1241—1244.
 118. Захленюк О. В., Алексеева И. В., Чернецкий В. П., Кунах В. А. Влияние кинетина и глиацидина на культуру тканей табака // Культура клеток растений и биотехнология.—М.: Наука, 1986.—С. 37—41.
 119. Захленюк О. В., Кунах В. А. Цитофизиологические и цитогенетические эффекты производных аденина в культуре тканей *Haplorappus gracilis* // Физиология растений.—1987.—34, N 3.—С. 584—594.
 120. Кунах В. А., Адонин В. И., Алпатова Л. К. и др. Цитогенетические последствия действия нативных и модифицированных тиофосфамидов РНК на культуру тканей *Haplorappus gracilis* // Цитология.—1985.—27, N 4.—С. 476—487.
 121. Павлова М. К., Тимохина Н. Т., Пивень М. М. та ін. Репродукція *in vitro* клітин *Beta vulgaris* L. при спланованих модифікаціях поживного середовища. 3. Аналіз ефективності компонентів середовища // Укр. бот. журн.—1977.—34, N 3.—С. 252—256.
 122. Cionini P. G., Bennici A., D'Amato F. Nuclear cytology of callus induction and development *in vitro*. I. Callus from *Vicia faba* cotyledons // Protoplasma.—1978.—96, N 1—2.—P. 101—112.
 123. Kinoshita I., Sanbe A., Yokomura E. I. Increases in nuclear DNA content without mitosis in benzyladenine-treated primary leaves of intact and decapitated bean plants // J. Exp. Bot.—1991.—42, N 238.—P. 667—672.
 124. Martins-Loucao M. A., Catarino F. M. Nuclear changes associated with callus induction in *Lobularia maritima* // Bot. Soc. broter.—1981.—53, pt 2.—P. 1211—1221.
 125. Rogers R. J., Hooymans-Klappe H. T. M., Libbenga K. R. The

- first cell cycle in explants from the mature root cortex of 7-day-old *Pisum sativum* // Plant Sci. Lett.—1976.—6, N 1.—P. 43—48.
126. Therman E., Murashige T. Polytene chromosomes in cultured pea roots (*Pisum*, Fabaceae) // Plant Syst. and Evol.—1984.—148, N 1—2.—P. 25—33.
127. Furner I. J., King J., Gamborg O. L. Plant regeneration from protoplasts isolated from a predominantly haploid suspension culture of *Datura innoxia* (Mill.) // Plant. Sci. Lett.—1978.—11 —P. 169—176.
128. Huang H.-C., Chen C.-C. Genome multiplication in cultured protoplasts of two *Nicotiana* species // J. Hered.—1988.—79, N 1.—P. 28—32.
129. Roquin C., Amssa M., Henry Y. et al. Origine des plantes polyploides obtenues par culture d'antheres. Analyse cytophotometrique *in situ* et *in vitro* des microspores de *Petunia* et de ble tendre // Z. Pflanzenzucht.—1982.—89, N 4.—P. 265—277.
130. Бабаева С. А., Петрова Т. Ф., Гапоненко А. К. Полиплоидия и полигения в культивируемых *in vitro* клетках злаков // Генетика.—1995.—31, N 5.—С. 678—683.
131. Wang S., Harg A., Tsuchiya T. Chromosome studies of callus tissues and regenerated plants from an unfertilized ovule culture of sugarbeet // J. Genet. and Breed.—1991.—45, N 3.—P. 161—168.
132. Cionini P. G., Bennici A., D'Amato F. Induzione della proliferazione cellulare in esplantati da cotiledoni di *Vicia faba* coltivati *in vitro*: analisi citologica e densitometria del DNA // G. bot. ital.—1978.—112, N 4.—P. 314—315.
133. Pousseas C., Bowes B. G. Ultrastructural observations on proliferating storage cells of mature cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. cultured *in vitro* // Ann. Bot.—1980.—46, N 2.—P. 143—152.
134. Caffaro L., Dameri R. M., Profumo P., Bennici A. Callus induction and plantlet regeneration in *Cichorium intybus* L.: 1. A cytological study // Protoplasma.—1982.—111, N 2.—P. 107—112.
135. D'Amato F., Bennici A., Cionini P. G. et al. Nuclear fragmentation followed by mitosis as mechanism for wide chromosome number variation in tissue cultures: its implications for plant regeneration // Plant Cell Cult.: Results and Perspectives.—Amsterdam etc., 1980.—P. 67—72.
136. Гапоненко А. К., Петрова Т. Ф., Искаков А. Р., Соzinov А. А. Cytogenetics of *in vitro* cultured somatic cells and regenerated plants of barley (*Hordeum vulgare* L.) // Theor. and Appl. Genet.—1988.—75, N 6.—P. 905—911.
137. Енукеев С. Г. О делении растительной клетки рубцеванием // Тр. Казан. с.-х. ин-та.—1967(1968).—Вып. 54 —С. 139—142.
138. Chen C. C., Kasha K. J., Marsolais A. Segmentation patterns and mechanisms of genome multiplication in cultured microspores of barley // Can. J. Genet. and Cytol.—1984.—26, N 4.—P. 475—483.
139. Gill B. S., Kam-Morgan L. N. W., Shepard J. F. Origin of chromosomal and phenotypic variation in potato protoclones // J. Hered.—1986.—77, N 1.—P. 13—16.
140. Dhillon S. S., Miksche J. P. DNA content and heterochromatin variations in various tissues of peanut (*Arachis hypogaea*) // Amer. J. Bot.—1982.—69, N 2.—P. 219—226.
141. Kasuga H. Cytological study on regeneration of cultured cells in *Angelica acutiloba* // J. Sci. Hiroshima Univ. 2B.—1990.—23, N 1.—P. 239—271.
142. Meijer E. G. M., Keller W. A., Simmonds D. H. Cytological abnormalities and aberrant microtubule organization during early divisions in mesophyll protoplast cultures of *Medicago sativa* and *Nicotiana tabacum* // Physiol. Plant.—1988.—74, N 2.—P. 233—239.
143. Thomas E., Bright S. W. J., Franklin J. et al. Variation amongst protoplast-derived potato plants (*Solanum tuberosum* cv. Maris Bard) // Theor. and Appl. Genet. 1982.—62, N 1.—P. 65—68.
144. Streenath H. L., Jagadishchandra K. S. *In vivo* and *in vitro* instability of B chromosomes in palmarosa grass (*Cymbopogon martinii* var. *motia*) // Genome.—1988.—30, N 6.—P. 966—973.
145. Ramulu K. S., Dijkhuis P., Roest S. Patterns of phenotypic and chromosome variation in plants derived from protoplast cultures of monohaploid, dihaploid and diploid genotypes and in somatic hybrids of potato // Plant Sci.—1989.—60, N 1.—P. 101—110.
146. Nuti Ronchi V., Giorgetti L., Tonelli M., Martini G. Ploidy reduction and genome segregation in cultured carrot cell lines. I. Prophase chromosome reduction // Plant Cell, Tissue and Organ Cult.—1992.—30, N 2.—P. 107—114.
147. Nuti Ronchi V., Giorgetti L., Tonelli M., Martini G. Ploidy reduction and genome segregation in cultured carrot cell lines. II. Somatic meiosis // Ibid.—P. 115—119.
148. Feher F., Tarczy H., Bocsa J., Dudits D. Somaclonal chromosome variation in tetraploid alfalfa // Plant. Sci.—1989.—60, N 1.—P. 91—99.
149. 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.
150. Кацмадзе К. П. Локализация и интенсивность синтеза нуклеиновых кислот в клетках изолированной меристемы стеблевых апексов вегетирующих растений томатов // Изв. АН Груз. ССР. Сер. биол.—1978.—4, N 3.—С. 260—267.
151. Kovacs E. J. Regulation of karyotype stability in tobacco tissue cultures of normal and tumorous genotypes // Theor. and Appl. Genet.—1985.—70, N 5.—P. 548—554.
152. Оленов Ю. М. Клеточная наследственность, дифференцировка клеток и канцерогенез как проблемы эволюционной генетики.—Л.: Наука, 1967.—310 с.
153. Макнайт Т. Д., Финцджеральд М. С., Шиппен Д. Е. Теломеры и теломераза растений // Биохимия.—1997.—62, № 11.—С. 1432—1441.

Поступила в редакцию 02.04.98