

УДК 001.92+575+ 575.2+576.312.32:581.143

ГЕНЕТИКА КЛІТИННИХ ПОПУЛЯЦІЙ: ЗАПОЧАТКУВАННЯ, ГОЛОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ТА ПОЛОЖЕННЯ (ДО 50-РІЧЧЯ ВІД ЧАСУ ЗАСНУВАННЯ)

В. А. КУНАХ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
 Україна, 03143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150
 e-mail: kunakh@imb.org.ua

У статті коротко розглянуто започаткування і розвиток в Україні нового наукового напрямку — генетики клітинних популяцій, яка є теоретичною основою сучасних клітинних технологій. Це, зокрема, рослинні біотехнології оздоровлення, збереження і прискореного розмноження унікальних генотипів in vitro; створення нових генотипів (організмів) методами клітинної і генної інженерії та клітинної селекції; отримання біологічно активних речовин, у тому числі рекомбінантних, із біомаси культивованих клітин і тканин для потреб медицини, косметичної та харчової промисловостей; а також методи клітинної терапії, у тому числі і технології, що ґрунтуються на використанні стовбурових клітин тощо. Культивовані клітини широко використовують і як модельні об'єкти та біологічні системи для вивчення найактуальніших проблем сучасної біології: особливостей перебігу, сигнальних шляхів і механізмів клітинної проліферації, у тому числі онкогенезу і пухлинної проліферації; дедиференціювання клітин, у тому числі їх перехід до стану стовбуровості; тотипотентності, плюрипотентності і омніпотентності; регенерації тканин, окремих органів і цілісних організмів та ін. Розглянуто наукові передумови розвитку нового напрямку, наведено основні положення генетики клітинних популяцій, розроблені, переважно, у Відділі генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Проаналізовано особливості розвитку новітніх напрямів генетики соматичних клітин інтактних рослин та клітин в культурі in vitro, генетики клітинних популяцій, генетичних основ клітинної селекції, клітинної біології і біотехнології протягом другої половини минулого та початку нинішнього століття.

Ключові слова: історія науки, генетика клітинних популяцій, культура тканин і клітин рослин, клітинна селекція, біотехнологія рослин.

П'ятдесят років тому назад, а саме 22–26 січня 1968 р. у Москві у приміщенні Головного ботанічного саду АН СРСР (тепер — Російська Федерація) відбулася «I Все-союзная конференция по культуре изолированных органов, тканей и клеток растений». Конференцію було організовано Радою по фізіології і біохімії рослин та Інститутом фізіології рослин АН СРСР. У роботі конференції взяли участь близько 100 осіб — практично всі вчені СРСР, які працювали у цій галузі, а також низка зарубіжних спеціалістів. (Інформацію про перебіг конференції та короткий аналіз наукових доповідей викладено в статті [1]).

У другій половині дня 23 січня 1968 р. у рамках цієї конференції працювала секція «Цитогенетика культуры тканей», на якій було заслухано 7 доповідей (рис. 1).

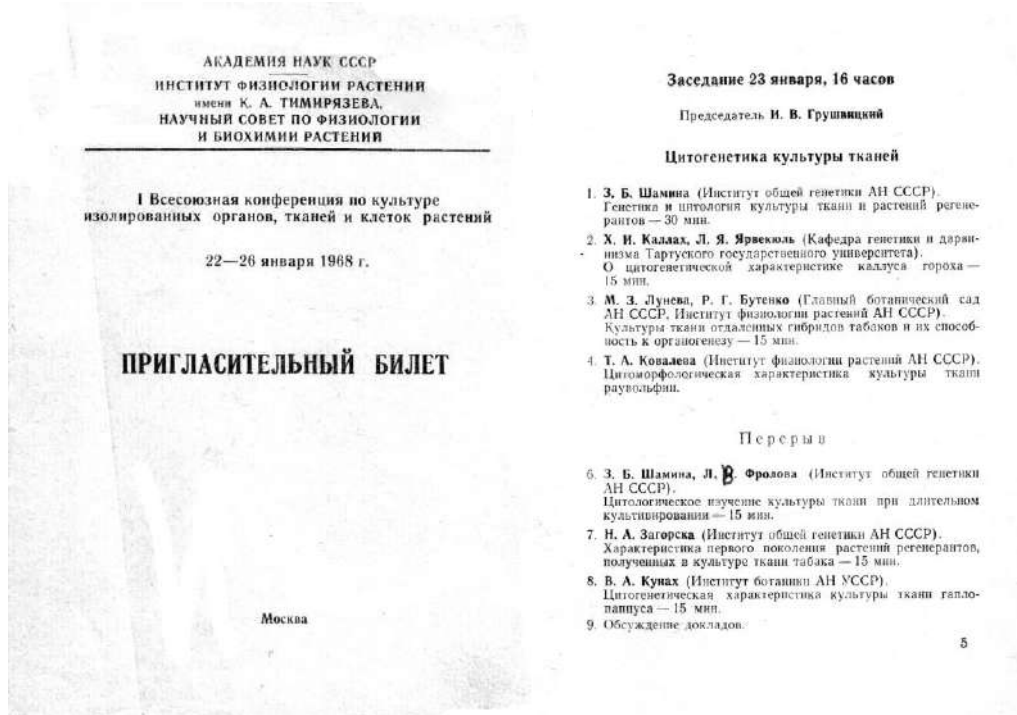


Рис. 1. Титульна сторінка запрошення на «I Всесоюзную конференцию по культуре изолированных органов, тканей и клеток растений» (Москва, 22–26 січня 1968 р.) та програма засідання секції «Цитогенетика культуры тканей» 23 січня 1968 р., на якій вперше представлено результати цитогенетичного вивчення культури тканин рослин.

Результати власних експериментальних досліджень хромосомної мінливості культивованих клітин представили Х. І. Каллак і Л. Я. Ярвекюль (кафедра генетики і дарвінізму Тартуського державного університету, Естонія) «О цитогенетической характеристике каллуса гороха»; Т. А. Ковалева (Институт физиологии растений АН СРСР, Москва) «Цитоморфологическая характеристика культуры ткани раувольфии»; З. Б. Шаміна і Л. В. Фролова (Институт загальної генетики АН СРСР, Москва) «Цитологическое изучение культуры ткани при длительном культивировании»; В. А. Кунах (Институт ботаники АН УРСР, Київ) «Цитогенетическая характеристика культуры ткани гаплопаппуса». Коротко деякі дані хромосомної мінливості в культурі тканин тютюну, отримані В. А. Кунахом і П. Г. Сидоренком, були представлені наступного дня у доповіді П. Г. Сидоренка (Институт ботаники АН УРСР, Київ) «О некоторых аспектах цитологических исследований в культуре тканей растений». Це були результати досліджень, якими, на мою думку, було започатковано новий науковий напрям в СРСР — генетика соматич-

них клітин рослин *in vitro*. Дещо пізніше, у міру ширшого залучення до досліджень культивованих клітин спеціалістів-генетиків, накопичення нових експериментальних даних та їх комплексного аналізу під різними кутами, перш за все — з генетичної точки зору, виокремився і такий новітній науковий напрям як генетика клітинних популяцій рослин. Останній був започаткований одночасно моїми дослідженнями, проведеними спільно з П. Г. Сидоренком у Києві в Інституті ботаники АН УРСР, а також дослідженнями З. Б. Шаміної і Л. В. Фролової у Москві в Інституті загальної генетики АН СРСР [2, 3].

Повноцінно ж генетику клітинних популяцій рослин як новий науковий напрям було «задокументовано» в СРСР на Першому Всесоюзному симпозиумі «Генетика и адаптация клеточных популяций», що відбувся у Ленінграді (тепер — Санкт-Петербурзі, Росія) 27–30 травня 1975 р. Тут уже вільно оперували термінами і поняттями, що стосуються генетики і еволюції клітинних популяцій соматичних клітин як людини і тварин, так і рослин (рис. 2).

АКАДЕМИЯ НАУК ССРСР
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ПРОБЛЕМАМ ЦИТОЛОГИИ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ

ПРОГРАММА
ВСЕСОЮЗНОГО СИМПОЗИУМА
«ГЕНЕТИКА И АДАПТАЦИЯ
КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ»

(Ленинград, 27—30 мая 1975 г.)

Ленинград · 1975

В. А. Шуклинов (Киев). О роли гигантских клеток в популяции трансформированных культур. 10 мин.

С. Г. Ворсанова и К. Н. Гримберг (Москва). Динамика изменений популяции фибробластов человека при длительном культивировании в стационарной фазе. 10 мин.

Т. А. Лежава и Е. В. Хмаладзе (Тбилиси). Анализ кариотипов у людей в возрасте 80—114 лет. 10 мин.

Обсуждение докладов

Вторник, 27 мая
15.00—19.00

НАСЛЕДСТВЕННАЯ СТРУКТУРА
КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

В. С. Шапот (Москва). О происхождении эмбриональных черт опухолевых клеток и механизмах, определяющих их фенотип. 20 мин.

И. И. Шекберггер (Ленинград). Эпигенетическая структура клеточных популяций. 20 мин.

Г. Д. Туманишвили, К. М. Джандиери, П. В. Челидзе, И. Г. Кахидзе и М. И. Иобадзе (Тбилиси). Возможные структурные основы «кооперативного» поведения клеток в популяции. 20 мин.

Л. Л. Миронова, Н. Е. Гольдрин, В. Я. Кармышева, Л. А. Крайнова, В. П. Грачев и М. Ш. Чумаков (Москва). Диплоидные культуры клеток человека и животных. 10 мин.

Б. А. Левенко, В. А. Кунах, Г. Н. Юркова и В. П. Зосимович (Киев). Формирование популяций клеток растений в условиях изолированной культуры. 10 мин.

Перерыв

1*

3

Среда, 28 мая
10.00—14.00

ОТБОР В КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ

И. В. Тимофеев-Ресовский (Обнинск). Вступительное слово. 30 мин.

Г. П. Лобко и Г. В. Красковский (Минск). Изучение механизма генетической адаптации популяций опухолевых клеток к антителам опухоленосителя. 30 мин.

И. А. Бедров и Ю. Б. Вахтин (Ленинград). Генетическое равновесие в клеточных популяциях при асимметричной кариотипической изменчивости. 15 мин.

И. П. Галинских и Ф. Я. Зусман (Свердловск). Анализ адаптационных механизмов первичных клеток, восстановивших после длительного хранения при температуре жидкого азота (—196°). 10 мин.

С. Т. Каранова и Э. Б. Шакина (Москва). Изменчивость и отбор в клеточных популяциях *Dioscorea deltoidea* Wall in vitro. 10 мин.

В. А. Кунах (Киев). Некоторые особенности адаптации клеточных популяций растений к условиям роста in vitro. 10 мин.

Перерыв

Л. С. Саломон (Москва). Некоторые феномены экспериментального канцерогенеза и клеточный отбор. 10 мин.

И. П. Земелькова (Казань). К вопросу о реактивации опухолевых клеток под влиянием антибластных веществ. 10 мин.

Э. Л. Нейштадт и Э. У. Гнилевская (Ленинград). Динамика хромосомных аберраций в опухолевых клетках в процессе химиотерапии больных злокачественными новообразованиями. 10 мин.

5

Рис. 2. Сторінки програми Всесоюзного симпозиуму «Генетика и адаптация клеточных популяций» (Ленинград, 27—30 травня 1975 р.), на якій вперше культуру тканин рослин представлено як клітинну популяцію.

Нові наукові напрями не виникають «на голому місці». Так і у нашому випадку. На середину 1960-х — початок 1970-х рр. низкою дослідників, переважно закордонних, було встановлено, що однією з особливостей культури тканин рослин є їх висока хромосомна нестабіль-

ність, почалось вивчення можливих причин і механізмів цієї мінливості. Коротко розглянемо результати деяких з цих досліджень та висловлені припущення стосовно геномної (хромосомної) мінливості культивованих *in vitro* тканин рослин.

Результати вивчення цитогенетичної мінливості у культурі ізольованих тканин і клітин рослин, отримані до середини 1970-х рр

Одним із засновників методу культури ізольованих тканин рослин вважається французький дослідник Р. Готре (R. Gautheret). Він провів перші цитологічні спостереження культивованих *in vitro* рослинних тканин. Дані, отримані автором у 1935 р., засвідчили, що в культурі тканин бузини та клену мають місце нормальні диплоїдні мітози. При вивченні культури тканин веймутової сосни *Pinus strobus* Р. Готре виявив, що дрібні меристематичні клітини є диплоїдними, в них відбуваються нормальні мітози, тоді як великі клітини були тетраплоїдними, рідше — анеуплоїдними і мали порушення мітозу [4, 5].

Подальші дослідження показали, що характерними для клітин та тканин рослин, культивованих в ізольованих умовах, є багатоядерні клітини та порушення мітозу [6–8]. Були виявлені диплоїдні та поліплоїдні клітини і в культурі, отриманій із гаплоїдних тканин і клітин [9, 10]. Встановлено, що поліплоїдизація тканин відбувається і за випадків, коли вихідний матеріал є поліплоїдним. Це показано на прикладі культури тканини ендосперму кукурудзи [11], у якій відмічено також редукцію числа хромосом аж до гаплоїдного рівня.

Початок 1960-х рр. характеризується швидким збільшенням кількості робіт з цитологічного та цитогенетичного вивчення культури тканин і клітин рослин. Це сталося внаслідок удосконалення методу і отримання на його основі значних результатів, зростання інтересу до культури тканин як модельного об'єкту для вирішення загальнобіологічних проблем, зокрема для вивчення механізмів диференціювання-дедиференціювання, неорганізованого росту тощо, а також у зв'язку з появою перспективи застосування культури тканин рослин у господарських цілях, зокрема як джерела цінних біологічно активних речовин, важливих для медицини, для мікроклонального розмноження і оздоровлення рослин від вірусної інфекції, отримання нових форм рослин тощо. У найвідоміших дослідженнях цього періоду встановлено значні цитологічні порушення в клітинах культури тканин, показана її генетична нестабільність.

Зміна числа хромосом. Уже на кінець 1960-х рр. стало відомо, що для культури тканин рослин характерним явищем є її міксоплої-

дність (наявність клітин різної плоїдності) за значного переважання поліплоїдних клітин. К. Партанен (С. Partanen), аналізуючи мінливість числа хромосом в рослинних тканинах різного походження, припустив, що в клітинах, які давно культивуються в ізольованих умовах, поліплоїдія виникає в результаті ендомітозу або відсутності цитокінезу [12, 13]. Ф. Стюард із співавторами (F. C. Steward et al., 1960) встановили, що в клітинах культури тканин моркви поряд з поліплоїдними зустрічаються і гаплоїдні клітини [14]. Подібні результати було отримано на культурах тканин, отриманих із кореня і сім'ядоль гороху [15–19]. Автори спостерігали поліплоїдні клітини з числом хромосом до $8n$ і більше вже в первинному калюсі. Було висловлено припущення, що в ізольованих тканинах поліплоїдний стан більше відповідає умовам культивування, ніж диплоїдний [19].

Ширший спектр мінливості встановлено подальшими дослідженнями на культурі тканин стебла гаглопаппусу *Haplopappus gracilis* ($2n=4$). Зокрема, Дж. Мітра і Ф. Стюард (J. Mitra, F. C. Steward, 1961) описали гігантські багатоядерні клітини, які ділилися внутрішнім сегментуванням; поліплоїдію, що іноді досягала $32n$; соматичну кон'югацію хромосом; гаплоїдію (як вважають автори, гаплоїдні клітини виникли внаслідок редукції числа хромосом, що відбулася в результаті соматичної кон'югації); псевдохіази та соматичний кросинговер; хроматидні мости та фрагментацію хромосом; відсутність цитокінезу після нормального каріокінезу, внаслідок чого утворилися гігантські багатоядерні клітини; зміну морфології хромосом [20].

На прикладі дворічної культури тканин кінських бобів відмічено укорочення хромосом порівняно з такими в організмі, виявлено також виникнення поліплоїдних, в тому числі анеуплоїдних ядер, встановлено сегрегацію хромосом [21]. Явище сегрегації хромосом спостерігали також в культурі тканин тютюну *Nicotiana tabacum* [22]. Цей штам був міксоплоїдним із значною частотою гаплоїдних та клітин з біягаплоїдним числом хромосом (число хромосом варіювало від 30 до 50 при $2n=48$).

Низка спеціальних досліджень культури тканин тютюну *N. tabacum* засвідчила, що ця культура є зазвичай цитогенетично нестабільною, для неї характерною є міксоплоїдія з переважанням анеуплоїдних клітин, високий рівень мінливості як числа хромосом, так і їх структурних перебудов, а також генної мінливості («точ-

кових мутацій») [23–33]. На думку Г. Мельхерса (G. Melchers, 1965), це створює багату основу для добору нових генетичних форм серед регенерантів, отриманих з культури тканин. Посилення генетичної мінливості клітин культури тканин автор пояснює іншими умовами їх розвитку порівняно з цілісним організмом. Зазвичай ця мінливість збільшується з віком культури. За тривалого культивування деякі штами тютюну перероджуються в пухлинні внаслідок набуття культурами здатності до автономного росту за відсутності ауксинів. Аналіз одного з таких 20-річних штамів показав, що число хромосом в ньому, як і в індукованому бактеріями пухлинному штамі, варіювало від 65 до 82 [26].

Встановлено зміни числа хромосом у культивованих клітинах як у послідовних пасажах, так і протягом пасажу. Наприклад, у дослідях японських дослідників Т. Шімада і М. Табата (T. Shimada and M. Tabata, 1967) у клітинах тютюну число хромосом у перших після індукції калюсоутворення метафазах варіювало від 40 до 215 при $2n=48$. Ди- і тетраплоїдні клітини склали 12,5 та 17,5 % вивчених клітин відповідно, а клітини вищого рівня плоїдності склали близько 50 %. Другий мітоз відмічали через 1–2 доби після першого. Частина клітин, що містили понад 100 хромосом, знижувалася у другому мітозі вдвічі (до 22,7 %). Культивована в подальшому тканина складалася на 70 % з клітин з числом хромосом від 77 до 96 [30].

В інших дослідях було показано, що започатковують культуру тканин диплоїдні клітини. Зокрема, цитоспектрофотометричне вивчення перших етапів калюсоутворення на прикладі земляної груші (топінамбура) *Helianthus tuberosum* показало, що вміст ДНК в клітинах перед початком проліферації є близьким до $4C$ [34]. Подібні результати отримано також на культурі тканин плоду лимона. Первинний калюс цієї культури був на 100 % диплоїдним, після першого пасажу частота диплоїдних клітин зменшилася до 70 %, після двох-трьох — до 60 % і після чотирьох — до 30 %. Після року культивування всі клітини були поліплоїдними, серед яких найчастіше зустрічалися тетраплоїдні, іноді й октаплоїдні клітини [35]. Подібні зміни плоїдності клітин, що діляться, встановлено і для культури тканин гороху [36].

У скереди волосистої *S. capillaris* за довготривалого культивування вся сукупність одержаних калюсів незалежно від тканинного походження та умов культивування спонтанно роз-

поділилася на три групи: диплоїдні, триплоїдні та тетраплоїдні штами. Автори припустили, що зміни в плоїдності калюсної тканини відбулися за рахунок внутрішньотканинного добору [37].

Штами, що різнилися за морфологічними та цитологічними ознаками, були виділені також із культури тканин гороху [18], гаглопаппусу [38], традесканції [39].

З. Шаміна і Л. Фролова дослідили три штами, отримані з точки росту (апикальна стеблова меристема), ділянок стебла та кореня гаглопаппусу. За тривалого культивування для всіх варіантів встановлено збільшення кількості поліплоїдних клітин не тільки протягом низки пасажів, а й у процесі росту тканин протягом одного пасажу. В перших пасажах темпи поліплоїдизації залежали від походження калюсу. Зокрема, поліплоїдизація калюсної тканини, одержаної із точки росту, проходила повільніше в порівнянні з калюсами іншого походження. У подальшому відсоток поліплоїдних клітин зрівнювався [40].

У наших дослідях з гаглопаппусом *H. gracilis* було встановлено, що за тривалого пасивування сформованого штаму культури тканин спостерігається у постійних умовах середовища відносна збалансованість гетероплоїдної популяції, що складається з різних клітин — від гаплоїдних до клітин високої плоїдності. Ми висловили припущення про встановлення в популяції культури тканин гаглопаппусу за тривалого пасивування динамічної рівноваги клітин з різним набором хромосом [41, 42]. За отримання культури тканин гаглопаппусу з різних вихідних експлантів на повністю синтетичному живильному середовищі було встановлено, що штами листового походження протягом 10 пасажів залишалися бути диплоїдними, а штам стеблового походження вже через 8 пасажів (280 днів культивування) став на 84–91 % поліплоїдним з переважанням тетраплоїдних клітин (50–61 %) [43]. За результатами детальнішого дослідження ми зробили висновок про значний вплив складу живильного середовища і походження вихідного матеріалу на цитогенетичну характеристику популяцій клітин у культурі *in vitro* [44]. За порівняльного вивчення особливостей формування пасивованих культур тканин гаглопаппусу і крєпіса у процесі становлення клітинних штамів було виявлено період, що характеризується низкою особливостей: зниженням темпа росту калюсу, кількості клітин з абераціями хромосом, інколи змінами плоїдності калюсу, появою клітин різних генотипів, а також морфологічних відмінностей між штаммами. Тривав цей пері-

од близько 100 днів (протягом трьох-чотирьох пасажів), який пізніше був названий нами періодом становлення штамму [45]. (Хочу підкреслити, що саме в цих, процитованих вище роботах, ми вперше почали розглядати культуру тканин рослин як клітинну популяцію, застосовувати відповідну генетико-популяційну термінологію, виявили, що еволюція генетичної структури клітинних популяцій відбувається у результаті зміни типу (напряму) й інтенсивності дії клітинного добору. У подальших роботах ми уточнювали, поглиблювали і розширювали як термінологію, так і основні положення цього нового напряму — генетика клітинних популяцій — див. далі).

Вивчаючи можливі механізми появи поліплоїдних клітин (мітозів), дослідники схилилися до думки про значну роль ендомітозу в поліплоїдизації культури тканин. Зокрема, в дослідках з суспензійною культурою чорнушки посівної *Nigella sativa*, окрім анеуплоїдних і поліплоїдних клітин, частка яких поступово зростала, відмічали подвоєння числа хроматид у 1,5–2 % клітин [46]. Поліплоїдизацію культивованих тканин яблуні А. Равкін та Ю. Попов також пояснювали наявністю ендомітозу. Підвищення числа тетра- та октаплоїдних клітин автори пов'язують з присутністю повного ендомітозу. На їхню думку, клітини з числом хромосом 6, 7, 9 та 19n є результатом часткового ендомітозу, нерівномірного розходження хромосом до полюсів і утворення кількох полюсів. Останні два феномени залучаються також для пояснення факту зменшення числа хромосом в деяких клітинах порівняно з вихідною тканиною [47].

Цікавими є дослідження, де автори проводили цитогенетичний аналіз культур тканин, отриманих від рослин з набором хромосом, що відрізнявся від диплоїдного. У цьому випадку також показана поліплоїдизація калюсів, отриманих як від диплоїдних, так і від поліплоїдних рослин [47–49]. Мінливість числа хромосом відмічали також за вивчення культури тканин із ендосперму, клітини якого є початково триплоїдними [11, 50], із нормальної та пухлинної тканини [51]. Встановлено поліплоїдизацію тканин, отриманих від гаплоїдних рослин, а також з пилку і тканин пиляка диплоїдних рослин [9, 10, 52–56].

Таким чином, до середини 1970-х рр. було встановлено, що більшість калюсних тканин в ізолюваних умовах є міксоплоїдними, вони складаються частіше з поліплоїдних клітин, є цитогенетично не стабільними. Причиною поліплоїдизації вважали індукцію поділів диференційованих

клітин вихідного експланту, які можуть бути поліплоїдними, наявність ендомітозів у клітинах культури, селективну дію та поліплоїдизувальний ефект деяких компонентів живильного середовища тощо. Домінувала думка, що генетична стабільність культивованих тканин — досить рідкісне явище. За деякими даними стабільність калюсних тканин, що подеколи спостерігалася, зумовлена елімінацією поліплоїдних клітин, утворених при культивуванні. Характерною в цьому відношенні є робота Т. Ямада із співавторами, виконана на культурі тканин *Tradescantia paludosa*. Поряд з диплоїдними, автори зрідка спостерігали гігантські поліплоїдні клітини з гантелевидними ядрами (з числом хромосом до 10n), які виникли шляхом ендомітозу і ділилися рідко. Втративши здатність до поділів, ці клітини гинули, тоді як кількість диплоїдних клітин збільшувалася [39]. За даними І. Марьяхиної і Р. Бутенко (1974) у вихідному поліплоїдному калюсі капусти за його культивування відбувається сегрегація хромосом і, можливо, соматична кон'югація, що приводить до диплоїдизації цієї культури [57]. У цілому ж, у цей період багатьма дослідженнями, у тому числі й нашими, було встановлено, що у процесі формування калюсних і суспензійних культур, здатних до тривалого пасивування може відбуватися дивергенція, а інколи і конвергенція клітинних штамів за рівнем їхньої плоїдності, а сформовані штами є гетерогенними за числом хромосом і ця гетерогенність є динамічно стабільною (див. [41–45]).

У нашій підсумковій роботі 1974 р. наведено і обговорено результати багаторічного вивчення плоїдного складу клітинних популяцій у процесі формування і тривалого пасивування штамів культури тканин гаглопаппусу, скереді і тютюну [58]. Ми підтвердили значну залежність плоїдності калюсів від вихідного матеріалу (виду рослини та тканинної приналежності первинного експланту), складу живильного середовища, наявності і концентрації у середовищі кінетину. Вперше показали провідне значення клітинного добору у формуванні основних ознак штамму культивованих тканин рослин, у тому числі й плоїдного складу клітинної популяції. Завершений вигляд ці та інші дані, що лягли в основу генетичної теорії клітинних популяцій рослин, викладено в моїй кандидатській дисертації [59].

Рівень та типи аберацій хромосом. У культивованих клітинах рослин стрічаються і структурні перебудови хромосом. Але в більшості тогочасних публікацій або взагалі не було приведено цифрових даних, або не було ре-

зультатів вивчення якісної сторони цього явища. Проте відомо й кілька робіт, в яких ці дані представлено.

Показовим є дослідження З. Шаміної із співавторами (1966), проведене на культурі тканин тютюну. Отримана авторами культура характеризувалася не тільки високою мінливістю числа хромосом, а й надзвичайно високим рівнем їх структурної мінливості: знайдено 66,8 % аберацій ана- та телофаз. Оскільки серед аберацій більшість складала мости без фрагментів (87 % від числа аберацій анафаз), автори припустили, що це може бути результатом циклу мостів розрив-злиття-міст [28]. Проведене незалежно і майже одночасно наше вивчення рівня, типів і походження аберацій хромосом на прикладі культури тканин тютюну, гаплопаппусу і крєпісу показали, що сформованим штамам цих культур властивим є постійний рівень і спектр аберацій хромосом. Для штамів гаплопаппусу і крєпісу характерним є значно нижчий рівень ушкоджених клітин і ступінь їхнього враження, ніж для культури тканин тютюну. Зокрема, вибірка з 25 штамів гаплопаппусу характеризувалась широким розмахом мінливості за частотою анафаз з пошкодженнями хромосом — 0,7–11,7 %, для крєпісу виявився характерним низький рівень анафазних аберацій хромосом (0,6–1 %), а для тютюну — високі (майже 64 %). 2/3 цих аберацій — результат їхнього переживання з мітозу у мітоз за допомогою циклу розрив — злиття — міст. У результаті побудови схеми виникнення і переживання аберацій хромосом і проведених на її основі розрахунків встановлено, що у більшості штамів вивчених культур число репродукцій ушкоджених клітин (клітин з «ушкодженими» хромосомами) середньому дорівнює 3, а у диплоїдних штамів гаплопаппусу — 2. Також ми виявили зв'язок між числом хромосом у клітині, ступенем її плідності і рівнем і спектром аберацій хромосом. При цьому спектр аберацій залежить від співвідношення «свіжих» і «тих, що переживають» перебудов хромосом [60]. Пізніше, у збірнику «Успехи современной генетики» (Н. П. Дубинин (ответств. ред.), М., Наука, 1984, Вып. № 12), я опублікував підсумкову роботу «Особенности структурного мутагенеза в популяциях культивируемых клеток растений», у якій було підтверджено і поглиблено основні положення наведеної вище роботи [61].

Подібний розподіл пошкоджених анафаз за типами аберацій було встановлено і для інших

калюсних штамів тютюну, отриманих від диплоїдної і від поліплоїдної рослини [48]. Переважання анафаз з мостами над іншими абераціями виявлено також в культурі ендосперму кукурудзи, де загальна частота пошкоджень дорівнювала 30 % [11], в культурі тканин моркви [14], в культурі чорнушки посівної *N. sativa*, де кількість анафаз з порушеннями коливалася від 2,5 до 10 % [46]. Отримано дані, що в культурі тканин гороху частота клітин з абераціями хромосом наближається до 10 % [18], а у гаплопаппусу дорівнює 6–8 % у різних штамів [41, 62]. Показано, що в процесі культивування штамів гаплопаппусу рівень аберацій може знижуватися від 5–6 % в першому пасажі до 0,5–2,5 % в наступних [40, 45]. Низьким рівнем структурної мінливості хромосом характеризувалася культура тканин раувольфії зміїної, рівень анафазних аберацій якої дорівнював 0,56 % [63, 64], культура тканин скереди [65], а також культури тканин деяких інших видів рослин (посилання див. у цитованих вище роботах).

Таким чином, відомі на той час порівняно нечисленні літературні дані засвідчували, що культура рослинних тканин *in vitro* характеризується, як правило, досить високою мінливістю не тільки числа, а й структури хромосом. Це іноді призводить до зміни структури каріотипу культивованих клітин в результаті, на думку деяких дослідників, підвищеної життєздатності клітин з деякими перебудовами числа і структури хромосом [20, 30, 65, 66].

Вплив умов культивування на хромосомну мінливість *in vitro*. Спостерігаючи високу мінливість числа і структури хромосом в культивованих клітинах рослин, дослідники пояснювали це іншими умовами їх життєдіяльності порівняно з такими в інтактному організмі, впливом компонентів середовища, стимуляцією до поділу диференційованих клітин, які часто є поліплоїдними тощо. Дж. Торрі (J. Torrey) із співавторами, використовуючи середовища різного складу для отримання культури тканин переважно гороху, проаналізувавши хромосомні числа цих калюсів, встановив наступне: на живильних середовищах, які містять як стимулятор росту кінетин, тетраплоїдні клітини зустрічалися частіше, а швидкість поліплоїдизації калюсів була вищою [15–17]. Оскільки вже було відомо, що диференційовані клітини рослини, як правило, є поліплоїдними (це було підтверджено багатьма дослідниками, див., зокрема, монографію [67, розділ 4]), Дж. Торрі припустив, що кінетин є речовиною, яка вибірко-

во стимулює поділ тетраплоїдних клітин експлантів кореня гороху [17]. У подальшому цей феномен підтвердився настільки, що його застосували для отримання поліплоїдних клітинних популяцій, для післяобробки пагонів, оброблених колхіцином й іншими поліплоїдогенами, що дає значно вищий вихід тетраплоїдних клітин і органів тощо. (Ці дані було підтверджено і в наших подальших дослідках з цілою низкою поліплоїдогенів та ауксинів і цитокінінів, див. [67], розділ 9). Пізніше було встановлено, що кінетин у концентрації вище 0,01 мг/л в поєднанні з ауксином викликав у випадку впливу на диплоїдні клітини два цикли реплікації хромосом, внаслідок чого з'являлися тетраплоїдні клітини, а за впливу на тетраплоїдні клітини вони ділилися без додаткової ендоредуплікації. Потім кількість тетраплоїдних мітозів зменшувалась і збільшувалось число октаплоїдних. Через п'ять днів частота диплоїдних клітин складала менше 10 % [68, 69].

На культурі тканин кореня гаглопаппусу було встановлено, що на живильному середовищі з кокосовим молоком поліплоїдні клітини зустрічалися частіше, ніж на повністю синтетичному [70]. Це було підтверджено і на інших об'єктах, зокрема на моркві [14]. За вивчення впливу нуклеїнових кислот та їх солей на культуру тканин кінських бобів теж виявлено різні порушення, самим суттєвим з яких була, на відміну від контролю, сегрегація хромосом. Автори вважають, що цей феномен призводить до редукції числа хромосом і схиляються до думки, що редукційні групи, соматична кон'югація хромосом і, як один з наслідків цих процесів, гаплоїдія, є результатом впливу надлишку нуклеїнових кислот і продуктів їх гідролізу [71]. Нуклеїнові кислоти і продукти їх розпаду можуть вноситися в живильне середовище з кокосовим молоком, дріжджовим екстрактом і іншими подібними добавками. Також припускалося, що до активного начала таких добавок, як дріжджовий екстракт, кокосове молоко тощо, входить кінетин або кінетиноподібні речовини [70, 72]. Було зроблено висновок про те, що лише на хімічно певному середовищі можна отримати і вирощувати стабільну диплоїдну культуру тканин.

Вплив стимулятора росту 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д), на темп поліплоїдизації було вивчено в роботах З. Шаміної і Л. Фролової. На прикладі калюсних культур, отриманих з різних органів гаглопаппусу показано, що на середовищах, які містять 2,4-Д, відбувається швидша поліплоїдизація порівняно з

тканиною, що росте на середовищі з іншим ауксином — нафтилоцтовою кислотою (НОК) [40]. У дослідках з горохом також було встановлено, що 2,4-Д у різних дозах (0,25–20 мг/л) сприяє поліплоїдизації калюсних культур [73].

Вивчення впливу різного співвідношення кінетину та НОК на плоїдність культури тканин гаглопаппусу провели італійські дослідники [74]. Вони вивчали отриманий із насіння калюс. Після 4 пасажів калюс був розділений на 5 частин, кожна з яких вирощувалася на середовищах з різним співвідношенням кінетину та НОК. Вивчення хромосом проводили протягом 360 діб (18 пасажів). Було встановлено, що поліплоїдизація калюсу залежить від співвідношення кінетину та ауксину. Зокрема, наприкінці досліду з 0,02 мг/л кінетину та 1 мг/л НОК у калюсній тканині спостерігали 100 % поліплоїдних мітозів. Найнижча частота поліплоїдних метафаз виявлена на середовищі з 0,02 мг/л кінетину та 4 мг/л НОК (19,4 %). Більшість поліплоїдних клітин складали тетраплоїдні. Відносна кількість тетраплоїдних мітозів збільшувалася у початковий період культури до шостого пасажу. На середовищах з 1 мг/л кінетину та 1 мг/л НОК і 0,02 мг/л кінетину та 4 мг/л НОК зустрічалися також октаплоїдні клітини, їх було 5,4 % від числа поліплоїдних. На середовищах з 0,02 мг/л кінетину та 2 мг/л НОК і 0,02 мг/л кінетину та 1 мг/л НОК рівень октаплоїдних мітозів сягав 35,9 і 44,4 % відповідно. На двох останніх середовищах зустрічалися клітини 16n і більш високих рівнів плоїдності. Автори дійшли висновку, що поліплоїдні мітози утворюються в результаті індукції в ендополіплоїдних ядрах, які вже є в культурі.

Становить інтерес робота, виконана на культурі тканин зародка півонії, яку вирощували паралельно на твердому та рідкому живильних середовищах. Протягом 153 днів вивчення автори не спостерігали анеуплоїдних клітин, змін морфології хромосом і таких явищ як соматична кон'югація, мости чи фрагменти. Протягом перших трьох місяців культивування популяція була стабільною відносно числа хромосом — переважна кількість мітозів була диплоїдною, зрідка зустрічалися тетраплоїдні клітини. Число останніх було трохи вищим у рідкому середовищі, на 84 день число тетраплоїдних клітин було однаковим на обох середовищах. Починаючи з 84 доби співвідношення між диплоїдними та тетраплоїдними клітинами коливалося в межах 30 і 65 %, кількість октаплоїдних клітин, які з'являлися у рідкому середовищі на 41 добу,

а на твердому — на 112 добу росту, корелювало з числом тетраплоїдних. Подальше почергове превалювання диплоїдних і поліплоїдних клітин авторів пояснювали клітинним доборою і впливом продуктів метаболізму клітин різної плоїдності, що почергово змінюються. Автори припустили, що тетраплоїдні клітини пригнічують розвиток диплоїдних, але за виснаження якихось елементів середовища вони витісняються диплоїдними клітинами [75].

Деякі дослідники відмічали вплив продуктів метаболізму двохрічної диплоїдної культури клітин на плоїдність 14-тирічної тетраплоїдної. Зокрема, вирощування тетраплоїдного штаму на середовищі, в якому росли до цього клітини диплоїдного штаму, привело до появи в тетраплоїдному штамі значної кількості диплоїдних клітин [76].

Зміна складу живильного середовища також може приводити до збільшення частоти диплоїдних клітин. Як показали З. Шаміна і Л. Фролова за перенесення міксоплоїдного штаму гаплопаппуса з середовища Уайта на середовище Мурасіге-Скуга відбулася різка зміна співвідношення диплоїдних та поліплоїдних клітин за рахунок збільшення числа диплоїдних клітин. За подальшого культивування на новому середовищі рівень поліплоїдних клітин і тканин підвищувався, сягаючи вихідної величини, тобто рівня варіанту, що культивували на середовищі Уайта. Диплоїдизацію тканини за переносу її на середовище іншого складу автори пояснюють більшою (вищою) фізіологічною стабільністю диплоїдних клітин [40]. У той же час є дані, що додавання в живильне середовище інгібувальних концентрацій NaCl (0,2 і 0,4 %) викликало поліплоїдизацію штамів креспісу [77]. На думку авторів це свідчить про те, що поліплоїдні клітини є більш стійкими до несприятливих чинників середовища, оскільки за подальших пересадок спостерігали їх селекцію.

Започаткування погляду на культуру тканин і клітин рослин, як на клітинну популяцію

Як показано вище, уже на початок 1970-х рр. було встановлено, що в культурі клітин і тканин рослин під впливом умов культивування може відбуватися як селективне розмноження передіснуючих у вихідному експланті клітин різної (певної) плоїдності, так і виникнення *de novo* клітин з відмінним числом хромосом. Іноді спостерігали одночасний перебіг обох процесів

під впливом однієї речовини, як це показано на прикладі з кінетином. Зміна умов культивування призводить, як правило, до зміни плоїдності культури тканин [40-45, 58, 67]. Почали з'являтися думки про те, що культивовані калюсні і суспензійні культури — це не просто «клони» чи «звиклі тканини» (за термінологією Р.Г. Бутенко — «привыкшие ткани»), а своєрідні, експериментально створені біологічні системи. Під впливом досліджень культивованих клітин людини і тварин починає зароджуватися погляд на культуру рослинних клітин, як на клітинну популяцію, як на нову біологічну систему. Вперше найбільш чітко ці положення викладено в моїй дисертації на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук «Цитогенетичне вивчення клітинних популяцій у культурі ізольованих тканин рослин», захищеної у 1975 р. за спеціальністю «генетика» [59]. Висновки цієї роботи наступні (мовою оригіналу):

«1. Изучены 32 штамма гаплопаппуса, 8 штаммов кресписа, один штамм табака от диплоидных растений и 52 штамма томата от гаплоидного, диплоидного и тетраплоидного растений.

2. Установлены различная интенсивность каллусообразования и различия в плоидности клеток каллусов гаплопаппуса и кресписа в зависимости от происхождения исходного эксплантата и состава питательной среды.

3. В результате изучения особенностей роста, митотического режима, плоидности, уровня и типов аберраций хромосом выделены три периода микроэволюции клеточных популяций в культуре изолированных тканей растений: период первичной популяции изолированных клеток, период становления и период сформированного штамма.

3а. Период первичной популяции характеризовался стабильностью изученных признаков в результате преимущественного действия стабилизирующего отбора.

3б. Период становления штамма характеризовался изменением (чаще снижением) темпа роста каллуса, нарушением циркадного ритма митотической активности, изменением уровня и спектра аберраций хромосом, а в ряде случаев и изменением плоидности клеток каллуса. При этом отмечали как редукцию числа хромосом (особенно в клетках каллуса от диплоидного и тетраплоидного томата), так и полиплоидизацию клеток. В результате преимущественного действия ведущего отбора на фоне ненаправленной изменчивости формировались популяции кле-

ток, приспособленных к условиям изолированного роста, которые чаще всего были миксоплоидными. В этом периоде наблюдали как дивергенцию штаммов по ряду признаков, в том числе и по уровню пloidности при получении их из тканей одной пloidности, так и конвергенцию (при использовании тканей разной пloidности).

Зв. В периоде сформированного штамма клеточные популяции характеризовались относительной стабильностью изученных признаков, возникших в периоде становления.

4. Происхождение експлантата (видовая и тканевая принадлежность исходного материала) существенно не влияло на направление эволюции клеточных популяций в культуре изолированных тканей изученных растений.

5. Изменение состава питательной среды в ряде случаев приводило к изменению соотношения между клетками различной пloidности. При этом в диплоидных штаммах отмечали повышение частоты, как правило, полиплоидных клеток, а в полиплоидных штаммах – диплоидных. В дальнейшем динамическое равновесие в популяциях устанавливалось на новом уровне, а иногда возвращалось к уровню, характерному для исходных условий.

6. Полученные результаты свидетельствуют о том, что на первых этапах культивирования изменчивость большинства штаммов является, в основном, результатом физиологической адаптации клеток к условиям изолированного роста. Позже наблюдались процессы генетической адаптации, находящие свое выражение в изменении генетической структуры, в частности пloidности клеток. В результате формировались штаммы, характеризующиеся наличием гомеостаза.»

Наведені висновки дисертаційної роботи ґрунтуються на експериментальних даних, опублікованих у роботах, наведених у авторефераті дисертації [59] а, також у роботах [3, 41–45, 58, 60, 61].

Основні результати і ключові висновки, зроблені на основі отриманих як на той час, так і пізніше експериментальних даних про особливості хромосомної мінливості і еволюції клітинних популяцій *in vitro* як рослинних культур, так і культур клітин ссавців, у тому числі і людини, збігаються. (Аналіз стану особливостей хромосомної еволюції в популяціях соматичних клітин ссавців і особливостей експериментальної еволюції в їхніх клітинних популяціях наведено в роботах [78–83]). Спільним у дослідників культивованих клітин ев-

каріотів став погляд на культуру *in vitro*, як на нову, експериментально створену біологічну систему. Як показали результати наших досліджень, перехід до системного аналізу популяцій культивованих клітин рослин виявився найпродуктивнішим, саме такий аналіз дозволив виявити основні закономірності динаміки клітинних популяцій, їхньої адаптації до умов ізольованого росту, головні напрями еволюції як геному культивованих клітин, так і еволюції клітинних популяцій як біологічної системи [67].

Сучасне визначення основних ознак та відмінностей клітинних популяцій. Викладені нижче узагальнення ґрунтуються перш за все на експериментальних даних, отриманих в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України: спочатку у Відділі цитогенетики і поліплоїдії (завідувач — проф., член-кор. НАН України В. П. Зосимович), потім — у лабораторії генетики клітинних популяцій цього відділу (зав. лабораторії канд. біол. наук В. А. Кунах), а з 1989 р. і дотепер — у Відділі генетики клітинних популяцій (завідувач відділу — проф., член-кор. НАН України В. А. Кунах). Ці узагальнення представляють собою, по суті, основні положення генетики клітинних популяцій, яка значною мірою як науковий напрям стосовно рослин була сформована мною та під моїм керівництвом співробітниками зазначених вище наукових підрозділів Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Особливості культури тканин як клітинної популяції. Інтеграцію окремих особин в популяцію, а їхніх генотипів у генофонд панміктичної популяції зумовлює рекомбінація генетичного матеріалу під час статевого процесу. У популяціях культивованих клітин такого масштабу обміну спадковою інформацією, очевидно, немає. Відсутність класичної комбінативної мінливості дозволяє віднести клітинні популяції, ґрунтуючись на класифікації Т. Добжанського [84], до менделівських популяцій.

Цілісність менделівських популяцій забезпечується переважно некомбінативною спадковою мінливістю. У таких популяціях виникнення, зміна і збереження успадкованого поліморфізму залежать, головним чином, від двох чинників — спадкової (некомбінативної) мінливості і добору. Спадкова мінливість у клітинних популяціях не вичерпується мутаційною мінливістю. У процесі еволюції у клітин екаріотів, особливо у клітин багатоклітинних організмів,

виробився ще один тип спадкової мінливості — епігенетична мінливість, яка в клітинних популяціях відіграє велику, а подекуди і ключову роль. Як вважає Ю. Вахтін [82, 83], взаємодією спадкової мінливості і добору пояснюються генетичні аспекти таких процесів, як пристосування клітинних популяцій до зміни умов середовища, їх старіння та відмирання, перетворення популяцій нормальних соматичних клітин на злаякісні тощо. За аналізів генетичних процесів у клітинних популяціях потрібно враховувати взаємодію не лише мутаційної мінливості і добору, а й епігеномної мінливості і добору, а також взаємний вплив різних форм мінливості та епігенетичної мінливості на процеси взаємодії мутаційної мінливості і добору.

Ще одним із шляхів взаємозв'язку між клітинами вищих еукаріотів, проте ще мало вивченим з точки зору механізмів, є виділення в середовище і обмін продуктами метаболізму, а також обмін між клітинами генетичним матеріалом, які є вже давно встановленими фактами (подробіці і посилання див. [67, 83, 85–87]). Останнім часом розвивається уявлення про те, що геноми клітин багатоклітинних організмів об'єднані в єдиний інформаційний простір організму, який є особливим і надзвичайно ефективним механізмом протидії мутаційному тиску [88].

У моїх роботах висунуто і обґрунтовано положення про те, що рослина — це система клітинних популяцій, яка характеризується пластичністю свого генофонду, в основі якого лежить пластичність геному соматичних клітин, що за взаємодії з клітинним добром забезпечує адаптивність рослини як цілісного організму і створює можливість успадкування (передачі нащадкам) адаптивних геномних змін, набутих протягом онтогенезу. Більшість таких змін геному, у тому числі й кількісні зміни на рівні хромосом, хроматину, а також певних послідовностей ДНК, є епігеномними, поскільки вони, очевидно, не зачіпають генетичного коду і, у принципі, є зворотними, що особливо яскраво виявляється у процесах дедиференціювання-редиференціювання [86, 87].

Перенесення клітин у культуру *in vitro* означає припинення їх існування як одного із структурних елементів цілісного організму, до складу якого вони входили раніше. Індукція дедиференціювання (у рослин — калюсогенезу) приводить до змін морфологічних і функціональних особливостей, які були властивими нормальній диференційованій клітині, деякі з них починають проліферувати, в інших клітин змінюється швидкість

розмноження. При цьому клітина в умовах *in vitro* виходить з-під контролю корелятивних факторів, що спрямовують і регулюють діяльність різних органів, тканин і клітин як єдиного цілого. Умови й характер живлення клітин також зазнають істотних змін. Ці впливи, які за своєю силою перевищують межі норми реакції геному клітин, є стресовими і призводять до кардинальної перебудови функцій і метаболізму клітин, значного підвищення рівня геномної та епігеномної мінливості, зміни напряму та інтенсивності дії клітинного добору і, як наслідок, до істотних змін у структурі клітинних популяцій. У результаті популяції культивованих клітин відрізняються від вихідних тканин високим рівнем гетерогенності (поліморфізму) і значними перебудовами геному. Масштабність і глибина перебудов може в окремих випадках перевищувати навіть міжвидові відмінності, що існують у природі (див. наприклад, [67, розділ 8.3; 89–97]).

Добір у клітинних популяціях. У сформованих (тривалий час пасивованих в умовах *in vitro*) штамах та клітинних лініях, як і в цілому організмі, переважають дві форми добору — стабілізуючий і рушійний (прямий, прогресивний). У клітинних популяціях інтактних організмів домінує стабілізуючий добір, що ґрунтується на перевагах норми над всіма можливими відхиленнями. Нормою для інтактного організму в клітинних популяціях, що проліферують, наприклад у меристемі рослин, є клітини з диплоїдним каріотипом та епігенотипом, властивим клітинам даної популяції. Всі аберантні форми (клітини з хромосомними, геномними і епігеномними (?) мутаціями) менше пристосовані, вони або втрачають здатність до поділів, або діляться менш інтенсивно і згодом витісняються зі складу популяції клітинами з незмінним генотипом та епігенотипом [67, розділи 4.2, 4.3].

Добір у клітинних популяціях ґрунтується на диференційному розмноженні спадково відмінних варіантів клітин. Відмінності в темпах проліферації спричинюють зміну співвідношення варіантів — частка клітин варіанта, що швидше проліферує, зростає, а варіанта, що проліферує повільніше, — зменшується. Якщо одночасно відбувається неселективна загибель клітин (або перехід їх, скажімо, внаслідок диференціювання з популяції меристематичних у популяцію спеціалізованих клітин, що далі не діляться), варіант, що проліферує повільніше, врешті-решт зникне — буде елімінований добром. Якщо чисельність популяції весь час зростає, а неселективна загибель клітин слабо

виражена, елімінація варіанта, що підлягає дії негативної селекції, не відбудеться, зменшуватиметься лише його частка [82; 83; 67, розділ 8].

Швидкість витіснення одного варіанта іншим характеризує інтенсивність добору. В інтактних організмах спадково (каріотипово) змінені варіанти клітин у меристемі витісняються за нормальних умов, як правило, дуже швидко, що свідчить про високу інтенсивність стабілізуючого добору в клітинних популяціях меристеми [67, розділ 4.3]).

У разі патологічних чи стресових станів умови внутрішнього середовища в організмі відхиляються від норми. Це впливає, в першу чергу, на клітини з нормальним генотипом (і епігенотипом), у результаті інтенсивність стабілізуючого добору падає, спадково змінені варіанти повільніше витісняються зі складу популяцій. Одночасно з погіршенням (різкою зміною) умов середовища підвищується частота виникнення нових аберантних форм. Загалом, коли клітини знаходяться в умовах існування, які виходять за межі норми реакції їх генотипу, тобто потрапляють у справді стресові умови існування (наприклад, при перенесенні клітин в умови *in vitro*), в популяції клітин починає діяти дестабілізуючий добір. Ця форма добору призводить до різкого посилення генетичної мінливості внаслідок порушення корелятивних систем організму, головним чином гормональної системи, що виникає за стресових впливів [59; 67, розділи 4.4, 8.3, 8.4]. Результатом дії дестабілізуючого добору є значне зростання генетичного розмаїття в клітинних популяціях. На фоні високої геномної мінливості в подальшому як виявлення тиску змінених умов існування починає діяти рушійний чи стабілізуючий (залежно від конкретних умов) добір.

Особливості і ефективність дії різних форм добору в процесі формування популяцій культивованих клітин і в сформованих штаммах детально розглянуті у книзі [67, розділи 8.3 та 8.4]. Тут відмітимо лишень те, що популяції ізолюваних клітин порівняно з популяціями мітотично активних клітин інтактних організмів є генетично набагато гетерогеннішими. Ця гетерогенність є стабільною [67, розділ 8.1.3], що свідчить про переважну дію в таких популяціях стабілізуючого добору. При цьому слід враховувати, що коли ознака, за якою йшов добір, стабілізується, це не значить, що дія добору в популяції за цією ознакою припинилась: змінюється лише роль добору в популяції — його дія спрямовується на

підтримку досягнутої структури популяції і нової середньої величини ознаки. Якщо інтенсивність такого підтримуючого добору знижується, зменшується і середня проліферативна активність клітин у популяції. Цей добір не можна назвати стабілізуючим, якщо строго дотримуватись визначення, тому що у цьому випадку всі спадкові варіанти з підвищеною проліферативною активністю характеризуватимуться підвищеною селективною цінністю. Проте ми вважаємо, що коли генетична структура навіть дуже гетерогенної популяції стабільна протягом багатьох клітинних поколінь і пасажів, то в ній діє переважно стабілізуюча форма добору. Особливо чітко це проявляється тоді, коли популяція зберігає генетичну структуру на фоні високої частоти виникнення нових генотипів (високого рівня спонтанних мутацій і порушень мітозу), як це вперше показано в наших роботах [41, 42, 45, 58], (див. також [67, розділ 8.3]).

Отже, одним із найважливіших чинників підтримання генетичної гетерогенності є фенотиповий поліморфізм, який забезпечує існування популяції в мінливих умовах довкілля, зумовлюючи її лабільність, наявність преадаптацій. Тому поліморфізм можна розглядати як вияв еволюційно сформованого генетичного гомеостазу. Природний добір закріплює існування поліморфізму шляхом контролю чисельних співвідношень необхідних форм [67, розділ 8.3]. Між чинниками добору і спадковою мінливістю існує пряма залежність. У разі різкої зміни умов зовнішнього середовища популяція має можливість пристосуватися до них або використовуючи наявний мутаційний резерв, або за рахунок зростання частоти виникнення нових мутацій. Виникнення очевидно неспрямованих спонтанних мутацій та наступний добір сприяють поступовим змінам популяції, причому ці зміни можуть створювати враження спрямованих. Ці положення популяційної генетики, встановлені спочатку для вищих організмів, нині є загальноприйнятими для популяцій будь-якого типу.

Таким чином, популяціям культивованих клітин властиві специфічні особливості, зокрема:

- клітинні популяції відрізняються від популяцій багатоклітинних організмів відсутністю комбінативної мінливості та наявністю і великим значенням для функціонування ізолюваних клітин епігенетичної мінливості, а від популяцій одноклітинних евкаріотів — відсутністю комбінативної мінливості;

такі популяції визначаються як неменделівські з епігенетичною мінливістю;

- виділення клітин із цілісного організму призводить до порушення тканинного і організмowego гомеостазу, що є загальною причиною мутацій. Тому, чим сильніше відхиляються умови життєдіяльності клітин від оптимальних, тим вищий рівень спадкової мінливості й генетичної гетерогенності, що і спостерігається в таких екстремальних умовах, як умови ізолюваного росту *in vitro*;
- у процесі одержання і формування штамів, здатних до тривалого субкультивування (пасивування), геном як окремих клітин, так і генетична структура клітинних популяцій докорінно змінюються; окремі геномні зміни можуть перевищувати навіть природні міжвидові відмінності [67, 89–97].

Ці та інші особливості популяцій культивованих клітин детальніше розглянуто далі.

Популяційно-генетичні основи адаптації клітин до умов росту *in vitro*

Культивовані *in vitro* клітини рослин є клоновою популяцією, в якій роль організмів виконують окремі клітини. Вихідні клітини інтактних багатоклітинних організмів не запрограмовані на виконання цих функцій. Тому явища, що відбуваються в клітинних популяціях у процесі їх адаптації до умов тривалого культивування *in vitro*, є процесами формування нової біологічної системи і мають загальнобіологічне значення. Це унікальна модель глибокої (але, за бажанням експериментатора, зворотної за індукції процесів морфогенезу і регенерації) регресивної еволюції біологічної системи — від багатоклітинного рівня до одноклітинного. (У загальній теорії еволюції регресом (морфологічним регресом) вважається шлях розвитку, який веде до спрощення організації, втрати важливих, навіть основних морфологічних і фізіологічних ознак, які характеризували більш або менше диференційованих предків [98]).

За введення клітин і тканин вищих екаріотів у культуру *in vitro* внаслідок дедиференціювання та (у рослин) калюсоутворення спрощуються організація клітин та їхня структура, втрачаються деякі важливі, і навіть головні морфологічні та фізіологічні ознаки, властиві вихідним диференційованим клітинам. Тому, спираючись на загальноновизнані еволюційні терміни, калюсогенез, подібно канцерогенезу, можна вважати регресивним шляхом розвитку

клітин [81], а геномні зміни, що спостерігаються при цьому — регресивними. Здатність до таких перебудов, вірогідно, і визначає можливість дедиференціювання клітин і, в кінцевому рахунку, — калюсоутворення.

Першим етапом отримання культури ізолюваних клітин є індукція процесів дедиференціювання і подальших поділів дедиференційованих клітин (проліферації). У багатьох видів рослин, особливо у дводольних, здатністю до дедиференціювання володіють клітини будь-якого рівня диференціації і спеціалізації за умови, що вони містять живе ядро [99, 100]. Встановлено, що за утворення первинного калюсу такими клітинами геном у багатьох випадках значно перебудовується. Змінам підлягає як ядерний, так і позаядерний геном.

Еволюція геному в процесі дедиференціювання клітин. Індукція процесів дедиференціювання передбачає перепрограмування геному та його повернення до стану, характерного для проліферуючих клітин (до стану «стовбуровості»), тобто «ювенілізацію» геному. Це проявляється розмаїттям геномних перебудов, рівень, типи та спрямованість яких у різних об'єктів різні. Відмінності у геномній мінливості клітин первинних калюсів зумовлені генотипними особливостями рослини (видом, сортом, лінією, формою тощо), станом геному в клітинах вихідного експланта, глибиною геномних перебудов внаслідок диференціювання клітин первинного експланта. Особливо значна реорганізація геному на всіх рівнях вивчення (геномному, хромосомному, молекулярному) спостерігається у тих рослин і тканин, у яких в ході онтогенезу відбуваються суттєвіші перебудови геному. На ці процеси *in vitro* істотно впливають конкретні умови індукції калюсогенезу та компоненти живильного середовища, насамперед регулятори росту. Отже, особливості перебігу геномної мінливості під час дедиференціювання визначаються взаємодією системи генотип — середовище. Вона ґрунтується на тому, що поранення, компоненти живильного середовища, конкретні умови культивування клітин впливають на експресію генів, які відповідають за дедиференціювання (калюсоутворення). Ці самі чинники детермінують включення певних елементів мутаторної системи.

У цілому геномні реорганізації, які реєструються в процесі калюсоутворення *in vitro*, — це сума різних за походженням змін, що включає:

- запрограмовані зміни, які відбуваються під час поранення та індукції дедиференціювання;
- зміни та мутації, що виникли в клітинах первинного експланту в онтогенезі вихідного організму та виявляються у разі проходження мітозу *in vitro*;
- зміни та мутації, що виникають під впливом умов індукування калюсоутворення, які (умови) у деяких випадках виходять за межі норми реакції конкретного генотипу та індукують геномні перебудови [99, 100].

В основі механізмів, що забезпечують перебудову геному за індукції дедиференціювання клітин (і редиференціювання) як *in vivo*, так і *in vitro* до і під час перших мітозів диференційованих, особливо високоспеціалізованих клітин, найчастіше лежать наступні процеси:

- зміна стану метильованості багатьох послідовностей ДНК;
- додатковий, часто досить значний синтез ДНК;
- ампліфікація окремих послідовностей;
- ендоредуплікація, інші форми ендомітозу;
- зміна кількості гетерохроматину і характеру його розподілу в хромосомах;
- екструзія (викидання ядерного матеріалу за межі клітини);
- втрата значної кількості ядерної ДНК (особливо характерною є для високоплоїдних клітин), зокрема, шляхом димінуції хромосом і хроматину;
- цитоміксис (обмін ядерним матеріалом між клітинами);
- зміна кількості В-хромосом (спочатку, як правило, збільшення їхньої кількості, а за тривалого пасивування — втрата, особливо тканинспецифічних, В-хромосом);
- фрагментація, перешнуровування і брунькування ядер (амітоз);
- аномалії мітозу і цитокінезу, зокрема, утворення синцитіїв; вони часто обумовлені аномаліями мікротрубочок; утворені синцитії можуть з часом перетворюватись в одноподібні клітини шляхом цитокінезів без мітозів;
- злиття ядер у багатоядерних клітинах;
- виникнення мікроядер за відсутності абераційних анафаз;
- сегрегація ядерного матеріалу в профазі та метафазах не тільки поліплоїдних, а й

диплоїдних клітин, яка призводить до редукції числа хромосом;

- поява, а потім поступове зникнення політенних хромосом (зникнення може відбуватися, очевидно, поступово, шляхом зменшення кількості ниток у початково політенних хромосомах);
- соматичний мейоз і кросинговер;
- транспозиції мобільних генетичних елементів та ін.

На нашу думку, саме здатність до такої перебудови геному диференційованих клітин лежить в основі властивого багатьом організмам, перш за все — рослинам, циклу розвитку диференціювання-дедиференціювання-редиференціювання.

Розвиток цих процесів ми уявляємо наступним чином. Початковим індуктором дедиференціювання є механічна травма (поранення), внаслідок якої запускаються процеси мінливості (спочатку — епігеномної), що супроводжують дедиференціювання клітин і перші етапи їх проліферації, спрямовані у природі на загоювання рани. У клітинах рослин змінюється компетентність до фітогормонів, сахарози та інших регуляторів росту. Використання цих біологічно активних компонентів під час культивування тканин *in vitro* у підвищених концентраціях не лише прискорює та посилює, а й спотворює запрограмований перебіг процесів мінливості, що відбуваються у природі під час загоювання рани. Іншими словами, геномна мінливість, що відбувається за калюсоутворення *in vitro*, — це гіпертрофоване та дещо спотворене виявлення процесів, які відбуваються в природі під час індукції дедиференціювання та проліферації клітин, наприклад, за поранення [99, 100].

Адаптація клітин до умов росту в пересадній (пасивованій) культурі. Отримання пристосованої до умов тривалого росту в пересадній (пасивованій) культурі культивованих клітин — процес складний і багатоетапний. Він, як уже відмічалось вище, вимагає радикальної перебудови як функцій і метаболізму вихідних клітин багатоклітинного організму, так і структури клітинних популяцій. Адаптація клітин до умов тривалого вирощування *in vitro* відбувається, як і інших біологічних угруповань, на основі взаємодії процесів мінливості і добору.

Мінливість на перших етапах культивування є наслідком фізіологічної адаптації. У подальшому, під час субкультивування відбуваються процеси генетичної адаптації, які проявляються

у зміні генетичної структури клітинних популяцій. У процесі адаптації клітинних популяцій до умов росту *in vitro* ми виділили три періоди: первинної популяції ізольованих клітин, становлення та сформованого штаму [59, 67].

Клітини, що знаходяться в періоді первинної популяції (первинний калюс та перші 2-3 пасажі), характеризуються порівняно незначними генетичними відмінностями від мітотично активних клітин вихідної рослини (вихідного експлантата чи ранового калюсу), відносною стабільністю більшості ознак у результаті переважаючої дії стабілізуючого добору. Геномні реорганізації цього періоду — це сума різних за походженням змін (див. вище).

У періоді становлення — критичному періоді у процесі адаптації клітин до умов росту в пересадній культурі — відбувається остаточне зникнення інтегруючих механізмів організму, клітини перебувають в умовах переважаючої дії дестабілізуючого добору. Період становлення охоплює другий-восьмий, інколи до 12-го пасажу з початку введення клітин в культуру *in vitro*; у цей час відбувається істотна перебудова фізіологічних процесів у клітинах і структури клітинних популяцій в цілому. Саме для цього періоду характерні найзначніші зміни, внаслідок яких відбувається адаптація клітинних угруповань як біологічної системи до змінених, порівняно з первинним калюсом (нульовим пасажем), умов існування. Зокрема, у переважній кількості випадків у періоді становлення спостерігаються наступні явища:

- змінюється морфологія та темп росту клітинних штамів (калюсних тканин і суспензійних культур);
- як правило, знижуються параметри проліферації — темпи поділів і росту культивованих клітин;
- порушується ритміка фізіологічних процесів, зокрема, циркадна ритміка мітотичної активності;
- змінюються мітотичний режим і розподіл клітин за тривалістю клітинного циклу та окремих його фаз, у клітинних популяціях зростає розмах гетерогенності за тривалістю клітинного циклу в цілому та мітозу зокрема;
- зростає рівень та розширюється спектр геномних змін, перш за все, зростає кількість клітин зі зміненими числами хромосом;

- змінюються рівень і спектр аберацій хромосом; у цих змінах найсуттєвішу роль відіграє цикл розрив-злиття-міст;
- зростає частота порушень мітозу, зумовлена ушкодженнями переважно веретена поділу (мікротрубочок?);
- змінюється експресія генетичної інформації, що супроводжується подальшими змінами метилювання різних послідовностей ДНК;
- збільшується рівень гетерогенності за більшістю морфологічних, цитологічних, біохімічних та молекулярно-біологічних маркерів;
- одночасно відбувається позитивна селекція клітин, пристосованих до умов *in vitro*, та елімінація непристосованих та ін.

На фоні високого рівня та широкого спектра мінливості і гетерогенності дія рушійного добору зумовлює генетичну адаптацію гетерогенних популяцій клітин. При цьому деякі клітинні лінії припиняють свій ріст і гинуть, очевидно, внаслідок відсутності адаптивних змін. Практично за всіма ознаками спостерігаються можливі типи еволюції споріднених клітинних штамів — дивергенція, конвергенція, паралелізм [59, 67, 101–104].

Головні чинники мінливості та добору в клітинних популяціях *in vitro*

Відомо, що гормональна система посідає провідне місце під час відповіді організмів, у тому числі — рослин, на стресові чинники та в процесах адаптації, впливаючи на генну експресію, транскрипційні і трансляційні процеси (зумовлюючи, у тому числі, й апоптоз). Водночас гормони є складовими загальних мутагенних та антимутагенних систем рослин, які визначають рівні природного (спонтанного) мутування. Аналіз результатів власних експериментів та літературних даних дозволив нам припустити, що головною причиною високої геномної мінливості культивованих клітин рослин є порушення гормонального балансу [67, розділ 8; 105]. Розглянемо це положення та наслідки, що з нього витікають, детальніше.

В інтактних організмах гормональний стан і компетентність проліферуючих тканин спрямовані на створення оптимальних умов для ділення та росту клітин. У нормі гормональний фон та відповідна компетентність клітин зумовлюють стабілізуючий добір, внаслідок якого з популяції клітин, що діляться, видаляються клітини з геномними порушеннями, що виникають з тих чи інших причин. У тканинах, що диференціюють-

ся, гормональний фон та компетентність клітин, інші — залежно від майбутніх функцій під впливом фітогормонів відбуваються не лише морфологічні та біохімічні зміни клітин, а й запрограмовані зміни їхнього геному, спрямовані в кінцевому рахунку на виконання конкретної функції [106] (див. також [67, розділ 4]).

У культурі *in vitro* ситуація інша. Тут одне з головних завдань — отримання з вихідних диференційованих (спеціалізованих) тканин таких клітин, що швидко діляться та ростуть (проліферують). Для цього емпірично створюються відповідні умови: у живильне середовище для культивування додаються не лише необхідні макро- і мікроелементи та джерело енергії (цукри), а й стимулятори росту, головним чином фітогормони у різних кількостях і співвідношеннях. За цих умов відбуваються ініціація процесів дедиференціювання та активної проліферації клітин, утворення первинного калюсу. Індукція процесів дедиференціювання та калюсоутворення передбачає перепрограмування геному та його повернення до стану, характерного для проліферуючих клітин, тобто «ювенілізацію» геному. Це виявляється у вигляді різноманітних генетичних перетворень, рівень, типи та спрямованість яких у різних об'єктів різні. Ці зміни є, в основному, запрограмованими [67, розділ 7.2]. Тому ми вважаємо, що для рослин, які в природних умовах здатні утворювати рановий калюс (тобто, у яких калюсоутворення є еволюційно закріпленим і генетично зумовленим процесом), мінливість у первинному калюсі є наслідком фізіологічної адаптації клітин на основі, переважно, епігенетичних змін. При застосуванні оптимальних для проліферації впливів, у тому числі — гормональних, умов існування клітин у первинному калюсі *in vitro* можна порівняти з умовами *in vivo* в цілісному (але пораненому) організмі. Ці умови зберігаються *in vitro* протягом певного часу, як правило впродовж перших двох, щонайбільше — чотирьох пасажів. У результаті первинний калюс і клітини кількох перших пасажів являють собою біологічну систему, яку можна порівняти в цілому з меристемою інтактної рослини або з рановим калюсом. Очевидно, що гормональна збалансованість цієї системи забезпечує її відносну однорідність, стабільність, чітку ритміку мітотичної активності (яка регулюється, до речі, фітогормонами), переважаючу дію стабілізуючого добору.

У процесі подальшого субкультивування відбувається добір клітин, що найінтенсивніше

діляться, та/або ділянок ізольованих тканин, що найшвидше ростуть; тобто добираються клітини зі зміненим гормональним балансом та/або зміненою реакцією (компетентністю) на гормони. При цьому поступово зникають інтегруючі механізми рослинного організму, клітини переходять до умов існування, що знаходяться за межами норми реакції їхнього генотипу, тобто потрапляють у стресові умови. У результаті в популяції ізольованих клітин починає діяти дестабілізуючий добір.

Ефективність дестабілізуючого добору у разі введення клітин в ізольовану культуру залежить не лише від умов їх культивування, а й від виду рослини, її геному, особливостей первинного експланта, тобто від стану геному у вихідних клітинах. Іншими словами, ефективність дестабілізуючого добору визначається в результаті взаємодії генотип-середовище, де визначальна роль належить екзогенним гормонам та компетентності клітин (насамперед компетентності до гормонів). Для клітин диких видів рослин з простими геномами характерним є невисокий рівень та неширокий розмах геномної, зокрема каріотипної, мінливості. Клітини більшості культурних видів характеризуються *in vitro* значно ширшим розмахом мінливості. Це зумовлюється, очевидно, не лише поліплоїдним станом геному більшості культурних рослин, а й тривалим впливом дестабілізуючого добору в процесі їх окультурення і подальшого вирощування-селекції. У результаті відселектовані форми лабільніші (пластичніші), помітніше реагують на зміни умов вирощування (у тому числі на гормональні впливи): під час введення в культуру *in vitro* демонструють ширший розмах мінливості, особливо каріотипної. У багатьох таких видів рослин результати дестабілізуючого добору виявляються вже у первинному калюсі [67, розділ 7.2].

На фоні високої геномної мінливості в клітинних популяціях починає діяти (як прояв тиску змінених умов існування) переважно рушійний добір, який формує популяцію клітин, здатну до необмеженого росту в конкретних умовах ізольованої культури. Головні механізми мінливості, на основі яких, за вирішальної ролі добору, здійснюється еволюція геномної структури клітинної популяції — це:

- зміна кількості та морфології хромосом внаслідок порушень та відхилень від нормального перебігу мітозу, циклу мостів та інших процесів (див. вище);
- соматичний кросинговер;

- зміна експресії генів, у тому числі їх репресія та дерепресія, в основі чого лежить переважно зміна метилювання ДНК;
- ампліфікація та делеція (редукція) певних повторів ДНК;
- транспозиції мобільних генетичних елементів;
- генні мутації.

Оскільки культури ізольованих клітин і тканин рослин властиві зміни кількості хромосом, підвищення рівня їх структурних перебудов, зміни кількості і розподілу С-гетерохроматину, а інші відхилення в періоді становлення трапляються значно рідше, логічно допустити, що перший і найвірогідніший та найефективніший механізм появи нових генотипів і зростання рівня генетичного поліморфізму *in vitro* полягає у виникненні клітин із різними наборами хромосом, стабілізації їх кількості та співвідношення на певному рівні, доборі певної частоти структурних перебудов хромосом, які призводять до їхніх морфологічних змін. При цьому спочатку спостерігається, як правило, поліплоїдизація певної частини клітинної популяції внаслідок, головним чином, ендомітозу, в подальшому зростає генетична гетерогенність популяції за числом і морфологією хромосом в результаті відхилень від нормального перебігу мітозу та циклу мостів. І тільки потім відбуваються переважно ті зміни (перебудови), які формують нові клітинні варіанти з відмінами на рівні послідовностей ДНК.

Результати, що підтверджують саме такий перебіг подій, є практично в усіх опублікованих роботах, в яких наведено результати вивчення геномної мінливості в динаміці субкультивування (пасивування) клітинних культур найрізноманітніших видів рослин (див. наприклад, [91–97, 107–115]).

Після 8–10-го пасажу штами, як правило, стабілізуються за багатьма вивченими ознаками. Вони гетерогенні, але для них характерне встановлення динамічної кількісної рівноваги між клітинами з різними геномами. Така стабільна гетерогенність спостерігається на фоні високого (інколи понад 50 %) рівня мутацій хромосом і порушень мітозу, які спричиняють виникнення нових геномів, тобто на фоні перманентно високого рівня мутаційного тиску [67, розділ 8.3.2; 107–115]. Слід відмітити, що одним із шляхів регуляції рівня мутування є зміна ефективності елімінації клітин з циклом розрив-злиття-міст. Ефективність елімінації таких клітин, а звідси — і рівень клітин з абераціями хромосом можливо регулювати екзогенними

фітогормонами [41, 116]. Зміною наявності і співвідношення фітогормонів у живильному середовищі можливо також впливати на рівень плоїдності культивованих клітин. Механізми такої регуляції розглянуто в публікаціях [68, 117] (див. також [67, розділ 8.3.2]).

Особливо слід підкреслити, що культивовані впродовж тривалого часу (десятки пасажів і більше) клітинні культури з активним неорганізованим типом росту є гетерогенними популяціями клітин з переважно реорганізованими геномами. Популяції, в яких більшість становлять клітини з вихідним геномом (геномом, властивим клітинам/тканинам вихідних експлантів), як правило, в пасивованій культурі не ростуть, вони припиняють ріст і гинуть на перших етапах субкультивування (в періоді становлення штаму). У деяких експериментах встановлено пряму кореляційну залежність здатності до тривалого росту калюсу *in vitro* і частки клітин з реорганізованим геномом (подробіці і посилення див. [67]). Отже, адаптація клітин до умов тривалого росту *in vitro* визначається реорганізацією вихідного клітинного геному незалежно від його стану у вихідному експланті і навіть у первинному калюсі.

Таким чином, накопичені чисельні результати експериментів на всіх рівнях дослідження — від клітинного до біохімічного і молекулярно-генетичного, — свідчать, що, у період сформованого штаму більшість клітинних популяцій характеризується відносною стабільністю ознак, які сформувались у період становлення, наявністю фізіологічного та генетичного гомеостазу, зумовленого переважною дією стабілізуючого добору (напряма та сила якого значно відрізняються від таких в інтактному організмі та в рановому калюсі). Геномні реорганізації сформованих штамів мають не випадковий, каналізований характер, що свідчить про певну єдність механізмів адаптації та еволюції геному рослин в природі та в культурі *in vitro*.

Подібні процеси та періоди (стадії) відомі для клітин людини і тварин у культурі протягом становлення постійних клітинних ліній, за пухлинного росту, а також у процесі нормального онтогенезу [78–80, 82, 83, 86, 118, 119]. Такі процеси та явища властиві також прокариотам за різкої зміни умов існування [120]. Це свідчить про універсальність адаптаційних механізмів клітинних популяцій незалежно від ступеня еволюційного розвитку клітин.

Вплив умов вирощування на генетичну структуру клітинних популяцій

Вплив деяких компонентів живильних середовищ та умов індукції дедиференціювання і калюсогенезу (температури, освітлення, мінерального складу середовища та вмісту у ньому різних органічних добавок — цукрів, вітамінів, амінокислот та ін., співвідношення в середовищі різних типів регуляторів росту, перш за все фітогормонів) на рівень і спектр геномних змін у процесі калюсоутворення ми детально розглянули раніше [58, 121] (див. також [67, розділи 7.2, 9]). Встановлено, що склад культурального середовища та інші зовнішні чинники значною мірою визначають напрям змін геному культивованих клітин у процесі їх адаптації до умов росту *in vitro* і тому можуть використовуватись як регулятори мінливості і клітин не лише в разі індукції калюсоутворення, а й у процесі отримання субкультивованих (пасивованих) культур і сформованих клітинних штамів. Одержання та подальше субкультивування клітинних культур в різних умовах та на різних за складом живильних середовищах можуть приводити до формування штамів, які відрізняються за багатьма параметрами:

- рівнем і типом хромосомних аберацій;
- розмахом мінливості клітин за кількістю хромосом і їх модальним класом;
- розподілом клітин за вмістом ядерної ДНК;
- співвідношенням різних фракцій повторюваних послідовностей ДНК;
- структурно-функціональним станом ДНК, зокрема, рівнем метилювання, кількістю і розподілом гетерохроматину по хромосомах та ін.

Зміна умов вирощування у багатьох випадках призводить до зміни співвідношення клітин із різними геномами (зміни генофонду популяції). Штами з різною тривалістю культивування *in vitro* по-різному реагують на зміну культуральних умов. Не сформовані штими, які перебувають у стадії первинної популяції або в періоді становлення, після зміни умов культивування започатковують культуру, що, як правило, відрізняється генетичними та іншими параметрами від вихідної популяції. Зміна умов культивування сформованих штамів (таких, що субкультивувались понад рік) призводить у багатьох випадках до зміни генетичної структури клітинних популяцій, яка найкраще виявляється хромосо-

мним аналізом. Через 2–4 пасажі (інколи пізніше) в змінених умовах спостерігається або стабілізація популяції на новому рівні генетичної гетерогенності, або наближення (повернення) до вихідної генетичної структури популяції. Тобто, сформовані штими (на відміну від тих, які знаходяться в періоді становлення) характеризуються наявністю не лише фізіологічного, а й генетичного гомеостазу, зумовленого переважною дією стабілізуючого добору [122] (див. також [67, розділи 8.3 і 8.4]).

Сформовані штими в стабільних умовах, навіть впродовж десятків років вирощування в промислових масштабах на заводах, рідко змінюють генетичну структуру. Зміна умов культивування міксоплоїдних штамів призводить до збільшення частки диплоїдних клітин, а в диплоїдних штаммах зростає гетерогенність (розмах мінливості) за числом хромосом, іноді спостерігається зміна модального класу. В міру подальшого культивування в змінених умовах у популяції часто відновлюється вихідне співвідношення клітин з різним числом хромосом [117, 123] (див. також [67, розділи 8, 9]).

Створення стабільних клітинних ліній-продуцентів біологічно активних речовин

Описана вище динамічна стабільність генетичної структури сформованих клітинних штамів (стабільність їхнього генофонду) лежить в основі створення і застосування у промисловості клітинних біотехнологій одержання цінної рослинної сировини рослинного походження для потреб медицини, харчової і косметичної промисловості та ін. (подроблиці див. [67, 108, 124–127]).

Розроблена у Відділі генетики клітинних популяцій ІМБІГ НАН України низка таких клітинних ліній і штамів є стабільною за продуктивністю і генетичною структурою впродовж десятків років вирощування як у лабораторних умовах, так і на заводах. Стабільність продуктивності значною мірою зумовлена застосуванням для штамів-продуцентів розробленої нами методики підтримуючого добору та спеціальних складів живильних середовищ й інших умов культивування. Це стосується перш за все найпродуктивніших у світі клітинних штамів раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina*, що стабільно, уже протягом майже 40 років накопичують 1,8–2,2% аймаліну, а також високопродуктивних, у тому числі в промислових умовах зростання, штамів женьшеню *Panax ginseng*, родіоли ро-

жевої (золотого кореня) *Rhodiola rosea*, арнебії барвної *Arnebia euchroma*, унгернії Віктора *Ungernia victoris*, синяка подорожничкового *Echium plantagineum*, деяких видів маку *Papaver* і тирличів *Gentiana* та ін.

За час вивчення біосинтезу вторинних метаболітів у культурі клітин рослин накопичено великий обсяг інформації, який свідчить про існування наступних закономірностей:

- культивовані клітини здатні до синтезу практично всіх класів сполук вторинного (спеціалізованого) обміну (феноли, глікозиди, алкалоїди, у тому числі стероїди, флаваноїди, терпеноїди та ін.);
- первинні культури клітин часто містять незначну кількість сполук спеціалізованого обміну або не містять їх зовсім, проте вміст цих сполук можна значно підвищити шляхом оптимізації складу живильного середовища і підбору умов вирощування, методами клітинної селекції, штучного мутагенезу та ін.;
- синтез деяких конкретних речовин (димерних, індольних і морфінових алкалоїдів, карденолідів і деяких інших) у дедиференційованих культивованих клітинах практично не відбувається; при цьому виявляється чітка тенденція: чим складніша будова речовини і більше специфічних етапів її синтезу (після «відгалуження» від первинного метаболізму), тим менш імовірний синтез цієї сполуки в культурі дедиференційованих клітин; у багатьох випадках синтез вторинних сполук починається тільки в разі появи в клітинній культурі диференційованих (морфогенних) структур;
- синтез і накопичення вторинних сполук, як правило, поліпшується у разі уповільнення або припинення росту клітинної культури;
- стабільність синтезу вторинних сполук неоднакова для різних класів речовин і для різних клітинних культур: синтез стероїдних глікозидів, як правило, стабільний, тоді як синтез багатьох типів алкалоїдів — нестабільний (за винятком, наприклад, індолінових алкалоїдів в отриманих нами клітинних лініях раувольфії зміїної);
- для метаболізму вторинних сполук у культурі клітин рослин часто характерними є регресивні зміни як в онтогенетичному, так і в філогенетичному напрямку; тобто спеціалізований обмін в культурі має ознаки філогенетично архаїчних груп рослин або ювенільної

стадії інтактного рослини (подробіці і посилання див. [67, 124, 125, 128, 129]).

З урахуванням цих особливостей і закономірностей ми створили клітинні штампипродуценти шляхом отримання відповідного (адекватного) генотипу (генофонду) клітинних популяцій, здатних до високоефективного синтезу бажаних сполук і повної реалізації цієї здатності. Технологія створення високопродуктивних штамів і розробки оптимальних умов їх вирощування включає наступні етапи:

- підбір виду рослини-донора: різні види рослин мають неоднакову здатність до синтезу в культурі клітин цільової речовини, наприклад різні види маку в культурі *in vitro* мають неоднакову потенційну здатність до синтезу цільових алкалоїдів;
- підбір високопродуктивної рослини-донора (вихідного генотипу), а інколи — і конкретного її органу чи тканини, для отримання клітинної культури;
- маніпуляції з культурою клітин, включаючи одержання мутантів, соматоклонів й інші підходи клітинної селекції, спрямовані на отримання генетично змінених високопродуктивних штамів (клітинних популяцій із зміненим генофондом);
- розробку складу живильного середовища, умов і способів вирощування, оптимальних для стабільної реалізації генетично обумовленої здатності створених клітинних штамів до синтезу цільових речовин;
- вплив на ріст (проліферацію) клітин в культурі з метою призупинення чи сповільнення росту на певних етапах вирощування культури, що може змінювати метаболізм клітин в напрямку синтезу речовин спеціалізованого обміну: наприклад, успішно застосовують з цією метою інгібітори транскрипції і трансляції;
- пошук сигналів, за допомогою яких в рослинах відбувається управління синтезом вторинних метаболітів у клітинах (елісаторів, неспецифічних стресових факторів і т. д.) і використання їх для підвищення виходу цільового продукту в клітинних культурах;
- отримання органогенних культур, наприклад, культури коренів, що у багатьох випадках спрощує умови культивування та підвищує вміст цільових вторинних метаболітів;
- отримання трансгенних культур (як клітинних і тканинних, так і цілих рослин) з ме-

тою синтезу цільового продукту, наприклад, тваринного походження, вакцин, специфічних білків людини і т. п. (молекулярне фермерство) (подробіці і посилання див. [67, 124–129]).

Ми розробили також математичні моделі, що дозволяють цілеспрямованіше створювати і характеризувати нові клітинні лінії і штами-продуценти біологічно активних речовин рослинного походження (див., наприклад [130–133]).

Рослинний організм як система клітинних популяцій

Протягом онтогенезу в соматичних клітинах рослин відбуваються закономірні зміни геному, напрямок і ступінь прояву яких модифікуються різними чинниками навколишнього середовища і залежать від генотипу. Значну частину таких змін, на нашу думку, слід вважати епігеномною (модифікаційною) мінливістю, оскільки вони є в переважній своїй більшості зворотними і, очевидно, не зачіпають генетичного коду. Це, зокрема:

- подвоєння і подальша мультиплікація ядерного геному в процесі диференціювання клітин, що приводять до полісоматії;
- зміни кількості хромосом, що приводять до міксоплоїдії;
- зміни числа копій різних повторюваних, а іноді — й «унікальних» послідовностей ДНК, що приводить до генетичної гетерогенності (химеризму) клітинних популяцій і тканин, що диференціюються;
- зміни в метилуванні основ ДНК;
- зміни, пов'язані з особливостями структурної упаковки ДНК у вигляді петлевих доменів хроматину та ін.

Геномна мінливість соматичних клітин є результатом, насамперед, програми диференціювання. Поліплоїдизація клітин в онтогенезі — це наслідок наростаючої спеціалізації та різкого посилення специфічних синтезів у процесі реалізації програми розвитку. При цьому диференціальна реплікація ДНК (ампліфікація) і недореплікація певних послідовностей, які відбуваються, як правило, в період зміни фаз росту і репродукції, порушують рівновагу між генами і контролюючими послідовностями, що може викликати формування нових співвідношень між активностями різних генів. У подібному стані клітини набувають характерних особливостей, відсутніх у диплоїдних клітин [134, 135]. Наявність таких особливостей створює нові передумови і можливості для розви-

тку і дії факторів природного добору як на рівні організмів, так і на клітинному (внутрішньоорганізменному) рівні.

Адаптивність геномних змін в соматичних клітинах, що виникають в онтогенезі, в кінцевому підсумку, оцінюється добром, який діє на рівні клітинних популяцій, з яких і складається рослинний організм. (Докази такого добору наведено в багатьох публікаціях, див.: [67, 136–139]).

Істотним у стратегії адаптивності рослин є те, що у них флоральна меристема і репродуктивні органи закладаються, як правило, на порівняно пізніх етапах онтогенезу, після десятків і сотень послідовних клітинних поділів соматичних клітин, які, безсумнівно, пройшли сито клітинного добору і можуть містити адаптивні відселектовані зміни геному. Ця особливість рослин відіграє ключову роль в реалізації можливості успадкування адаптивних ознак (реорганізації геному), що виникли в процесі онтогенезу.

Складна ієрархічність будови рослинних популяцій і самих рослин є додатковим джерелом мінливості, яка зумовлює варіації в репродуктивній стратегії рослин. Зокрема, мінливість в популяціях соматичних клітин супроводжується мінливістю в популяціях генеративних клітин: одночасно з клітинами з гаметним числом хромосом зустрічаються клітини зі зміненим, часто з соматичним числом хромосом. Онтогенетичні варіації числа хромосом у соматичних клітинах (міксоплоїдія) здатні впливати на репродуктивні властивості рослин і дозволяють їм переходити в разі необхідності від статеві репродукції до партеногенезу або від вегетативного розмноження до статевої репродукції (див. [106, 140–144]), що, безсумнівно, ще більше сприяє можливості передавати набуті в онтогенезі адаптивні ознаки в поколіннях. Існує обґрунтоване припущення, що саме стресові умови зростання рослин є чинником, який дестабілізує систему насінневого розмноження, а сама дестабілізація системи розмноження носить адаптивний характер для популяцій і видів рослин [140].

Ще у 2000 р. М. Голубовський підкреслював, що успадкування набутих ознак не суперечить сучасним концепціям молекулярної генетики, а епімутації (спадкові зміни характеру генної активності, що не є пов'язаними зі змінами в тексті ДНК і носять масовий, спрямований і зворотній характер) стали активно досліджуваним явищем [145]. Проведені в останні роки теоретичні та експериментальні дослідження лягли в основу нових уявлень про спадкування набутих

ознак. Встановлено, що деякі з набутих ознак (що їх називають, як правило, епімутаціями) можуть успадковуватися в низці як клітинних, так і спорофітних поколінь. Успадковані ознаки можуть підвищувати адаптивність організмів, брати участь в еволюційних подіях. Ці і близькі погляди відомих учених викладено у великій кількості публікацій (див., наприклад, [86, 87, 137, 146–157]).

На підставі викладених і безлічі інших, наявних у літературі даних про особливості геномної мінливості в онтогенезі, ми зробили наступний висновок:

- Рослина — це система клітинних популяцій, яка характеризується пластичністю свого генофонду, в основі якого лежить пластичність (динамічність) геному соматичних клітин, що при взаємодії з клітинним добром забезпечує адаптивність рослини як цілісного організму і створює можливість успадкування (передачі нащадкам) адаптивних геномних змін, набутих протягом онтогенезу. Більшість таких змін слід віднести до епігеномної мінливості, оскільки вони, очевидно, не зачіпають генетичного коду і, в принципі, є зворотними, що особливо яскраво проявляється в процесах дедиференціювання — редиференціювання [86, 87, 158].

Таким чином, пристосувальні ознаки організму, в кінцевому рахунку, визначаються адаптивними змінами клітин, з яких він складається.

Деякі закономірності мінливості культивованих клітин і рослин-регенерантів

Накопичені результати свідчать про наявність певних закономірностей геномної мінливості у популяціях культивованих клітин: ті зміни, які відбувалися в культивованих клітинах, у природі зумовлювали як внутрішньовидову, так і навіть міжвидову варіабельність. Це встановлено як на хромосомному рівні, так і на рівні різних послідовностей ДНК. Зроблено висновок про не випадковий характер змін геномів культивованих клітин вивчених видів рослин, а саме про їх подібність до змін, які відбувалися в природі у процесі видоутворення, про певну єдність механізмів адаптації та еволюції геному рослин у природі та в культурі *in vitro* [86, 87, 89–97, 158, 159].

Аналіз біохімічних змін також свідчить про те, що в деяких випадках мінливість *in vitro* може виходити і за межі роду і навіть нагадувати представників інших родів цієї родини. Напри-

клад, для тропічної лікарської рослини раувольфії зміної *R. serpentina* у природі властиве накопичення кількох десятків алкалоїдів, здебільшого резерпіну. Культивовані клітини також здатні накопичувати цінні алкалоїди (клітинна селекція дозволила отримати штами-суперпродуценти за деякими алкалоїдами — див. [67, 108, 124, 127]), але серед них резерпіну практично немає, а близько 90 % від суми алкалоїдів становлять аймалін та в деяких випадках воміленін. Тобто, за цією біохімічною ознакою культивовані клітини *R. serpentina* нагадують клітини інтактних організмів інших видів роду: *R. canescens* або *R. vomitoria* залежно від спектра і кількості синтезованих алкалоїдів [108, 128]. Також відомо, що культивовані клітини різних видів маку, зокрема *Papaver bracteatum* та *P. somniferum*, звичайно не накопичують морфінних алкалоїдів. У їхній біомасі переважають сангвінарин та його похідні у кількості та співвідношеннях близьких до таких у клітинах інтактних рослин іншого виду з родини *Papaveraceae* — Маклея. Подібних прикладів описано чимало [67, 92, 93, 128, 129].

Виявлена особливість — каналізованість геномних змін у процесі адаптації клітин до умов росту *in vitro* — певною мірою дає можливість прогнозувати ці зміни і вести цілеспрямований пошук соматональних варіантів подібно тому, як це використовують у роботі з інтактними рослинами на основі закону гомологічних рядів у спадковій мінливості М. І. Вавилова (див. [160]). Експериментально це було доведено у роботі з кукурудзою — після клітинної селекції отримано рослини-регенеранти з новими ознаками, які раніше виявляли лише у рідкісних випадках у окремих генотипів (ліній), зокрема, отримано соматональні варіанти з високою успадкованою здатністю до регенерації цілих рослин [161, 162].

Однак не всі геномні зміни, що спостерігаються в популяціях культивованих клітин, виявляються на рівні рослин-регенерантів. Регенерація рослин у тривалий час культивованих штаммах із суттєво перебудованим геномом індукуюється з низькою частотою, більшість отриманих регенерантів є аномальними і, як правило, багато з них гине на ранніх етапах онтогенезу. Отримані життєздатні регенеранти мають, як правило, нормальний каріотип, вони диплоїдні, рідше — тетраплоїдні, частота рослин із значними перебудовами геному серед них є низькою. Це встановлено нами на прикладі багатьох видів рослин [67, розділ 7.3], див. також [163–165].

На основі отриманих результатів ми зробили висновок про те, що в генетично гетерогенних популяціях здатність до регенерації мають переважно диплоїдні, рідше — тетраплоїдні клітини без видимих хромосомних аберацій [166–169]. Певним винятком з цього правила є деякі поліплоїдні і гібридні за походженням види рослин, серед регенерантів яких значно частіше трапляються форми з перебудовами числа і зміненою морфологією хромосом. Ця особливість культивованих клітин і зумовила практично крах сподівань і надій, які покладали на культуру ізольованих клітин і тканин як на невичерпне джерело нових форм рослин із раніше невідомими ознаками, цінних для генетико-селекційної роботи. На сьогодні соматональними варіантами з принципово новими ознаками отримано одиниці (підтвердження і посилання див. [67, 92, 93, 108, 159, 160, 163, 168–174]).

Отже, перебудови геному, які виявляються в культивованих клітинах і в рослинах-регенерантах, підкоряються закону гомологічних рядів у спадковій мінливості М. І. Вавилова. При цьому розмах мінливості серед культивованих клітин може інколи виходити і за межі роду, а серед рослин-регенерантів розмах соматональної мінливості лише в окремих випадках виходить за межі конкретного виду рослин. Найчастіше мінливість серед рослин-регенерантів, отриманих від одного генотипу, лежить у межах популяційної мінливості виду вихідної рослини.

Заключення. Пластичність геному соматичних клітин і адаптивність рослин

Наразі культивовані *in vitro* клітини і тканини еваріотів є основою сучасних клітинних і генних технологій. Серед них варто згадати клітинні технології оздоровлення, збереження і прискореного мікроклонального розмноження унікальних генотипів, у тому числі із використанням методу кріоконсервації; створення принципово нових генотипів (організмів) методами клітинної і генної інженерії та клітинної селекції; отримання біологічно активних речовин, у тому числі рекомбінантних, із біомаси культивованих клітин і тканин для потреб медицини, косметичної та харчової промисловостей; методи клітинної терапії, у тому числі і технології, що ґрунтуються на використанні стовбурових клітин тощо.

Не менше широко культивовані клітини використовують і як модельні об'єкти і біологічні системи для вивчення найактуальніших проблем сучасної біології: особливостей перебігу, сигнальних шляхів і механізмів клітинної пролі-

ферації, у тому числі онкогенезу і пухлинної проліферації; дедиференціювання клітин, у тому числі їх перехід до стану стовбуровості; тотипотентності, плюрипотентності і омніпотентності; регенерації тканин, окремих органів і цілісних організмів та ін.

Багаторічне вивчення динаміки генетичної структури клітинних популяцій, ролі і особливостей дії добору в процесі адаптації клітин до умов вирощування *in vitro*, мінливості та особливостей еволюції за тривалого вирощування у пасивованій культурі протягом 25–30 років і довше дозволяє зробити наступні узагальнення:

- культура клітин *in vitro* є динамічною біологічною системою — клоновою популяцією, яка розвивається (еволюціонує) в результаті дії основних рушійних чинників еволюції — мінливості, спадковості, добору і дрейфу генів (генотипів); взаємодія цих процесів зумовлює біологічні особливості кожної конкретної клітинної лінії, що вирощується в конкретних умовах;
- процес адаптації клітин до умов тривалого культивування *in vitro* складний і багатоступінчастий; на різних стадіях формування культури *in vitro* (дедиференціювання клітин і їх подальшої проліферації, перших пасажів *in vitro*, тривалого субкультивування) спостерігаються різні типи і рівні мінливості, діють різні типи природного добору — дестабілізуючий, рушійний (спрямований) або, переважно, стабілізуючий;
- індукція процесів дедиференціювання і подальшої проліферації клітин передбачає перепрограмування геному, «ювенілізацію» його стану, перехід клітинного геному із «спеціалізованого» у стан, характерний для стовбурових клітин;
- у процесі адаптації клітин до умов росту *in vitro* можна виділити три періоди: первинної популяції ізольованих клітин, становлення штаму, сформованого штаму; поділ на періоди визначається типом, напрямом та жорсткістю «природного» добору, що діє в клітинній популяції;
- для клітинних популяцій сформованих (адапованих до росту *in vitro*) штамів характерною є наявність фізіологічного і генетичного гомеостазу, які обумовлені здебільшого дією стабілізуючого добору;
- сформовані штами є генетично (і фізіологічно) гетерогенними клітинними популяціями; розмах мінливості в них для деяких видів рослин (їх окремих генотипів?) за деякими

ознаками може, в окремих випадках, перевищувати міжвидову мінливість у природі;

- значна частина реорганізацій геному культивованих клітин є каналізованою: мінливість, яка спостерігається в культурі *in vitro*, часто є подібною до природної мінливості рослин споріднених видів; змін зазнають переважно ті послідовності ДНК, які характеризуються природними міжвидовими відмінностями всередині роду; окремі (перебудовані в культурі *in vitro*) послідовності нагадують послідовності, властиві геному інтактних рослин близьких видів у природі; домінування у генетично гетерогенних популяціях каналізованих змін може свідчити про адаптивність саме таких змін геному;
- генетичний поліморфізм культивованих клітин, отриманих від однієї рослини (генотипу), може відображати (відновлювати) весь, або, принаймні, значну частину як внутрішньопопуляційного, так і міжпопуляційного поліморфізму, властивого даному виду рослин у природі;
- подібність геномних змін, що спостерігаються у процесі адаптації клітин до умов росту *in vitro* і геномної мінливості в природі, у тому числі в процесі видоутворення, свідчить про можливість застосування закону гомологічних рядів у спадковій мінливості М. І. Вавилова до культури клітин; це дозволяє прогнозувати особливості геномної мінливості *in vitro*;
- подібність геномної, зокрема хромосомної, еволюції клітинних культур та змін, які лежать в основі видоутворення, має безумовно важливе значення для розуміння деяких закономірностей еволюційного процесу і надає можливість моделювати його на клітинному рівні *in vitro*;
- значна частина геномних змін, що виникають і тестуються в культивованих клітинах, не виявляється в рослинах-регенерантах; клітини з глибоко реорганізованим геномом не можуть регенерувати життєздатну рослину; це зменшує реальність сподівань на отримання соматоклональних варіантів із властивостями, раніше невідомими селекціонерам; насамперед це стосується видів рослин із простими (не поліплоїдними) геномами;
- встановлення особливостей та виявлення основних чинників і рушійних сил геномної мінливості клітинних популяцій *in vitro* дає змогу певною мірою регулювати не лише генетичну структуру клітинних популяцій, а

й функціонування їхнього геному, зокрема біосинтез вторинних метаболітів; завдяки чому створено високопродуктивні клітинні лінії і штами рідкісних та особливо цінних лікарських рослин — альтернативне джерело екологічно чистої рослинної лікарської сировини.

- Викладені вище в узагальненому вигляді дані дозволили нам зробити наступне припущення:
- Будь-яка соматична клітина з живим (функціонально активним) ядром при її ізолюванні та подальшому вирощуванні в умовах культури *in vitro* внаслідок процесів дедиференціювання і «соматоклональної» мінливості (остання відбувається в рамках закону гомологічних рядів у спадковій мінливості М. І. Вавилова), може відновити у своїх нащадках, в тому числі серед рослин-регенерантів, генетичний поліморфізм (або, принаймні, значну його частину), властивий даному виду, а можливо, навіть і роду рослин. Ця особливість соматичних клітин відкриває нові горизонти як у клітинній біології і теорії еволюції, так і в різних напрямках прикладних досліджень, у тому числі і для збереження і відновлення природного поліморфізму за культивування клітин і тканин в ізолюваних умовах *in vitro* на штучних живильних середовищах.

References

1. Butenko R. G. First All-Union conference of culture of isolated plant organs, tissues and cells. Moscow, 22–26 January 1968. *Physiology of Plants* (Moscow). 1968. V. 15, N. 5. P. 941–943. (In Russian).
2. *Kultura izolirovannyh organov, tkanej i kletok rastenij*. Proceedings of the First All-Union Conference. Moscow, January 22–26, 1968. R. G. Butenko (Ed.). Moskva, Nauka, 1970. 342 p. (In Russian).
3. Kunakh V. A. Osnovni napryamy moyikh naukovykh doslidzen' za 50 rokiv (1966–2016 rr.). *Kunakh Viktor Anatoliyovych: Biobibliografichnyy pokazhchyk naukovykh prats' za 1966–2016 roky / uklad. L. P. Mozhylevska, M. Z. Mosula, I. O. Andryeev. N. M. Drobyk* (Ed.). Ternopil': Pidruchnyky i posibnyky, 2017. P. 25–95. (In Ukrainian).
4. Gautheret R. J. *La culture des tissus vegetaux. Techniques et realisations*. Paris, 1959. 868 p.
5. Gautheret R. J. Histogenesis in plant tissue cultures. *J. Nat. Cancer Inst.* 1957. Vol. 19. P. 555–564.
6. Buvat R. Recherches sur la dedifferentiation des cellules vegetales. *Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. veg.* 1944. No. 5. P. 1–130.
7. Buvat R. Recherches sur la dedifferentiation des cellules vegetales *Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. veg.* 1945. No. 6. P. 1–119.

8. Bartos J. Dělení buněk v kulturách casti kořene mrkve (*Daucus carota*). *Českosl. biol.* 1954. No. 3. P. 206–211.
9. Tulecke W. R. The pollen of *Ginkgo biloba*. *In vitro* culture and tissue formation. *Am. J. Bot.* 1957. V. 44, No. 5. P. 602–608.
10. Melchers G., Bergman L. Untersuchungen an Kulturen von haploiden Geweben von *Antirrhinum majus*. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 1959. V. 71, N. 4. P. 459–473.
11. Straus J. Maize endosperm tissue grown *in vitro*. II. Morphology and Cytology. *Am. J. Bot.* 1954. V. 41. P. 833–839.
12. Partanen C. R. Quantitative chromosomal changes and differentiation in plants. *Developmental cytology*. New York: Ronald Press. 1959. P. 21–45.
13. Partanen C. R. Plant tissue culture in relation to developmental cytology. *Intern. Rev. Cytol.* 1963. Vol. 15. P. 215–243.
14. Mitra J., Mapes M. O., Steward F. C. Growth and organised development of cultured cells. IV. The behaviour of the nucleus. *Am. J. Bot.* 1960. Vol. 47, No. 5. P. 357–368.
15. Torrey J. G. Differential mitotic response of diploid and polyploid nuclei to auxin and kinetin treatment. *Science*. 1958. Vol. 128. P. 1148.
16. Torrey J. G. Experimental modification of development in the root. *Cell, organism and milieu*. N. Y. Roland Press. 1959. P. 189–222.
17. Torrey J. G. Kinetin as trigger for mitosis in nature endomitotic plant cells. *Exptl. Cell Res.* 1961. V. 23. P. 281–299.
18. Kallak H. I., Jarvekulg L. J. On the morphological and cytological variety of Pea callus. *Cytol. Genet.* 1968. Vol. 2, No. 5. P. 408–414.
19. Kallak H. I., Jarvekulg L. J. Cytogenetic studies on pea callus. *Kultura izolirovannyh organov, tkanej i kletok rastenij*. R.G. Butenko (Ed.). Moskva, Nauka, 1970, P. 140–143 (in Russian).
20. Mitra J., Steward F. C. Growth induction in cultures of *Haplopappus gracillis*. II. The behavior of the nucleus. *Am. J. Bot.* 1961. Vol. 48, No. 5. P. 358–368.
21. Venketeswaran S. Tissue culture studies of *Vicia faba*. II. Cytology. *Caryologia*. 1963. Vol. 16, No. 1. P. 91–100.
22. Cooper L. S., Cooper D. C., Hilderbrandt A. S., Ricker A. J. Chromosome numbers in single cell clones of tobacco tissue. *Am. J. Bot.* 1964. Vol. 51, No. 3. P. 284–290.
23. Kallak H. I. Cell division and chromosome numbers in the tissue culture of *Nicotiana tabacum*. *Biol. Plant.* 1968. Vol. 10, No. 3. P. 199–204.
24. Patau K., Das N. K. The relation of DNA synthesis and mitosis in tobacco pith tissue cultured *in vitro*. *Chromosoma*. 1961. Vol. 11. P. 553–572.
25. Fox J. Growth factor requirements and chromosome number in tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 1965. Vol. 16, No. 4. P. 793–803.
26. Melchers G. Einige genetische Gesichtspunkte zu sogenannten Gewebekulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 1965. B. 78, No. 11. P. 21–29.
27. Murashige T., Nakano R. Morphogenetic behavior of tobacco tissue culture and implication of plant senescence. *Am. J. Bot.* 1962. V. 52, No. 8. P. 819–827.
28. Shamina Z. B., Butenko R. G., Tarasov V. A. Cytological investigation of s tissue-culture of the tobacco plant. *Genetika (Moscow)*. 1966. No. 1. P. 70–76 (in Russian).
29. Sacristan M. D. Auxin-Autotrophie und Chromosomen Zahl Untersuchungen an alten, spontan habituierten und crowngall Kalluskulturen von *Nicotiana tabacum* aus dem Laboratorium Gauthereits. *Molec. Gen. Genet.* 1967. Vol. 99, No. 4. P. 311–321.
30. Shimada T., Tabata M. Chromosome numbers in cultured pith tissue of tobacco. *Japan J. Genet.* 1967. Vol. 42, No. 4. P. 13–18.
31. Vasil V., Hildebrandt A. C. Further studies on the growth and differentiation of single, isolated cells of tobacco *in vitro*. *Planta*. 1967. Vol. 75, No. 2. P. 139–151.
32. Kallak H. Cell division and chromosome numbers in the tissue culture of *Nicotiana tabacum*. *Acta. Biol. Acad. Sci. Hunh.* 1968. Vol. 22, No. 1. P. 67–73.
33. Asuwa N. Progressive change in organ-forming capacity of tobacco callus during single subculture period. *Japan J. Genet.* 1972. Vol. 47, No. 1. P. 53–60.
34. Jeoman M. M., Evans P. K., Naik G. G. Changes in mitotic activity during early callus development. *Nature*. 1966. Vol. 209, No. 5028. P. 1115–1116.
35. Murashige T., Nakano R. Chromosome complement as a determinant of the morphogenic potential of tobacco cells. *Am. J. Bot.* 1967. Vol. 54, No. 8. P. 963–970.
36. Kallak H. I., Jarvekulg L. J. Cytogenetic characteristic of some strains of callus pea. *Genetic of grain legumes*. Orel. 1972. P. 7–16 (in Russian).
37. Zossimovich V. P., Levenko B. A., Yurkova G. N., Legeida V. S. Isolation of strains of *Crepis capillaris* of different ploidy in tissue culture. *Rep. Acad. Sci. USSR. Ser. Biology*. 1972. Vol. 203, No. 4–6. P. 1188–1189 (in Russian).
38. Blakely L., Steward F. Growth and organized development of cultured cells. VII. Cellular variation. *Am. J. Bot.* 1964. Vol. 51, No. 7. P. 809–817.
39. Jamada 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. Mag. Tokyo*. 1964. Vol. 77, No. 918. P. 436–446.
40. Shamina Z. B., Frolova L. V. Cytogenetic studies on tissue culture of *Haplopappus* during prolonged cultivation. *Kultura izolirovannyh organov, tkanej i kletok rastenij*. R.G. Butenko (Ed.). Moskva: Nauka, 1970. P. 149–154 (in Russian).
41. Kunakh V. A. Cytogenetic behavior of tissue culture of *Haplopappus*. *Kultura izolirovannyh organov, tkanej i kletok rastenij*. R.G. Butenko (Ed.). Moskva: Nauka, 1970. P. 155–158 (in Russian).
42. Sidorenko P. G., Kunakh V. A. Character of caryotype variability in cell population of tissue culture of *Haplopappus gracilis* with long-term

- passaging. *Cytol. Genet. (Tsitologiya i genetika)*. 1970. Vol. 4, No. 3. P. 235–241 (in Russian).
43. Kunakh V. A. Cytogenetic differences in strains of tissue cultures of leaf and stem origin in *Haplopappus gracilis* (Nutt.) Gray. *Cytol. Genet. (Tsitologiya i genetika)*. 1971. V. 5, No. 3. P. 241–249. (in Russian).
 44. Kunakh V. A., Mozhilevskaja L. P. Wlijanije ishodnogo materiala i pitatelnoj sredy na hromosomnuju ismenchivost kletok *Haplopappus gracilis* v culture *in vitro*. *Voprosy molekularnoy biologii i genetiki*. S. M. Gershenson (Ed). Kiev: Nauk. Dumka. 1972. P. 17–18 (in Russian).
 45. Sidorenko P. G., Kunakh V. A. Production of culture of isolated tissues of *Haplopappus gracilis* and *Crepis capillaris* and their cytogenetic characteristic. *Cytol. Genet. (Tsitologiya i genetika)*. 1972. Vol. 6, No. 6. P. 483–486 (in Russian).
 46. Gupta S. Tissue culture of *Nigella sativa*. I. The behaviour of nucleas. *Experientia*. 1972. Vol. 28, No. 4. P. 441–445.
 47. Ravkin A. S., Popov Ya. Cytogenetic activity, genomic and chromosomal changes in cells apple tree tissue culture. *Cytol. Genet. (Tsitologiya i genetika)*. 1973. Vol. 7, No. 1. P. 33–36. (in Russian).
 48. Zagorska N. A., Shamina Z. B., Butenko R. G. Investigation of tobacco plants obtained by regeneration from a tissue culture. *Genetika* (Moscow). 1971. Vol. 7, No. 3. P. 23–63 (in Russian).
 49. Staudt G., Borner H. C., Becker H. Untersuchungen über die Kallusbildung von di- und tetraploiden Reben *in vitro*. *Vitis*. 1972. Vol. 1. P. 1–9.
 50. Srivastava P. S. *In vitro* induction of triploid roots and shoots from nature endosperm of *Jatropha panduræfolia*. *Z. Pflanzenphysiol.* 1971. Vol. 66, No. 1. P. 93–96.
 51. Torok D., Roderick T. N. Association between growth rate, mitotic frequency and chromosome number in a plant tissue culture. *Cancer Res.* 1962. Vol. 22, No. 2. P. 174–181.
 52. Bennici A., Buiatti N., D'Amato P., Pagliani M. Nuclear behavior in *Haplopappus gracilis* callus grown *in vitro* on different culture media. *Collq. Int. CNRS*. 1968. Vol. 193. P. 245–250.
 53. Binding H., Binding K., Straub J. Selektionen Gewebekulturen mit haploiden Zellen. *Naturwiss.* 1970. Vol. 57, No. 3. P. 138–139.
 54. Zenkteler M. A., Gurowska J. Cytological studies on the regenerating nature female gametophyte of *Taxus baccata* T. and nature endosperm of *Tilia platyphylles* Scop. *in vitro* culture. *Acta Soc. Botan. Polon.* 1970. Vol. 39, No. 1. P. 161–175.
 55. Sacristan M. D. Karyotypic changes in callus cultures from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* (L.) Wallr. *Chromosoma*. 1971. Vol. 33. P. 275–283.
 56. Levenko B. A., Kunakh V. A., Yurkova G. N. Tsitogeneticheskoje izutschenije kallusnoj tkani haploidhoho proishozhdenija. *Ekspierimentalnaja poliploidija u kulturnyh rastenij*. V.P. Zossimovich (Ed.). Kiev: Naukova dumka. 1974. P. 173–180 (in Russian).
 57. Mar'yakhina I. A., Butenko R. G. Somaticheskaya reduksiya v culture tkani kapusty. *Tsitologiya i genetika (Cytol. Genet.)* 1974. Vol. 8, No. 3. P. 267–269 (in Russian).
 58. Kunakh V. A. Poliploidija v kulture kletok *in vitro* i jejo wozmozhnyje pritschiny. *Ekspierimentalnaja poliploidija u kulturnyh rastenij*. V. P. Zossimovich (Ed.). Kiev: Naukova dumka, 1974. P. 39–57 (in Russian).
 59. Kunakh V. A. Cytogenetic studies on cell populations in culture of isolated plant tissues: *Ph. D. Thesis (03.00.15-Genetics)*. Kiev, 1975. 16 P. (in Russian).
 60. Zossimovich V. P., Kunakh V. A. Frequency, type and origin of chromosome aberrations in plant tissue cultures. *Genetika* (Moscow). 1975. Vol. 11, No. 6. P. 37–46 (in Russian).
 61. Kunakh V. A. Features of structural mutagenesis in cultured plant cells populations. *Uspekhi sovrem. genetiki*. N. P. Dubinin (Ed.). Moscow: Nauka. 1984. Vol. 12. P. 30–62.
 62. Eriksson T. Physiological and cytological studies on cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Acta univ. Upsal. Abstr. Diss. Sci.* 1967. Vol. 93. P. 11.
 63. Kovalyeva T. A., Shamina Z. B., Butenko R. G. Cytological studies of the tissue culture of *Rauwolfia serpentina* Benth. *Genetika* (Moscow). 1968. Vol. 4, No. 5. P. 5–13 (in Russian).
 64. Kovalyeva T. A. Cytomorphological studies on tissue culture of *Rauwolfia serpentina* Benth. *Kultura izolirovannyh organov, tkanej i kletok rastenij*. R. G. Butenko (Ed.). Moskva: Nauka, 1970. P. 136–139. (in Russian).
 65. Sacristan M. D., Wendt-Gallitelli M. P. Tumorous cultures of *Crepis capillaris*. *Chromosoma*. 1973. Vol. 43, No. 3. P. 279–288.
 66. Norstog K., Wall W., Howland C. Cytological characteristics of ten-year-old ryegrass endosperm tissue culture. *Bot. Ges.* 1969. Vol. 130, No. 2. P. 83–86.
 67. Kunakh V. A. Biotechnology of medicinal plants. Genetic, physiological and biochemical basis. Kyiv: Logos, 2005. 724 p. (in Ukrainian).
 68. Libbenga K. E., Torrey J. W. Hormone-induced endoreduplication prior to mitosis in cultured pea root cortex cell. *Am. J. Bot.* 1973. Vol. 60, No. 4. P. 293–299.
 69. Phillips R., Torrey J. DNA synthesis, cell division and specific cytodifferentiation in cultured pea root cortical explants. *Developm. Biol.* 1973. Vol. 31, No. 2. P. 336–347.
 70. Reinert J., Torrey J. Über die Kultur von Geweben aus *Haplopappus gracilis*. *Naturwissenschaften*. 1961. Vol. 48, No. 5. P. 132–133.
 71. Venketeswaran S., Spiess E. B. Tissue culture on *Vicia faba*. III. Effect of growth factors on chromosome morphology. *Cytologia*. 1963. Vol. 28, No. 2. P. 201–212.
 72. Torrey J. G., Reinert J., Merkel N. Mitosis in suspension cultures of higher plant cells in a

- synthetic medium. *Am. J. Bot.* 1962. Vol. 49, No. 4. P. 420–425.
73. Kallak H., Yarvekylg L. On the cytogenetic effects of 2,4-D on pea callus in culture. *Acta Biol. Acta Sci. Hung.* 1971. Vol. 22, No. 1. P. 67–75.
 74. Bennici A., Buiatti N., D'Amato F., Pagliai M. Nuclear behavior in *Haplopappus gracilis* callus grown in vitro on different culture media. *Cells Int. CNRS.* 1971. Vol. 193. P. 245–250.
 75. Demoise C., Partanen C. Effect of subculturing and physical condition of medium on the nuclear of a plant tissue culture. *Am. J. Bot.* 1969. Vol. 56, No. 2. P. 147–152.
 76. Wright K., Northcote D. H. Differences in ploidy and degree of intercellular contact in differentiating and non differentiating sycamore calluses. *J. Cell Sci.* 1973. Vol. 12, No. 1. P. 37–53.
 77. Strogonov B. P., Butenko R. G., Shamina Z. B., Kulieva F. B. Cytogenetic action of NaCl on the culture of tissue of *Crepis capillaris*. *Rep. Acad. Sci. USSR, Ser. Biology.* 1973. Vol. 209, No. 1–3. P. 243–245 (in Russian).
 78. Hsu T. C., Kellog D. S. Jr. Mammalian chromosomes in vitro. XII. Experimental evolution of cell populations. *J. Nat. Cancer Inst.* 1960. Vol. 24, No. 5. P. 1067–1093.
 79. Hsu T. C. Chromosomal evolution in cell populations. *Internat. Rev. Cytology.* 1962. Vol. 12. P. 69–161.
 80. Hughes D. T. Cytogenetical polymorphism and evolution in mammalian somatic cell populations in vivo and in vitro. *Nature.* 1968. Vol. 217. P. 518–523. Doi: 10.1038/217518a0.
 81. Olenov Yu. M. Kletchnaya nasledstvennost, differentsirovka kletok i kantserogenez kak problemy evolyutsionnoy genetiki. L.: Nauka. 1967. 310 p. (in Russian).
 82. Vakhtin Yu. B. Geneticheskaya teoriya kletochnykh populyatsiy. L.: Nauka. 1980. 168 p. (in Russian).
 83. Vakhtin Yu. B., Pinchuk V. G., Shvemberg I. N., Butenko Z. A. Klonal'no-selektsionnaya kontseptsiya opukholevogo rosta. Kiev: Naukova dumka. 1987. 216 p. (in Russian).
 84. Dobzhansky Th. Mendelian populations and their evolution. *Genetics in 20th century.* U. C. Dunn (ed.) New York: Acad. Press. 1952. P. 573–589.
 85. Gavrilov V. I. Perevivayemye kletki v virusologii. Moskva: Meditsina. 1964. 264 p. (in Russian).
 86. Kunakh V. A. Plastichnost' genoma somaticheskikh kletok i adaptivnost' rasteniy. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika.* Minsk. 2011. Vol. 12. P. 7–14. (in Russian).
 87. Kunakh V. A. Ontogeneticheskaya plastichnost' genoma kak osnova adaptivnosti rasteniy. *Zhebrakovskiyeh chteniya III. Inst. Genetiki i Tsitologii NAN Belarusi.* Otv. red. A.V. Kil'chevskiy. Minsk. 2011. 56 p. (in Russian).
 88. Kordium V. A. Nasha «shagrenevaya kozha» — eto nasha problema. *Nam yeye i reshat'.* Kiev: Logos. 2006. 264 p. (in Russian).
 89. Solov'yan V. T., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Genome rearrangements in cultured *Rauwolfia serpentina* cells: Diverse pattern of genome variation. *Genetika (Moscow).* 1994. Vol. 30, No. 2. P. 250–254. (in Russian).
 90. Solov'yan V. T., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Genome rearrangements in cultured *Rauwolfia serpentina* cells. II. Relation to interspecific variation. *Genetika (Moscow).* 1994. Vol. 30, No. 3. P. 399–403. (in Russian).
 91. Solov'yan V. T., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Special features of genomic variation of cell culture of *Rauwolfia serpentina*. *Cytol. Genet.* 1994. Vol. 28, No. 5. P. 21–25.
 92. Kunakh V. A. Evolyutsiya genomu roslyn v kulturi klityn *in vitro*. Osoblyvosti, prychny, mekhanizmy ta naslidky. *Henetika i selektsiya v Ukrayini na zlami tetsyacholit.* V. V. Morgun et al. (Eds.). K.: Logos. 2001. P. 53–67.
 93. Kunakh V. A. Mechanisms and some regularities to somaclonal variability of plants. *Visn. Ukr. tov. genet. sel.* 2003. No. 1. P. 101–106. (in Ukrainian).
 94. Andreev I. O., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Plant genome rearrangements in cell in vitro. *Biopol. Cell.* 2004. Vol. 20. No. 1–2. P. 42–49.
 95. Andreev I. O., Spiridonova K. V., Solov'yan V. T., Kunakh V. A. Variability of ribosomal RNA genes in *Rauwolfia* species: parallelism between tissue culture-induced rearrangements and interspecies polymorphism. *Cell Biol. Internat.* 2005. Vol. 29. P. 21–27.
 96. Kunakh V. A., Andreev I. O., Spiridonova K. V. 18S-25S and 5S pPHK interspecies polymorphism and variability in tissue culture of *Rauwolfia Benth.* and *Gentiana L.* *Physiol. Biochem. Cultiv. Plants.* 2009. Vol. 38, No. 2. P. 110–123. (in Ukrainian).
 97. Andreev I. O., Spiridonova K. V., Maidanyuk D. M., Kunakh V. A. Genetic effects of tissue culture on maize. *Physiol. Biochem. Cultiv. Plants.* 2009. Vol. 41, No. 6. P. 487–495. (in Ukrainian).
 98. Severtsov A. N. Glavnyye napravleniya evolyutsionnogo protsesa. *Morfobiologicheskaya teoriya evolyutsii.* M.-L.: Biomedgiz. 1934. 150 p. (in Russian).
 99. Kunakh V. A. Genome variability in plant somatic cell. III. Callus formation in vitro. *Biopol. Cell.* 1997. Vol. 13, No. 5. P. 362–371. (in Russian).
 100. Kunakh V. A. Variation of the plant genome upon dedifferentiation and callus formation in vitro. *Russ. J. Plant Physiol.* 1999. Vol. 46, No. 6. P. 919–929.
 101. Twardovska M. O., Drobyk N. M., Mel'nyk V. M., Konvalyuk I. I., Kunakh V. A. Genome variability of some *Gentiana L.* species in nature and in culture in vitro: RAPD-analysis. *Biopol. Cell.* 2010. Vol. 26, No. 6. P. 499–507.
 102. Bubyk O. M., Andreev I. O., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. The variability of PCR markers based on the genes of disease resistance and the response to abiotic stress in tissue culture. *Fakt. Experimental Evolution of Organisms.* V. A. Kunakh et al. (Eds.). K.: Logos. 2011. Vol. 11. P. 213–218.

103. Konvalyuk I. I., Mel'nyk V. M., Drobyk N. M., Kravets N. B., Twardovska M. O., Kunakh V. A. RAPD- and ISSR-analysis of genetic variation of *Gentiana pneumonanthe* L. tissue and organ culture. *Visn. Ukr. tov. genet. sel.* 2011. Vol. 9, No. 1. P. 22–31.
104. Konvalyuk I. I., Drobyk N. M., Mel'nyk V. M., Twardovska M. O., Kravets N. B., Kunakh V. A. RAPD- and ISSR-analysis of the culture of tissues and organs of *Gentiana lutea* L. *Achievements and problems of genetics, breeders and biotechnology*. V. A. Kunakh et al. (Eds.). Kyiv: Logos. 2012. Vol. 4. P. 523–527. (In Ukrainian).
105. Kunakh V. A. Genome variation in plant somatic cells and factors regulating this process. *Cytol. Genet.* 1980. Vol. 14, No. 1. P. 73–81.
106. Lutova L. A., Ezhova T. A., Dodueva I. E., Osipova M. A. Genetics of plants development. S. G. Ingevechtomov (ed.) 2 ed. revised and enlarged. SPb.: Publ. house N-L. 2010. 432 p. (In Russian).
107. Gubar E. K., Kunakh V. A. Karyotype variability of cultured *Crepis* cells (*Crepis capillaris* L. Wallr.). *Genetika* (Moscow). 1992. V. 28, N. 6. P. 51–61. (In Russian).
108. Kunakh V. A. Somaclonal variation in *Rauwolfia*. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. V. 36. *Somaclonal variation in crop improvement*. II. J. J. Bajaj (Ed). Berlin, Heidelberg, New York: Springer. 1996. P. 315–332.
109. Spiridonova K. V., Andreev I. O., Solov'yan V. T., Kunakh V. A. Peculiarities of some gene rearrangement in the cell culture of *Rauwolfia serpentina* Benth. in vitro. *Dopovidi NAN Ukr.* 2000. No. 2. P. 165–170. (In Ukrainian).
110. Spiridonova K. V., Andreev I. O., Solov'yan V. T., Kunakh V. A. Molekulyarno-biologichni osoblyvosti henomnykh perebudov v kul'tyvovanykh in vitro klitynah rauwolfiyi zmyinyoi. *Henetyka i seleksia v Ukraini na mezhi tysyacholit'*. V. V. Morgun et al. (Eds). 2001. K.: Logos. Vol. 1. P. 422–427.
111. Twardovska M. O., Strashnjuk N. M., Mel'nyk V. M., Adonin V. I., Kunakh V. A. Chromosomal variability in tissue culture of rare *Gentiana* species. *Cytol. Genet.* 2008. Vol. 42, No. 4. P. 12–17.
112. Bublyk O. M., Adonin V. I., Kunakh V. A. Cytological variability of cell lines *Ungernia victoris* when grown on nutrient media of different composition. *Cytol. Genet.* 2008. Vol. 42, No. 1. P. 29–36.
113. Bublyk O. M., Andreev I. O., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Variability of *Ungernia victoris* morphogenic and non-morphogenic tissue culture as results from RAPD-analysis. *Visn. Ukr. tov. genet. sel.* 2008. Vol. 6, No. 1. P. 44–51. (In Ukrainian).
114. Kunakh V. A. Mobile genetic elements and plant genome plasticity. Kyiv: Logos. 2013. 298 p. (In Ukrainian).
115. Kunakh V. A., Melnyk V. M., Drobyk N. M., Andreev I. O., Spiridonova K. V., Twardowska M. O., Konvalyuk I. I., Adonin V. I. Chapter 9. Genetic variation induced by tissue and organ culture in *Gentiana* species. *The Gentianaceae. Volume 2: Biotechnology and Applications*. J. J. Rybczynski et al. (Eds). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 2015. P. 199–238.
116. Kunakh V. A., Zossimovich V. P. Effect of kinetin on the frequency and types of chromosome aberration in a tissue culture of *Haplopappus gracilis*. *Genetika* (Moscow). 1977. Vol. 13, No. 8. P. 1355–1365. (in Russian).
117. Kunakh V. A., Sidorenko P. G., Zossimovich V. P. Effect of kinetin on the reproduction of cells of different ploidy. *Uspekhi poliploidii*. V. P. Zossimovich et al. (Eds.). Kiev: Nauk. Dumka. 1977. P. 203–215. (in Russian).
118. Brodskiy V. Ya. Formy izmenchivosti v kletchnoy populyatsii takiye zhe, kak i v populyatsii organizmoyv. *Ontogenez* (Moscow). 1994. Vol. 25, No. 5. P. 29–43. (in Russian).
119. Mamaeva S. E. Regularities of cell karyotypic evolution in culture. *Tsitologia*. 1996. Vol. 38, No. 8. P. 787–814. (in Russian).
120. Braun B. Genetics of bacteria. Moscow: Nauka. 1968. 446 p. (in Russian).
121. Kunakh V. A. Genome variability in plant somatic cell. 4. Variability in the process of dedifferentiation and callus formation in vitro. *Biopol. Cell.* 1998. Vol. 14, No. 4. P. 298–319. (in Russian).
122. Kunakh V. A. Genome variability in the somatic plant cells. 6. Variability and selection in the course of adaptation to in vitro conditions. *Biopol. Cell.* 2000. Vol. 16, No. 3. P. 159–185. (in Russian).
123. Kunakh V. A. Genome variability in somatic plant cells. 7. Variability of population-genetic parameters in the culture in vitro. *Biopol. Cell.* 2002. Vol. 18, No. 5. P. 377–393. (in Ukrainian).
124. Kunakh V. A. Biotechnology of plants for improvement of human living conditions. *Biotechnol. Acta.* 2008. Vol. 1, No. 1. P. 28–39. (in Ukrainian).
125. Kunakh V. A., Mozhylevskaya L. P. Life expectancy of a person and plant biotechnology. *Mol. Applied Genetics*. Minsk. 2013. Vol. 14. P. 56–62. (in Russian).
126. Drobyk N. M., Mel'nyk V. M., Twardowska M. O., Konvalyuk I. I., Kunakh V. A. Chapter 13. Tissue and organ cultures of *Gentiana* as potential sources of xanones and flavonoids. *The Gentianaceae. Volume 2: Biotechnology and Applications*. J. J. Rybczynski et al. (Eds). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 2015. P. 307–317.
127. Kunakh V. A. Twenty five years long stable biosynthesis of ajmaline by related hormone-independed *Rauwolfia serpentina* cell lines. *Euromedica–Hannover, 2005. Hannover, 16–17 Juni, 2005. International Congress and Exhibition. Programm, Abstracts*. P. 22.
128. Kunakh V. A., Katsan V. A. Biosynthesis of poppy isoquinoline alkaloids in nature and in the in vitro culture. 1. Opium poppy (*Papaver somniferum*). *The Ukr. Biochem. J.* 2003. Vol. 75, No. 5. P. 41–54. (in Russian).
129. Kunakh V. A., Katsan V. A. Biosynthesis of poppy isoquinoline alkaloids in nature and in the in vitro culture. 2. Bracteam poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.). *The Ukr. Biochem. J.* 2004. Vol. 76, No. 5. P. 29–44. (in Russian).

130. *Miriuta N. Yu., Parnikoza I. Yu., Ammouri Yu., Kunakh V. A.* Application of thermodynamic approach to investigation of the *in vitro* cell population dynamics in *Rauwolfia serpentina* Benth., a producer of indole alkaloids, tissue culture. *Biotechnologiya*. (Moscow). 2006. No. 2. P. 78–95. (in Russian).
131. *Miriuta N. Yu., Kunakh V. A.* Dinamika klitinyh systems *in vitro*. I. Organizatsiya y chasi ta stabil'nist sistemi kul'turi tkanin rauflofii zmiinoi na dobovomu rivni organizatsii. *Biotechnol. Acta*. 2011. Vol. 4, No. 5. P. 25–38. (in Ukrainian).
132. *Miriuta N. Yu., Kunakh V. A.* Dinamika klitinyh systems *in vitro*. II. Organizatsiya u chasi ta stabil'nist sistemi kul'turi tkanin rauflofii zmiinoi na pasazhnomu rivni. *Biotechnol. Acta*. 2011. Vol. 4, No. 6. P. 18–30. (in Ukrainian).
133. *Miriuta N. Yu., Kunakh V. A.* Dynamic of cell population systems *in vitro*. III. Hypothesis of cell differential process self control and it's phenomenology. *Biotechnol. Acta*. 2012. Vol. 5, No. 3. P. 40–51. (in Ukrainian).
134. *Wang J., Tian L., Madlung A., Lee H. S., Chen M., Lee J. et al.* Stochastic and epigenetic changes of gene expression in Arabidopsis polyploids. *Genetics*. 2004. Vol. 167. P. 1961–1973.
135. *Gui Q., Wang J., Xu Y., Wang J.* Changes in the expression of duplicated genes in allotetraploid species of the genus Brassica according to the SRAP-cDNA method. *Mol. Biol.* (Moscow). 2009. Vol. 43, No. 1. P. 3–9.
136. *Cullis C. A.* Sreda kak generator adaptivnykh izmeneniy i sovremennyye kontseptsii evolyutsionnoy genetiki. Novosibirsk, Inst. Tsitologii i Genetiki SO RAN. 2000. P. 168–176. (in Russian).
137. *Chen Y., Lowenfeld R., Cullis C. A.* An environmentally induced adaptive (?) insertion event in flax. *Internat. J. Genet. Mol. Biol.* 2009. Vol. 1, No. 3. P. 038–047.
138. *Zhuk O. I.* Adaptive evolution of water regime and plant drought tolerance. *Fakt. eksp.evol. org.* V. A. Kunakh et al. (Eds). Kyiv: Logos. 2010. Vol. 8. P. 12–16. (in Russian).
139. *Kravets E. A., Berezhnaya V. V., Sakada V. I., Rashidov N. M., Grodzinskij D. M.* Mechanisms of radiation mutagenesis and architectonics of the apical root meristem. *Fakt. eksp.evol. org.* V. A. Kunakh et al. (Eds). Kyiv: Logos. 2011. V. 10. P. 111–115. (in Russian).
140. *Kashin A. S.* Gametofitnyi apomixis kak neustoychivaya sistema semennogo razmnzheniya u tsvetkovykh. Saratov: Nauchnaya kniga. 2006. 310 p. (in Russian).
141. *Kashin A. S., Tsvetova M. I., Demochko Yu. A.* Cytogenetic peculiarities of cell genesis in apical meristems under gametophytic apomixis (using autonomous apomicts of the Asteraceae as an example). *Cytol. Genet.* 2011. Vol. 45, No. 2. P. 28–40.
142. *Maletskiy S. I., Kolodjazhnaya J. C.* Genetic variability in cell populations and its effect on reproductive signs in angiosperms. Epigenetics of plants. Novosibirsk. 2005. P. 87–112. (in Russian).
143. *Poznyak S. I., Yudanova S. S.* Agamospermic reproduction of seeds in sugar beet (historical aspect). *Fakt. eksp.evol. org.* V. A. Kunakh et al. (Eds). Kyiv: Logos. 2011. Vol. 10. P. 292–296. (in Russian).
144. *Maletskiy S. I.* Hierarchy of units of heredity, variability, inheritance of features and speciation in plants. Epigenetics of plants. Novosibirsk. 2005. P. 7–53. (in Russian).
145. *Golubovskiy M. D.* The age of genetics: the evolution of terms and concepts. SPb.: Borey Art. 2000. 262 p. (in Russian).
146. *Jablunka E., Lamb M. J.* The epigenome in evolution: beyond the modern synthesis. *Visn. Ukr. tov. genet. sel.* 2008. Vol. 6, No. 2. P. 337–355. (in Russian).
147. *Kolotova T. Yu., Stegnii B. T., Kuchma I. Yu., Dubinina N. V., Golovko A. N., Chaikovskiy Yu. B., Voljansky Yu. L.* Mechanisms and control of reorganizations of the eukaryotic genome. Kharkov: Collegium, 2004. 264 p. (in Russian).
148. *Grant-Downton R. T., Diskinson H. G.* Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants. *Ann. Bot.* 2005. Vol. 96. P. 1143–1164.
149. *Grant-Downton R. T., Diskinson H. G.* Epigenetics and its implications for plant biology. 2. The «epigenetic epiphany»: epigenetics, evolution and beyond. *Ann. Bot.* 2006. Vol. 97. P. 11–27.
150. *Liu Y.* Historical and modern genetics of plant graft hybridization. *Adv. Genet.* 2006. Vol. 56. P. 101–129.
151. *Liu Y.* Like father like son. *EMBO Rep.* 2007. Vol. 8, No. 9. P. 798–803.
152. *Cullis C. A.* Mechanisms and control of rapid genomic changes in flax. *Ann. Bot.* 2005. Vol. 95. P. 201–206.
153. *Chandler V., Stam M.* Chromatin conversations: mechanisms and implications of paramutation. *Nature. Rev. Genet.* 2004. Vol. 5. P. 532–544.
154. *Della Vedova C. B., Cone K. C.* Paramutation: The chromatin connection. *The Plant Cell.* 2004. Vol. 16. P. 1358–1364.
155. Epigenetics of plants. Novosibirsk. Inst. Cytol. Genet. SB RAS. 2005. 373 p. (in Russian).
156. *Lolle S., Victor J., Young J., Pruitt R.* Genome-wide non-mendelian inheritance of extra-genomic information in *Arabidopsis*. *Nature.* 2005. Vol. 434. P. 505–509.
157. *Jorgensen R. A.* Of genes and genomes: challenges for the twenty-first century. *Frontiers plant sci.* 2010. Vol. 1. Article 1. doi: 10.3389/fpls.2010.00001.
158. *Kunakh V. A.* Something about plasticity of the genome as the basis of plant adaptability. *Achievements and problems of genetics, breeding and biotechnology.* V. A. Kunakh et al. (Eds.). Kyiv: Logos. 2012. Vol. 4. P. 128–134.
159. *Kunakh V. A.* Evolution of cell populations *in vitro*: peculiarities, driving forces, mechanisms and consequences. *Biopol. Cell.* 2013. Vol. 29, No. 4. P. 295–310.
160. *Kunakh V. A.* On the possibility of applying the law of homologous series in the hereditary variability of N. I. Vavilov to cellular populations *in vitro*. *Biotechnological methods in the conservation of biodiversity and*

- plant breeding. Articles Internat. Sci. Conf., Minsk, August 18–20. 2014. P. 152–155. (in Russian)/
161. Maidanyuk D. M., Andreev I. O., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Genetic polymorphism of the maize somaclonal lines derived from P346 line. *Biopol. Cell.* 2007. Vol. 23, No. 4. P. 324–331.
162. Maidanyuk D. M., Andreev I. O., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Genomic variability in maize callus cultures of lines P346 and its derivative somaclonal lines. *Biopol. Cell.* 2007. Vol. 23, No. 5. P. 416–424.
163. Bublyk O. M., Andreev I. O., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Genetic variability in regenerated plants of *Ungernia victoris*. *Biol. Plant.* 2012. Vol. 56, No. 2. P. 395–400.
164. Spiridonova K. V., Andreev I. O., Zagruchyk O. M., Navrotska D. O., Twardovska M. O., Drobyk N. M., Kunakh V. A. Genetic stability of micropropagated plants of *Deschampsia antarctica* Desv. during long-term *in vitro* culture. *Plant Physiol. Genet.* (Kyiv). 2016. Vol. 48, No. 6. P. 498–507. (in Ukrainian).
165. Kunakh V. A., Navrotska D. O., Twardovska M. O., Andreev I. O. Peculiarities of chromosomal variability in cultured tissues of *Deschampsia antarctica* plants with different chromosome numbers. *Visn Ukr. tov. genet. sel.* 2016. Vol. 14, No. 1. P. 36–43. (in Ukrainian).
166. Kunakh V. A. Relationship between ploidy and spontaneous organogenesis in *Crepis capillaris* and *Haplopappus gracilis* strains. *Tsitol. Genet. (Cytol. Genet.)*. 1974. Vol. 8, No. 4. P. 303–308. (in Russian).
167. Kunakh V. A. Tsitogeneticheskiye osobennosti kul'tury izolirovannykh tkaney i regeneriruyemykh rasteniy v svyazi s perspektivoy primeneniya ikh v selektsii. *Novyye metody sozdaniya i ispol'zovaniya iskhodnykh materialov dlya selektsii rasteniy*. Kiev: Nauk. dumka. 1979. P. 186–193. (in Russian).
168. Kunakh V. A. Tsitogeneticheskaya izmenchivost' kletochnykh populyatsiy v kul'ture izolirovannykh tkaney rasteniy. *Tkanevyeye i kletochnyye kul'tury v selektsii rasteniy*. M.: Kolos. 1979. P. 38–51. (in Russian).
169. Kunakh V. A., Alkhimova E. G., Voityuk L. I. Izmenchivost' chisla khromosom v kallusnykh tkanyakh i regenerantakh gorokha. *Tsitol. Genet. (Cytol. Genet.)*. 1984. Vol. 18, No. 1. P. 20–25. (in Russian).
170. Ignatova S. A. Cell technologies in plant growing, genetics and selection of cultivated plants: tasks, opportunities, system development *in vitro*. Odessa: Astroprint. 2011. 224 p. (in Russian).
171. Mitrifanova I. V. Somatic embryogenesis and organogenesis as the basis of biotechnology for the production and preservation of perennial garden crops. Kyiv: Agrarian science. 2011. 344 p. (in Russian).
172. Cherevchenko T. M., Lavrentyeva A. N., Ivannikov R. V. Biotechnology of tropical and subtropical plants *in vitro*. Kyiv: Nauk. Dumka. 2008. 560 p. (in Russian).
173. Dubrovna O. V., Chugunkova T. V., Baval A. V., Ljal'ko I. I. Biotechnological and cytogenetic bases for the

creation of plants resistant to stress. Kyiv: Logos. 2012. 428 p. (in Russian).

174. Kuchko A. A., Oliylyk T. M. Somaclonal variation in potatoes. Kyiv: Dovira Publishers. 1998, 192 p. (in Ukrainian).

CELL POPULATION GENETICS: EMERGENCE, MAIN RESULTS AND CONCEPTS (TO THE 50TH ANNIVERSARY OF THE FOUNDATION)

V. A. Kunakh

Institute of Molecular Biology and Genetics
of the National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnogo street, 150
e-mail: kunakh@imbg.org.ua

The article briefly reviews the emergence and development in Ukraine of a new scientific field— cell population genetics, which formed the theoretical basis of modern cell technologies. These include, in particular, plant biotechnologies for the improvement, preservation, and accelerated reproduction of unique genotypes *in vitro*; development of new genotypes (organisms) by the methods of cell and genetic engineering and cellular selection; obtaining biologically active compounds, including recombinant, from biomass of cultured cells and tissues for the needs of medicine, cosmetics and food industry; as well as the methods of cell therapy, including technologies based on the use of stem cells, etc. Cultured cells are widely used as model objects and biological systems for studying the most relevant problems of modern biology: the features of the course, signaling pathways, and mechanisms of cell proliferation, including carcinogenesis and tumor proliferation; dedifferentiation of cells, including their reversion to a pluripotent state; totipotency, pluripotency and omnipotency; regeneration of tissues, separate organs, and whole organisms, etc. The article reviews scientific prerequisites for the development of the new scientific field and presents the main concepts of cell population genetics, which have been mainly developed in the Department of cell population genetics of the Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine. It also presents an analysis of the features of development of the newest research areas of genetics of somatic cells of intact plants and cells *in vitro*, cell population genetics, genetic foundations of cell selection, cell biology, and biotechnology during the second half of the past and the beginning of this century.

Keywords: history of science, cell population genetics, plant tissue and cell culture, cell selection, plant biotechnology.