

Геномна мінливість соматичних клітин рослин. 7. Мінливість популяційно-генетичних параметрів у культурі *in vitro*

В. А. Кунах

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

*Зроблено огляд даних щодо особливостей клітинних популяцій, які тривалий час вирощувалися в умовах *in vitro*, як нової експериментально створеної біологічної системи. Розглянуто форми добору, що діють у клітинних популяціях. Виявлено добову (циркадну) та пасажну ритміку змін генетичної структури проліферуючої складової популяції. Зроблено висновок про те, що стабільна ритміка розмноження клітин, розмежування в часі поділів клітин з різними геномами, динамічна стабільність генетичної гетерогенності і особливо унікальна здатність до відтворення генетичної структури вихідної гетерогенної популяції окремими клітинами при клонуванні свідчать про наявність високоефективного фізіологічного та генетичного (популяційного) гомеостазу в клітинних популяціях *in vitro*. Висловлено припущення, що одна окрема клітина здатна не лише зберігати, але й за певних умов реалізувати спроможність відновлювати генетичне різноманіття даного виду, а, можливо, й роду рослин. Розглянуто також особливості фенотипової гетерогенності клітинних популяцій за кількісними ознаками, зокрема, за рівнем накопичення вторинних сполук — алкалоїдів і нафтохінонів та можливі шляхи визначення успадкованості кількісних ознак. Наведено дані стосовно ефективності застосування в клітинній селекції запропонованих статистично-генетичних методів для визначення гетерогенності, мінливості, успадкованості і використання цих параметрів для розробки оптимальних способів підвищення продуктивності клітинних культур.*

Вступ. У попередніх роботах [1—3] розглянуто особливості та динаміку геномних реорганізацій, їхню роль, а також роль і особливості дії добору в процесах дедиференціювання, калюсоутворення та адаптації клітин до умов вирощування *in vitro*. Показано, що введення клітин вищих рослин в умови *in vitro* — процес складний і багатоетапний, він являє собою по суті створення нової біологічної системи. Новизна цієї системи полягає, перш за все, в тому, що в ній структурні елементи цілісного організму — клітини, які зазвичай виконують лише певні визначені функції, стають у кінцевому рахунку окремими організмами, здатними до автономного розвитку. Культивовані клітини вищих рослин — це унікальна клонова популяція, яка не має прямих аналогій в природі, але розвивається і еволюціонує згідно з загальнобіологічними правилами і законами.

Аналіз особливостей культури тканин і клітин вищих рослин як нової, експериментально створеної біологічної системи почнемо з розгляду деяких загальних положень генетики клітинних популяцій.

Особливості клітинних популяцій. Термін «популяція» вперше був запропонований Йогансеном у 1903 році для природної сукупності особин одного виду, неоднорідних у генетичному відношенні. Нині популяція визначається як сукупність одного виду рослин, тварин чи мікроорганізмів, які протягом тривалого часу (великої кількості поколінь) населяють певну ділянку навколишнього середовища і так чи інакше ізольовані від особин інших сукупностей (популяцій) того самого виду. Визначення цього терміна і правомірність його застосування для безстатевих організмів тривалий час дискутувалися (див., наприклад, [4]). Сьогодні прийнято вважати, що поняття «популяція» цілком

правомірне і для сукупностей безстатевих організмів одного виду, організмів, що самоzapліднюються, а також до сукупностей клітин, вирощених в умовах *in vitro* [5, 6].

Інтеграцію окремих особин у популяцію, а генотипів особин — у генофонд популяції зумовлює рекомбінація генетичного матеріалу при статевому процесі. В популяціях культивованих клітин рослин такий або подібний йому обмін спадковою інформацією, очевидно, відсутній. Відсутність явної комбінативної мінливості дозволяє віднести клітинні популяції, ґрунтуючись на класифікації Добжанського [7], до неменделівських популяцій.

Цілісність неменделівських популяцій забезпечується некомбінативною спадковою мінливістю. В таких популяціях виникнення, зміна і збереження успадкованого поліморфізму залежать лише від двох чинників — спадкової (некомбінативної) мінливості і добору. Спадкова мінливість у клітинних популяціях не вичерпується мутаційною мінливістю. В процесі еволюції у клітин багатоклітинних організмів виробився ще один тип спадкової мінливості — епігенетична мінливість, яка в клітинних популяціях відіграє значну роль. Як вважає Вахтін [5, 8], взаємодією спадкової мінливості і добору пояснюються всі генетичні аспекти таких найважливіших процесів, як пристосування клітинних популяцій до зміни умов середовища, їхнє старіння та вимирання, перетворення популяцій нормальних соматичних клітин у злоякісні тощо. Аналізуючи генетичні процеси в клітинних популяціях, необхідно враховувати не лише взаємодію мутаційної мінливості і добору, але й взаємодію епігеномної мінливості і добору, а також взаємний вплив різних форм мінливості. Не можна, вочевидь, повністю ігнорувати і вплив епігенетичної мінливості на процеси взаємодії мутаційної мінливості і добору.

Справедливість викладеного вище може бути підтверджена також тим, що одним із шляхів взаємозв'язку між клітинами є виділення в середовище і обмін продуктами метаболізму, які вже давно є встановленими фактами [9]. Існування такого обміну в популяціях культивованих клітин рослин було показано при отриманні клонів від окремих клітин та протопластів з використанням ефекту кондиціонування середовищ та в інших дослідках [10—12]. У цьому аспекті цікавою є гіпотеза щодо кооперативної дії генів у клітинній популяції, запропонована Туманішвілі [13, 14]. Суть її полягає в наступному. Кожна клітина знаходиться під впливом не лише власного геному, але й геному сусідніх клітин. Дія геномів усіх клітин популяції взаємно узгоджується. З цієї точ-

ки зору генетична гетерогенність популяції культивованих клітин рослин, зокрема, їхня міксоплоїдність, отримує логічне пояснення: клітини з різним числом хромосом відрізняються за активністю синтезу тих чи інших метаболітів і між такими клітинами існують симбіотичні взаємовідносини, що ґрунтуються на обміні продуктами метаболізму. На підтвердження можна навести дані про те, що для кожної ознаки при автополіплоїдії є свій оптимальний рівень плоідності [15]. З іншого боку, в культурі тканин можуть спостерігатися і антагоністичні взаємодії між клітинами з різним набором хромосом, які обумовлені пригнічуючим впливом продуктів метаболізму клітин одного рівня плоідності на клітини іншого рівня [16]. Це в ряді випадків спричинює зміну стовбурових ліній протягом пасажу, яка була показана як на прикладі клітин ссавців [8], так і в дослідках з клітинами різних видів рослин, які ми розглянемо в наступних розділах.

Добір у клітинних популяціях. У сформованих (тривалий час субкультивованих в умовах *in vitro*) штамах культури тканин рослин, як і в організмі, діють дві форми добору — стабілізуючий добір і рушійний (прямий). В клітинних популяціях інтактних організмів домінуючим є перший, який ґрунтується на перевагах норми над усіма можливими від неї відхиленнями [17]. Нормою, особливо в меристемі, є клітини з диплоїдним каріотипом та епігеномним, властивим клітинам даної популяції. Всі аберантні форми — клітини з хромосомними і геномними мутаціями — виявляються менш пристосованими, вони або втрачають здатність до поділів, або діляться менш інтенсивно і врешті-решт витісняються клітинами з незмінним генотипом із складу популяції. Експериментальних підтвержень цьому є легіон — це «розхимерювання» (диплоїдизація) рослин після обробки поліплоїдогенами, зникнення більшості аберантних клітин після обробки мутагенами, «нормалізація» протягом онтогенезу багатьох соматональних варіантів і таке інше.

Добір у клітинних популяціях ґрунтується на диференціальному розмноженні варіантів клітин, що спадково відрізняються. Відмінності в темпах проліферації призводять до зміни у співвідношенні варіантів — частка клітин варіанта, що швидше проліферує, зростає, а варіанта, який проліферує повільніше, — зменшується. Якщо одночасно відбувається неселективна загибель клітин (або перехід їх, скажімо, в результаті диференціювання з популяції меристематичних у популяцію спеціалізованих клітин, що далі не діляться), варіант, що проліферує повільніше, нарешті зникне — буде елі-

мінований доборою. Якщо ж чисельність популяції весь час зростає, а неселективна загибель клітин є слабовираженою, елімінації варіанта, що підлягає дії негативної селекції, не відбудеться, буде лишень зменшуватися частота його зустрічальності.

Швидкість витіснення одного варіанта іншим характеризує інтенсивність добору. В інтактних організмах спадково (каріотипічно) змінені варіанти клітин в меристемі витісняються, як правило, дуже швидко, що свідчить про високу інтенсивність протікання стабілізуючого добору в їхніх клітинних популяціях. За різного роду патологічних чи стресових станів умови внутрішнього середовища в організмі відхиляються від норми. Від цього в першу чергу потерпають клітини з нормальним генотипом (і епігенотипом), в результаті інтенсивність стабілізуючого добору падає, спадково змінені варіанти починають повільніше витіснятися зі складу популяцій. Одночасно при погіршенні (різкій зміні) умов середовища значно підвищується частота виникнення нових аберантних форм. Загалом, коли клітини знаходяться в умовах існування, що виходять за межі норми реакції їхнього генотипу, тобто потрапляють під дію стресових факторів (як, наприклад, це відбувається при переносі клітин в умови *in vitro*), в популяції клітин починає переважати дестабілізуюча форма добору. Ця форма добору спричинює різке посилення генетичної мінливості внаслідок порушення корелятивних систем організму, головним чином, гормональної системи, що виникає при стресових впливах [18].

Результатом дії дестабілізуючої форми добору є значне зростання генетичного розмаїття в клітинних популяціях. Надалі як виявлення тиску змінених умов існування на фоні високої геномної мінливості починає діяти рушійний чи стабілізуючий (в залежності від конкретних умов) добір.

Особливості і ефективність впливу різних форм добору в процесі формування популяцій культивованих клітин і в сформованих штаммах були детально розглянуті в одному з попередніх повідомлень [3]. Тут потрібно відмітити лише те, що популяції ізольованих клітин у порівнянні з популяціями клітин інтактних організмів є генетично набагато гетерогенніші. І ця гетерогенність є стабільною, з чого робиться висновок про переважну дію в таких популяціях стабілізуючого добору. При цьому слід враховувати, що коли ознака, за якою йшов добір, стабілізується, це не означає, що дія добору в популяції за цією ознакою припинилася: змінюється лише роль добору в популяції — його дія стає спрямованою на підтримку досягнутої структури популяції і досягнутої середньої величини ознаки. Якщо інтенсивність такого підтримуючого добору

знизиться, зменшиться і середня проліферативна активність клітин у популяції. Цей добір не можна назвати стабілізуючим, якщо строго дотримуватися визначення, тому що в даному випадку всім спадковим варіантам з підвищеною проліферативною активністю буде притаманна підвищена селективна цінність. Однак вірогіднішим, на наш погляд, є те, що коли генетична структура популяції, навіть дуже гетерогенної популяції, є стабільною протягом багатьох десятків і навіть сотень поколінь, то в ній діє переважно стабілізуюча форма добору. Особливо чітко це проявляється при збереженні популяцією генетичної структури на фоні високої частоти виникнення нових генотипів, як це можна бачити з даних, наведених у роботах [19—21], а також з наступних розділів цієї роботи.

Підсумовуючи викладене, слід підкреслити, що одним з найважливіших чинників підтримання генетичної гетерогенності є те, що поліморфізм забезпечує існування популяції в мінливих умовах довкілля, зумовлює її лабільність, наявність преадаптацій [22, 23]. Тому поліморфізм можна розглядати як виявлення генетичного гомеостазу, що склався еволюційно. Природний добір закріплює існування поліморфізму, контролюючи кількісні співвідношення необхідних форм [24, 25]. Між факторами добору і спадковою мінливістю існує пряма залежність. При різкій зміні умов зовнішнього середовища популяція має можливість пристосуватися до них за рахунок або використання наявного мутаційного резерву, або зростання частоти виникнення нових мутацій. Виникнення неспрямованих спонтанних мутацій та їхній наступний добір сприяють поступовим змінам популяції, причому такі зміни можуть створювати враження спрямованих. Ці положення популяційної генетики, встановлені спочатку для вищих організмів, нині є загальноприйнятими для популяцій будь-якого типу.

Однак, як уже відмічалось вище, популяціям культивованих клітин властиві деякі специфічні особливості. По-перше, клітинні популяції відрізняються від популяцій багатоклітинних організмів відсутністю комбінативної мінливості та наявністю епігенетичної мінливості, а від популяцій одноклітинних еукаріотів — відсутністю комбінативної мінливості. Такі популяції визначаються як менделівські популяції з епігенетичною мінливістю [5]. По-друге, видалення клітин із цілісного організму призводить до порушення тканинного і організмового гомеостазу. Останнє є загальною причиною всіх мутацій (див., наприклад, [5, 18]). Тому, чим сильніше відхиляються умови життєдіяльності клітин від оптимуму, тим у них вищим

буде рівень спадкової мінливості і генетичної гетерогенності, що й спостерігається в таких екстремальних умовах, як умови ізолюваного росту *in vitro*. По-третє, в процесі одержання і формування штамів, здатних до тривалого росту в пересадочній культурі, геном як окремих клітин, так і генетична структура клітинних популяцій невідомо змінюються. Окремі зміни можуть значно перевищувати навіть міжвидові відмінності, що існують у природі. Ці та інші особливості популяцій культивованих клітин вищих рослин будуть розглянуті у наступних розділах.

Динаміка генетичної структури. Будь-яка популяція, виходячи з самого визначення терміну, є генетично гетерогенною. Генетична структура популяцій, динаміка цієї структури визначаються шляхом вивчення частоти зустрічальності окремих генів та/або генотипів у репрезентативних вибірках. Тому для встановлення генетичної структури клітинних популяцій потрібно мати результати дослідження геномів окремих клітин. Одним з методів тут може бути клонування окремих клітин у різних селективних умовах і середовищах і визначення на цій основі частоти досліджуваної ознаки в популяції. Таким чином можуть бути вивчені ознаки стійкості чи чутливості до різних хімічних, фізичних чи біологічних чинників, ознаки залежності від факторів живлення, зокрема прото- чи автотрофності по відношенню до різних метаболітів та деякі інші біохімічні ознаки [12]. Однак цей метод є досить складним і для вивчення генетичної структури клітинних популяцій використовується нечасто. На сьогодні найпоширенішим для популяційно-генетичного аналізу культивованих клітин є каріотипічний метод, тобто вивчення числа і морфології хромосом. Зручність і перевагу його над іншими зумовлено багатьма особливостями. Зокрема, при застосуванні цього методу, який відрізняється високою роздільною здатністю, особливо при використанні диференціального фарбування і гібридизації ДНК, можна отримати уявлення про мінливість як генотипу, так і фенотипу, оскільки каріотип є однією з важливих морфологічних ознак клітини.

При використанні цитогенетичних методів слід, однак, враховувати, що вони дозволяють вивчати лише ті клітини, які діляться мітотично, тобто так званий «проліферативний пул» культури. У різних рослинних культур тканин проліферативний пул складає від 70 до 90 % популяції. Додаткове чи паралельне вивчення рівня плідності клітин, які не входять до проліферативного пулу, наприклад, методом цитофотометрії ДНК, дозволяє зробити практично повний аналіз гене-

тичної структури клітинної популяції за рівнем плідності і вивчати її динаміку та зміни при впливі тих чи інших факторів. Розглянемо особливості такої динаміки на деяких прикладах.

Динаміка геномних змін протягом пасажу. Результати деяких досліджень свідчать, що сформовані клітинні штами, переважна більшість яких є гетерогенною і міксоплідною, протягом пасажу характеризуються в цілому відносно стабільним розподілом клітин за числом хромосом. У таких штамів не відбувається різких змін плідності клітин, що діляться, модальний клас протягом пасажу є стабільним. У інших штамів відбуваються суттєві зміни, генетична структура клітинних популяцій ритмічно, від пасажу до пасажу, піддається певним змінам.

Наприклад, у диплоїдному штамі Г2Л мало-хромосомного виду гаплопапусу *Haploappus gracilis* ($2n = 4$) з родини *Asteraceae* протягом пасажу частота диплоїдних метафаз виявлялася в межах 72,2—80,5 %, триплоїдних — 7,6—14,5 %, тетраплоїдних — 3,2—14,6 % тощо. Ці флуктуації мали коливальний характер, невеликий розмах і суттєво не змінювали характеру розподілу клітин, що діляться, за числом хромосом (табл. 1). В іншому штамі цієї рослини — Г4Г-3, виявлено достовірні зміни частоти клітин різних рівнів плідності. Зокрема, на 5-й день росту відмічено більшу кількість диплоїдних клітин, ніж в інші дні ($p < 0,01$), при певному зниженні частоти тетраплоїдних метафаз ($p < 0,01$), а частота клітин з числом хромосом, вищим за тетраплоїдне, зменшувалася майже вдвічі на 9—10-й дні в порівнянні з іншими днями росту. Суттєво змінювалася і кількість анеуплоїдів (табл. 1).

Аналіз штаму ПП-1 культури тканин лікарської рослини полісціасу папоротелистого *Polyscias filicifolia* з родини аралієвих показав, що він складається переважно з диплоїдних клітин, кількість яких коливається протягом пасажу від 73 до 95 % (табл. 1). У тканині зустрічалися також триплоїдні, тетраплоїдні, гаплоїдні та анеуплоїдні клітини переважно з біядиплоїдним числом хромосом. Гаплоїдні клітини ділилися протягом перших 15 днів, а частота диплоїдних клітин була найнижчою (72,9 %) на 15-й день росту, коли в згаданому штамі спостерігався максимум мітотичної активності. Однак у цілому в культурі тканин полісціасу встановлені коливання хромосомних чисел протягом пасажу суттєво не змінювали модального класу, який формувався диплоїдними клітинами.

Іншу динаміку геномної структури спостерігали при аналізі решти наявних клітинних штамів. Наприклад, у штаму К3Л-А культури тканин ске-

Таблиця 1

Динаміка кількості клітин різних рівнів плідності протягом пасажу у сформованих штаммах калюсних культур деяких видів рослин, % (власні дані)

Вік субкультури, день росту	Кількість вивчених метафаз, шт	Число наборів хромосом, n					Анеуплоїдні
		1	2	3	4	> 4	
<i>Harporappus gracilis (2n = 4), штам Г2Л</i>							
3	372	0,8	80,4	9,4	4,3	1,9	3,2
4	294	1,7	79,3	9,5	6,8	0,3	2,4
5	200	0,5	78,0	8,5	10,5	1,0	1,5
6	351	1,7	77,2	10,3	6,8	1,4	2,6
8	216	0,5	79,2	9,3	5,6	1,4	4,2
10	276	1,4	72,5	9,4	10,1	2,2	4,4
12	81	1,2	79,0	7,9	3,7	3,6	4,8
14	200	2,5	73,0	9,0	7,5	1,5	6,5
18	156	1,3	73,8	7,6	14,6	—	2,6
21	219	1,8	80,5	9,1	3,2	—	5,4
27	254	1,6	73,6	9,4	5,5	2,0	7,9
35	225	0,9	72,2	14,5	5,2	3,4	4,0
<i>Harporappus gracilis (2n = 4), штам Г4Г-3</i>							
4	172	—	1,1	6,4	61,0	25,0	6,4
5	189	—	10,5	13,8	48,7	22,2	14,8
6	22	—	4,5	4,5	63,6	22,7	4,5
9	128	—	1,6	8,6	56,2	14,9	18,8
10	211	—	2,8	18,0	60,2	10,9	8,1
11	76	—	—	13,2	65,8	21,0	—
15	100	1,1	1,0	12,0	58,0	18,0	9,0
<i>Polyscias filicifolia (2n = 24), штам ПП-1</i>							
5	46	—	84,9	6,5	4,3	—	4,3
10	43	9,3	76,7	2,3	7,0	—	4,7
15	118	5,1	72,9	4,2	2,5	—	15,3
20	28	—	78,6	14,3	—	—	7,1
25	12	—	75,0	16,7	—	—	8,3
30	20	—	95,0	—	—	—	5,0
<i>Crepis capillaris (2n = 6), штам КЗЛ-А</i>							
5	100	1,0	64,0	7,0	20,0	5,0	3,0
10	253	2,8	62,0	4,7	21,3	6,8	2,4
14	252	—	40,1	6,7	28,2	24,6	0,4
20	129	—	57,4	6,2	19,4	15,4	1,6
30	91	—	45,1	1,1	39,6	14,2	—

реди *Crepis capillaris* гаплоїдні клітини ділилися лише на початку пасажу, кількість диплоїдних, триплоїдних та анеуплоїдних клітин зменшувалася в кінці культивування субкультури (табл. 1). Тетраплоїдні клітини найчастіше зустрічалися на 30-й день росту, коли їхня частота сягала 40 %, а високоплоїдні — на 14-й день, складаючи в цей час біля 25 % популяції. Таким чином, частота різних генотипів (клітин різних рівнів плоїдності) в даному штамі крєпісу протягом пасажу змінювалася не менше, ніж у 2—3 рази. І ця картина спостерігалася від пасажу до пасажу з несуттєвими варіаціями.

Детальний аналіз динаміки геномної структури популяції, її росту і розмноження протягом пасажу було проведено на прикладі культивованих впродовж тривалого часу в пересадочній культурі суспензійних і калюсних штамів тютюну *Nicotiana tabacum*. Виявилося, що в цитокініннезалежного диплоїдного суспензійного штаму ТПА (середня частка диплоїдних клітин у нього складала біля 70 %), який активно росте, клітини з недиплоїдним числом хромосом ділилися під час максимальної мітотичної активності. В цей час відносна частота диплоїдних мітозів відповідно зменшувалася. Такий характер динаміки генетичної структури, клітинних поділів і росту популяції спостерігався протягом 57—89-го пасажів [26].

У чотирьох міксоплоїдних штамів калюсної культури тютюну, одержаних від тканин листка гаплоїдних рослин сорту Самсун, динаміка розвитку була дещо іншою. Ці штами відрізнялися між собою за багатьма параметрами — за темпом росту, особливостями мітотичної активності, модальним числом хромосом тощо. В одного штаму відносна частка поліплоїдних мітозів зростала в кінці циклу вирощування, у іншого — клітини найвищих рівнів плоїдності ділилися переважно в середині пасажу, а в двох штамів зміни числа хромосом у метафазах мали коливальний характер [27].

Найсуттєвіші зміни геномної структури протягом пасажу і їхній тісний зв'язок з мітотичною активністю та накопиченням вторинних метаболітів (індольних алкалоїдів) виявлено для культури тканин раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina*. При вивченні клітинної лінії А калюсної культури раувольфії встановлено, що вона є досить гетерогенною популяцією з варіюванням клітин за числом хромосом від 11 до 82 при $2n = 22$. До того ж протягом перших п'яти днів після пересадки ділилися переважно клітини з диплоїдним числом хромосом, вони склали біля 70 % усіх клітин при першому підйомі числа мітозів. У подальшому частка диплоїдних поділів різко знижувалася і

після 25—27-го дня росту вони не зустрічалися зовсім. Триплоїдні клітини ділилися переважно під час другого і третього під'йомів мітотичної активності, їхня частка (на 11-й та 17-й день) сягала 40 % і більше. Протягом перших днів росту і в кінці пасажу триплоїдні клітини зустрічалися набагато рідше. Тетраплоїдні і клітини з числом хромосом, більшим тетраплоїдного, починали ділитися пізніше, їхня кількість зростала від 12—20 % у перші дні до 80 % на 27—30-й день. У кінці пасажу ділилися лише тетраплоїдні та високоплоїдні клітини. Вивчення динаміки вмісту ДНК в ядрах показало таку ж картину — протягом пасажу кількість ДНК зростала. Особливо різко її кількість збільшувалася в кінці пасажу, при переході клітин до процесів специфічної цитодиференціації і вторинного метаболізму. Детальніше результати вивчення динаміки кількості ДНК і зв'язок її змін з продуктивністю викладено в роботах [28, 29].

Підсумовуючи наведені вище та опубліковані в літературі результати вивчення динаміки клітинних популяцій протягом пасажу (див. також [30—32]), можна зробити наступний висновок. У сформованих клітинних штамів різних видів рослин, які характеризуються протягом багатьох пасажів при аналізі на 5—12-й день росту стабільним розподілом клітин за числом хромосом, упродовж пасажу (циклу вирощування) відбуваються зміни частоти зустрічальності клітин різних рівнів плоїдності. Ці зміни в різних штамів мають різний ступінь вираженості. В одних вони практично не впливали на сумарний розподіл клітин за числом наборів хромосом і в результаті не призводили до суттєвих змін характеристики штаму. В інших штамів зміни плоїдності клітин, що діляться, протягом пасажу були досить значними. В одних випадках вони мали коливальний характер, в інших — відмічали поступове збільшення в кінці пасажу (у стаціонарній фазі росту) частоти появи клітин високих рівнів плоїдності. Є штами, у яких частка поділів з максимальним для даного штаму числом хромосом найвищою була в середині пасажу (в логарифмічній фазі росту).

У цій мінливості спостерігаються і деякі спільні моменти. По-перше, клітини з найнижчими в даному штамі рівнями плоїдності (диплоїдні та/або клітини невисоких рівнів плоїдності у високоплоїдних штамів) ділилися переважно в першій половині культивування субкультури. По-друге, в максимумах мітотичної активності ділилися клітини практично всіх рівнів плоїдності, властивих даному штаму, і в цей час росту найчіткіше виявляється розмах мінливості клітин за числом хромосом. У всіх досліджених штамів співвідношення

клітин з різними числами хромосом під час максимальної мітотичної активності відповідає даним, одержаним внаслідок усереднення результатів вивчення протягом усього пасажу. Звідси результати цитогенетичного аналізу, проведеного під час максимальної мітотичної активності, можна екстраполювати на всю популяцію клітин даного штаму, що діляться мітотично. Таким чином, результати підрахунку чисел хромосом, одержані на 3—11-й день росту, як правило, цілком адекватно відображають розподіл мітотично активних клітин за числом наборів хромосом, тобто генетичну структуру даного штаму.

Причини наявності пасажної динаміки генетичної структури можна пояснити на прикладі культури тканин раувольфії зміїної. Зокрема, найдетальніше вивчена клітинна лінія А цієї рослини є високопродуктивною калюсною культурою [28, 33]. Її селекція як продуцента індолних алкалоїдів відбувалася за кількома ознаками одночасно — за кількістю накопичуваних алкалоїдів групи індоліну, за інтенсивністю і стабільністю росту, морфологічною гомогенністю калюсу, здатністю утилізувати все живильне середовище без залишку і таке інше. В результаті тривалої селекції отримано генетично гетерогенну клітинну популяцію, яка характеризується стабільністю ознак і стійкою динамічною рівновагою між клітинами різної плідності. Збалансованість популяції, її сталість, повне поглинання клітинами протягом пасажу всіх компонентів живильного середовища зумовлені, очевидно, в першу чергу її генетичною гетерогенністю, розмежуванням у часі вступу в мітоз клітин різної плідності та, як результат, переходом їх до специфічної цитодиференціації також у різний час. У генетично різних клітин потреби в субстраті, вочевидь, різні. Через збалансованість популяція в цілому утилізує за час пасажу все живильне середовище, навіть продукти метаболізму клітин, що розмножувалися раніше в перші дні пасажу (див. [34]). В інших штамах відбувався не настільки жорсткий добір і, очевидно, тому в них описані процеси виявлялися в приглушеному вигляді.

Встановлено також, що при частіших пересаджуваннях на свіже живильне середовище клітинні популяції генетично менш гетерогенні, при такому режимі вирощування штами частіше зберігають вихідну кількість ядерної ДНК та диплоїдне число хромосом [35]. Такий же ефект може мати і вирощування клітин у проточній культурі або в хемостатованих умовах, де живильне середовище зберігає свої вихідні константи.

Таким чином, популяції культивованих *in vitro* рослинних клітин є генетично гетерогенні. Генетична

структура цих популяцій не є сталою. Поведінка (здатність до розмноження) окремих генотипів (компаратментів) популяції залежить, вірогідно, від багатьох факторів, зокрема, від частки клітин різної плідності на момент пересадки, наявності в живильному середовищі метаболітів, які можуть стимулювати чи пригнічувати проліферацію клітин різної плідності, тривалості мітотичного циклу клітин з різним числом хромосом, темпу поглинання поживних речовин із середовища та виділення метаболітів у середовище клітинами різних генотипів. Взаємодія цих та інших факторів створює ту динамічну картину частот зустрічальності клітин з різними генотипами протягом циклу вирощування, яка характерна для кожного штаму, кожної клітинної популяції.

Добова ритміка хромосомних чисел. Викладений матеріал свідчить про те, що в культурі тканин протягом пасажу може відбуватися значна зміна частоти клітин різних рівнів плідності. Найвищий рівень гетерогенності клітинних популяцій за числом хромосом частіше виявляється в ті дні росту, коли відмічається максимальна мітотична активність. Відомо, що мітотичній активності властива як пасажна, так і добова (циркадна) ритміка [2, 34, 36]. Подібну добову ритміку встановлено і для частоти зустрічальності клітин з різним числом хромосом.

Наприклад, аналіз диплоїдного первинного калюсу гаглопапусу *H. gracilis*, одержаного з ділянки молодого листка шестимісячної рослини на живильному середовищі Мурасіге-Скуга, показав наявність у ньому добової ритміки як числа мітозів, так і частоти клітин різних рівнів плідності (рис. 1). Зокрема, відсоток диплоїдних мітозів змінювався протягом доби від 52 до 94 %, при цьому в максимумі мітотичної активності частка диплоїдних поділів була найнижчою, а крива частоти тетра- і високоплідних мітозів практично повністю повторювала криву мітотичної активності. Таким чином, у первинному калюсі гаглопапусу найбільша гетерогенність за числом хромосом серед мітотично активних клітин спостерігалася під час добового підйому числа мітозів. У цей час ділилися клітини всіх рівнів плідності, що зустрічаються в даній клітинній популяції.

У сформованому диплоїдному штамі гаглопапусу Г4ТР мінливість частоти диплоїдних мітозів (клітин, що склали модальний клас) теж мала циркадний характер. Їхня частка змінювалася протягом доби більше ніж у два рази: від 40 до 100 %. Максимальну частоту диплоїдних мітозів спостерігали під час зменшення мітотичної активності, а мінімальну — на початку підйомів загального чис-

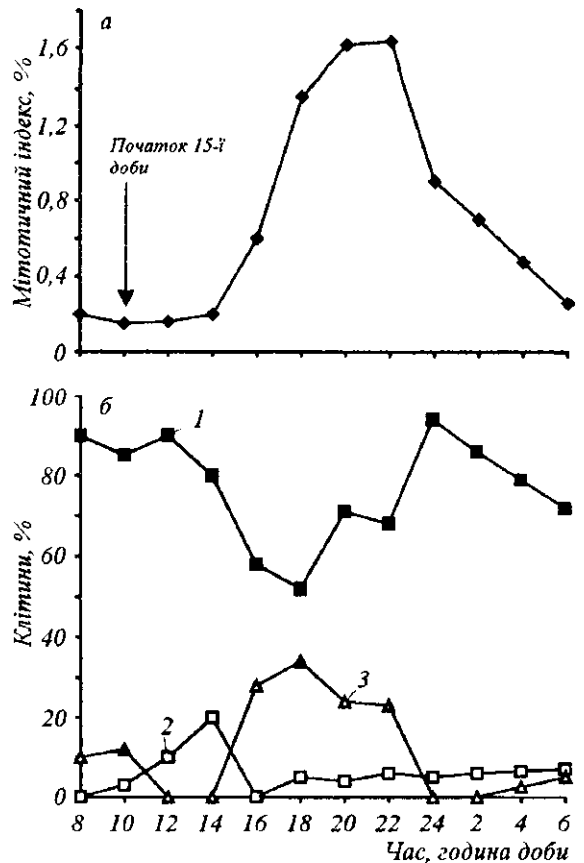


Рис. 1. Динаміка мітотичної активності (а), частки диплоїдних (б, 1), триплоїдних (б, 2), тетра- та високоплоїдних метафаз (б, 3) від загальної кількості поділів у первинному калюсі гаглопапусу *H. gracilis* ($2n = 4$) протягом 15-ї доби після ізоляції ділянки молодого листка (власні дані)

ла поділів. Таким чином, добова крива числа диплоїдних поділів мала практично дзеркальний характер порівняно з кривою добової мітотичної активності (рис. 2).

Для штаму Г4Г-3 калюсної культури гаглопапусу, який складався переважно з тетраплоїдних клітин, під час добових підйомів мітотичної активності теж відмічали зменшення частки поділів клітин з модальним (у даному випадку — тетраплоїдним) числом хромосом, а при зниженні рівня мітотичної активності їхня частота зростала (рис. 3).

На початку добового максимуму мітотичної активності у раувольфії змінної ділилися диплоїдні клітини, а в кінці підйому — тетра- і високоплоїдні. Крива триплоїдних мітозів віддзеркалювала криву мітотичної активності [28, 34].

Вивчення зв'язку між добовими і пасажними

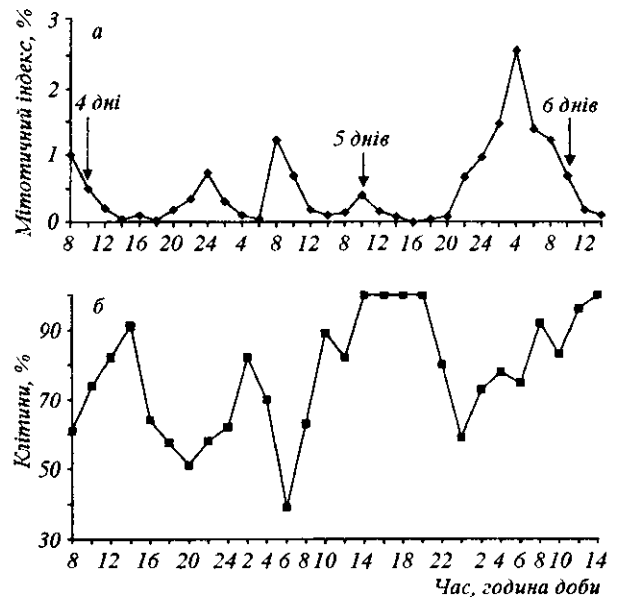


Рис. 2. Динаміка мітотичної активності (а) та частки диплоїдних метафаз серед загальної кількості поділів (б) у сформованому штамі Г4ТР суспензійної культури гаглопапусу протягом 5-ї та 6-ї діб після пересіву на свіже живильне середовище (власні дані)

ритмами клітин різних рівнів плоїдності здійснювали на прикладі штаму Г4ГР гаглопапусу. Встановлено, що перші після пересіву суспензійної культури мітози з'являлися на початку четвертої доби і всі вони були диплоїдними (рис. 4). Через 8 год після початку клітинних поділів з'явилися тетраплоїдні метафази, через 22 год — триплоїдні, через 48 год — клітини високих рівнів плоїдності, які містили число хромосом, більше тетраплоїдного (більше $4n$). Частота клітин усіх рівнів плоїдності ритмічно змінювалася, підпорядковуючись, як і мітотична активність, пасажному ритму, тобто залежала від фази росту культури. Зміни відносної частки диплоїдних метафаз протягом усього пасажу дзеркально відображали коливання мітотичної активності: під час її зниження ділилися практично лише диплоїдні клітини, але з підвищенням числа мітозів зменшувалася доля диплоїдних метафаз. Порівняння динаміки числа поділів інших рівнів плоїдності показало, що вона збігається з ритмом і розмахом мінливості мітотичної активності — клітини з числом хромосом, відмінним від модального, найчастіше зустрічалися в максимумах мітотичної активності і практично не ділилися під час зменшення загальної кількості мітозів.

Таким чином, популяціям культивованих клітин рослин властива добова ритміка як мітотичної

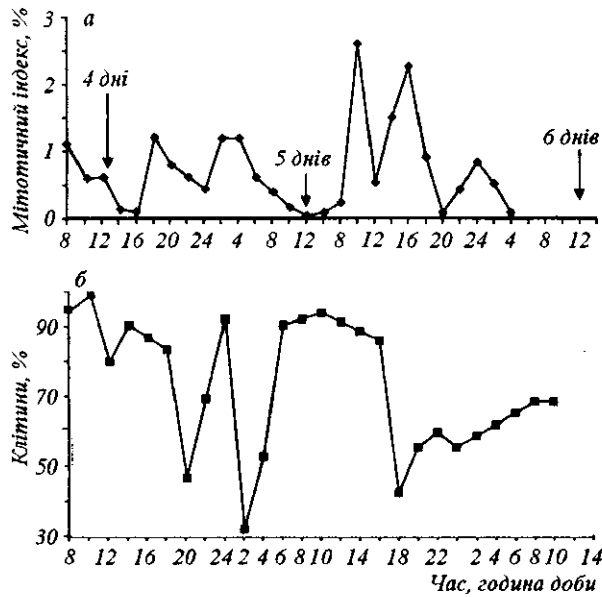


Рис. 3. Динаміка мітотичної активності (а) та частки тетраплоїдних метафаз серед загальної кількості поділів (б) у сформованому штамі Г4Г-3 калюсної культури гаплопапусу протягом 5-ї та 6-ї діб росту після пересіву на свіже живильне середовище (власні дані)

активності, так і кількості поділів клітин з різними числами хромосом. Спостерігається зв'язок частки метафаз з різним числом хромосом з ритмом мітотичної активності — частота поділів клітин з модальним числом хромосом і загальна кількість мітозів дзеркально змінювалися по відношенню один до одного. Добові ритми при цьому були підпорядковані пасажному ритму — з віком субкультури змінювалися число і ритм поділів клітин з різним числом хромосом. Аналіз числа хромосом, проведений о 8—12 год 3—7-го днів росту, найадекватніше відображає генетичну структуру більшості популяцій культивованих клітин рослин.

Динамічна стабільність генетичної структури клітинних популяцій *in vitro*. Стабільна ритміка розмноження (числа поділів) клітин, розмежування в часі розмноження клітин з різними геномами не лише протягом циклу вирощування (пасажу), але й протягом доби свідчать про наявність як фізіологічного, так і генетичного гомеостазу в популяціях культивованих клітин вищих рослин. В результаті йдеться про генетично гетерогенні, динамічні і разом з тим фізіологічно та генетично стабільні біологічні системи. Очевидно, в клітинних популяціях існують певні механізми, які підтримують динамічну різноманітність (гетерогенність)

клітинних популяцій. В ряді дослідів показано високу ефективність таких механізмів. Розглянемо це положення на деяких конкретних прикладах.

Аналіз калюсної культури гаплопапусу *H. gracilis* протягом п'ятого року вирощування *in vitro* показав, що він є міксоплоїдним з варіюванням за числом хромосом від 2 до 48 при $2n = 4$. Модальний клас формувалася лініями ди-, три- та тетраплоїдних клітин, а також проміжними анеуплоїдними клітинами. При тривалому культивуванні спостерігали відносну збалансованість міксоплоїдної популяції [19, 20]. Враховуючи видиму стабільність модального класу на фоні постійного порівняно високого рівня мінливості, що призводить до появи клітин зі зміненими числами хромосом (більше 8 % анафазних аберацій), можна говорити про встановлення в даній популяції динамічної рівноваги клітин з різним набором хромосом. Ця збалансованість зумовлена, вірогідно, переважною дією стабілізуючого добору [20].

Ще більш вражаючі результати отримано при вивченні калюсної культури тютюну *N. tabacum*. Цей штам вирощували протягом п'яти років у

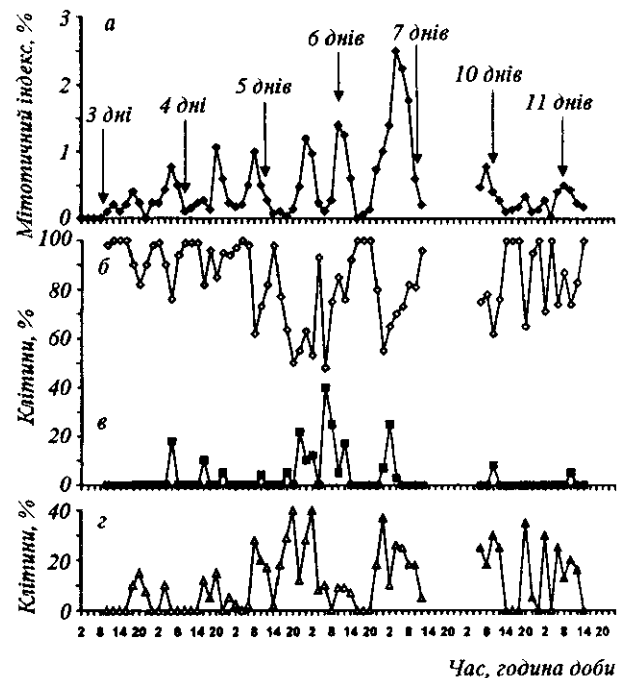


Рис. 4. Добова динаміка мітотичної активності (а), частки диплоїдних (б), триплоїдних (в), тетра- та високоплоїдних метафаз (г) від загальної кількості поділів протягом 11-го пасажу сформованого штаму Г4ГР суспензійної культури гаплопапусу (власні дані)

різних лабораторіях на різних за складом живильних середовищах. Однак число хромосом і рівень аберацій хромосом у цих варіантів були подібними. Надзвичайно ефективною у вивченому штамі виявилася дія стабілізуючого добору: на фоні понад 66 % абераційних анафаз, 6 % серед яких містили 10 і більше аберацій хромосом на клітину, суттєвих змін числа хромосом не встановили. Усталена динамічна рівновага клітин різної плідності виявилася характерною для обох популяцій штаму. Наведені дані свідчать про те, що навіть за різних умов культивування штам може зберігати основні цитологічні і цитогенетичні ознаки, стабілізуючись на практично однаковому рівні гетерогенності за числом хромосом [21].

Наявність генетичного гомеостазу в генетично гетерогенних клітинних популяціях найчіткіше виявляється при клонуванні. Теоретично клонування повинно спричинювати отримання однорідних за спадковими властивостями клітинних ліній. Однак нащадки ізольованих клітин виявилися спадково гетерогенними, причому в більшості настільки гетерогенними, що практично не відрізнялися від вихідних популяцій. Найчіткіше це продемонстровано в дослідах з культивованими клітинами кукурудзи. Вивчення клонів, одержаних від індивідуальних клітин і протопластів вихідної міксоплідної клітинної популяції, тривалий час вирощуваної в умовах *in vitro*, показало, що спочатку клони були різними за рівнем плідності. Очевидно, вони започатковані клітинами з різним числом хромосом — диплоїдними, тетраплоїдними, анеуплоїдними та ін. Однак приблизно через рік всі клони сформували генетично гетерогенні клітинні лінії, які практично не відрізнялися за розподілом клітин з різним числом хромосом від вихідного міксоплідного штаму. Автори розглядають це явище як наслідок адаптивної селекції, що призводить клітинні популяції до оптимального (в даних умовах вирощування) співвідношення клітин з різними числами хромосом [37].

Фенотипова гетерогенність та успадковувальність. Спадкова гетерогенність популяцій культивованих клітин, високий рівень їхньої геномної мінливості можуть зумовлювати нестабільність продуктивності і гетерогенність культури за багатьма фенотиповими ознаками, в тому числі і за рівнем накопичення вторинних метаболітів. Остання є типовою кількісною ознакою.

Одним з найважливіших параметрів, що характеризують популяцію за кількісними ознаками, є коефіцієнт успадковувальності (h^2), який відображає частку спадкової мінливості в загальній фенотиповій мінливості популяції. Однак успадкову-

ваність як суто статистичне поняття — це не тільки характеристика ознаки, але також і популяції, і умов середовища, в яких знаходяться особини даної популяції. Зокрема, чим генетично однорідніша досліджувана група організмів, тим нижчі коефіцієнти успадковувальності і навпаки. Відповідно показник h^2 зменшується при довготривалому доборі за відповідною ознакою. З іншого боку, при більшій варіації зовнішніх умов значення h^2 будуть нижчі, а при однорідних (стабільних) умовах — вищі. Оптимізація умов існування організмів спричинює підвищення коефіцієнта успадковувальності, бо сприяє повнішому вияву генетичних потенцій [38]. Тобто встановлені показники цього параметра відносяться до конкретних популяцій, особини яких знаходяться в конкретних умовах існування.

Коефіцієнт h^2 дозволяє намітити найефективніші методи роботи, спрогнозувати, які результати можна отримати в даній вибірці як при оптимізації умов вирощування, так і при застосуванні різних систем добору. Зрозуміло, що чим вище значення коефіцієнта h^2 у досліджуваній групі організмів, тим ефективнішим повинен бути добір за даною ознакою.

Викладені міркування до недавнього часу стосувалися лише панміктичних популяцій. Вахтін обґрунтував можливість визначення успадковувальності і в клітинних популяціях. Розглянемо ці можливості спочатку на прикладах, наведених у роботах [5, 8].

За Вахтіним, у клітинних популяціях успадковувальність можна визначити трьома способами: 1) за відгуком популяції на дію добору (так звана реалізована успадковувальність); 2) на основі кореляції між ознаками батьківських культур (клонів) і отриманих від них клонів-нащадків; 3) шляхом порівняння дисперсії ознаки в популяції і дисперсії тієї ж ознаки в потомствах окремих клітин.

Чимало прикладів застосування таких підходів для визначення успадковувальності багатьох ознак на прикладі соматичних клітин тварин і людини наведено в монографії [8]. Для рослинних клітинних популяцій поки що застосовувався лише третій, дисперсійний спосіб, в основі якого лежить вивчення кореляції «батьки—нащадки», де батьками слугують вихідні культури, а нащадками — одержані від них клони. Успадковувальність визначали за формулою [28]:

$$h^2 = \frac{\sigma_n^2 - \sigma_k^2}{\sigma_n^2}; \quad \sigma^2 = \frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1},$$

де h^2 — коефіцієнт успадковувальності (коефіцієнт кореляції «батьки — нащадки»); σ_n^2 — дисперсія

ознаки в популяції; σ_k^2 — середня дисперсія ознаки в клонах.

Виходячи з теорії, при визначенні h^2 як коефіцієнта кореляції «батьки—нащадки» в ролі нащадків повинні виступати клони, отримані від однієї клітини.

Однак при аналізі культури тканин рослин для деяких штамів — продуцентів вторинних метаболітів масове отримання клонів від окремих клітин не завжди можливе з кількох причин. По-перше, деяким штамам властива низька спроможність утворювати колонії окремими клітинами. Наприклад, для раувольфії зміїної колонії утворювалися з частотою 10^{-5} — 10^{-6} переважно клітинами з низькою потенційною здатністю до біосинтезу алкалоїдів [28, 39]. По-друге, клонування руйнує клітинну популяцію як сформовану генетично гетерогенну, динамічну, рівноважну біологічну систему. Її відновлення чи формування нової рівноважної системи з окремої клітини займає досить тривалий проміжок часу, як правило, не менше 8—12 пасажів, що складає десятки клітинних поколінь [39]. Структурною одиницею популяції, яка зберігає і відтворює основні її властивості, суттєво не порушуючи фізіологічного і генетичного гомеостазу у вищеленованому експланті і його потомстві, є клітинні агрегати. Наприклад, для раувольфії зміїної мінімальний розмір агрегатів, при використанні яких не відмічали таких генетико-популяційних явищ, як ефект засновника чи ефект «вузької шийки пляшки» («bottleneck effect»), становив близько 0,1 г [28, 39]. Для арнебії барвної такий агрегат може налічувати 10—30 клітин. Тому реально в роботі використовували саме такі агрегатні клони. Однак при цьому потрібно зважати на те, що аналіз агрегатних клонів може суттєво знижувати зареєстровані величини коефіцієнта успадкованості.

Слід також враховувати, що культура тканин рослин — це популяція, для якої можливі, з одного боку, різні комбінації (коливання) умов вирощування і, з іншого, — різний рівень генетичної мінливості. Тому можна очікувати значних коливань значення показника h^2 не лише для різних рослинних культур і штамів, але й для одного й того ж штаму при вирощуванні в різних умовах. Досить чітко це показано для раувольфії зміїної, де в залежності від тривалості пасажу і умов вирощування коефіцієнт успадкованості h^2 ознаки «накопичення аймаліну» коливався від $-0,48$ до $+0,89$ [40, 41]. Певний вплив на значення показника h^2 може чинити і виявлена для деяких штамів залежність продуктивності від рівня плоідності клітин, кількості ядерної ДНК, існування антагонізму

процесів проліферації і диференціювання тощо [28, 42].

Перераховані, а, можливо, й інші ще мало вивчені чинники (наприклад, недостатня стандартизація умов вирощування, особливо протягом пасажу, чи епігеномна мінливість, що потенційно може суттєво підвищувати зареєстровані значення h^2) здатні в тій чи іншій мірі спотворювати істинне значення h^2 . Саме цим можна пояснити його широке варіювання не тільки в різних умовах вирощування клітин [41], але й навіть в одних і тих самих штамах при вирощуванні за однакових умов [40]. Очевидно, що застосування двофакторного дисперсійного аналізу дозволить чіткіше визначити успадкованість кількісних ознак, таких, наприклад, як «вміст вторинних метаболітів».

Незважаючи на згадані недоліки і в ряді випадків невисоку точність визначення коефіцієнта h^2 , запропонований підхід встановлення реалізованої успадкованості був успішно використаний при вивченні культур тканин таких цінних рослин, як раувольфія зміїна та арнебія барвна. Розглянемо ці результати детальніше.

Гетерогенність та успадкованість ознаки «накопичення алкалоїдів» у культурі тканин раувольфії зміїної. Вивчення гетерогенності за вмістом алкалоїдів групи індоліну і успадкованості цієї ознаки було проведене на прикладі клітинної лінії А раувольфії зміїної.

При її клонуванні невеликими шматочками (живою масою не більше 0,1 г) виявлено широкий розмах мінливості за вмістом алкалоїдів групи індоліну (більш ніж чотирикратні відмінності крайніх зразків та вмістом алкалоїдів). Розподіл одновершинний, криві розподілу приблизно симетричні [40]. Отже, ознака «накопичення індолінових алкалоїдів» фенотипово реалізується як типово кількісна ознака, що контролюється багатьма незалежно варіюючими факторами середовища.

Висока варіабельність досліджуваної ознаки в проведених дослідах спостерігалася в кожному з аналізованих пасажів. Від пасажу до пасажу коливалися і середні показники вмісту алкалоїдів, що, вірогідно, зумовлене не лише порівняно малими вибірками проаналізованих у кожному пасажі субкультур, але також і тим, що в дослідах не вдалося повністю стандартизувати умови культивування. Разом з тим спостерігалася тенденція до підвищення вмісту алкалоїдів у ході добору.

Коефіцієнти кореляції вмісту індолінових алкалоїдів у «батьків» і отриманих від них «нащадків» варіювали в широких межах: від $-0,48$ до $+0,89$. Сумарні коефіцієнти кореляції, які чисельно дорівнюють коефіцієнту успадкованості ознаки

Таблиця 2

Вміст шиконіну у вихідних субкультурах арнебії барвної, в отриманих від них клонах і коефіцієнти кореляції «батьки—нащадки» (за [44])

Номер пасажу	Вміст шиконіну у вихідних субкультурах, % від сухої тканини		Кількість клонів	Вміст шиконіну в клонах, % від сухої тканини		Коефіцієнт кореляції
	$M \pm m$	Lim		$M \pm m$	Lim	
<i>Штам АЕ-2</i>						
1	1,5±0,20	1,0—2,1	9	1,51±0,05	1,3—1,8	0,85
2	1,8±0,42	0,9—2,8	6	1,25±0,12	1,0—1,6	0,90
3	1,6±0,36	1,0—2,6	11	1,96±0,09	1,2—2,2	0,88
4	2,1±0,26	1,5—2,8	7	2,00±0,12	1,4—2,2	0,77
5	2,6±0,21	2,0—2,9	8	2,38±0,09	1,8—2,5	0,70
Середнє	—	—	—	—	—	0,82
<i>Штам АЕ-3</i>						
1	5,8±0,30	5,1—6,9	9	5,20±0,25	4,3—6,0	0,07
2	5,5±0,08	5,3—5,7	14	6,04±0,06	5,6—6,2	0,07
3	6,0±0,26	5,2—6,7	10	6,25±0,19	5,0—6,6	0,08
4	6,4±0,10	6,1—6,7	16	7,07±0,61	6,8—7,7	0,06
5	7,2±0,12	6,9—7,5	7	7,56±0,11	7,3—8,0	0,07
Середнє	—	—	—	—	—	0,07

«накопичення алкалоїдів», склали +0,45 при субкультивуванні тканин на 30-й день та +0,12 — при пересадженнях на 40-й день [40].

На основі вищевикладеного можна зробити висновок про те, що клітинна лінія А раувольфії зміної не лише фенотипово гетерогенна за вмістом алкалоїдів групи індоліну, але й спадково гетерогенна за цією ознакою. Про це свідчить як тенденція до підвищення середнього вмісту алкалоїдів у процесі проведеного добору, так і відмінні від нуля величини отриманих коефіцієнтів успадкованості.

Отримані результати були успішно використані в подальшій роботі з культурою тканин раувольфії, спрямованій на отримання нових високопродуктивних штамів та розробку оптимальних умов і технології їхнього вирощування [28, 43].

Гетерогенність за вмістом шиконіну та успадкованість у культурі клітин арнебії барвної. Результати вивчення мінливості, гетерогенності і підтримуючого добору за ознакою «вміст шиконіну» в культурі клітин арнебії барвної *Arnebia euchroma* викладені в роботі [44]. Вивчали два споріднених штами — АЕ-2 та отриманий від нього

методами клітинної селекції більш продуктивний штам АЕ-3. Генеалогія, спосіб отримання, особливості вирощування, продуктивність, морфологічні та цитологічні особливості цих штамів описані в роботах [45, 46].

Варіабельність ознаки «вміст шиконіну» спостерігалася для обох штамів у кожному з проаналізованих пасажів. Привертає увагу значний розмах мінливості і коливання середніх значень цієї ознаки не лише у вихідних (батьківських) субкультурах, але і в клонах (табл. 2). Це можна пояснити як порівняно невеликою кількістю проаналізованих у кожному пасажі клонів і, очевидно, не повністю стандартизованими умовами вирощування, так і тим, що досліджуваний матеріал клонів складала нащадки щонайменше 10—12-го покоління клонованої клітини. Можливо, за цей час у них накопичилися певні генетичні та інші зміни, які й зумовили гетерогенність клонів, що позначалася на варіабельності ознаки.

Важливим є те, що для штамів виявлено досить високу ефективність підтримуючого добору — після п'яти циклів добору за найінтенсивнішим червонобуриєм забарвленням культурального середовища

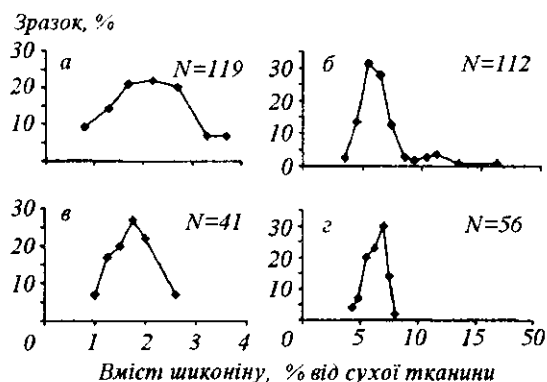


Рис. 5. Розподіл субкультур арнебії барвної *A. sitchensis* за вмістом шиконіну в стандартних умовах вирощування (а, б) та субкультур, отриманих внаслідок клонування (в, г): а, в — штам АЕ-2; б, г — штам АЕ-3; N — кількість вивчених субкультур (за [44])

вміст шиконіну в сухій біомасі в обох випадках збільшився практично в 1,5 разу (табл. 2).

Коефіцієнти кореляції вмісту шиконіну в батьків і одержаних від них клонів (нащадків) коливалися для штаму АЕ-2 в межах 0,70—0,90 (середнє значення +0,82), а для штаму АЕ-3 — в межах 0,06—0,08 (середнє значення +0,07).

Таким чином, обидва вивчені штами арнебії барвної не тільки фенотипово гетерогенні за вмістом шиконіну (рис. 5), але й спадково гетерогенні за цією ознакою. При цьому штам АЕ-2 є більш генетично гетерогенним за ознакою «вміст шиконіну», характеризується високим значенням коефіцієнта h^2 і тому його продуктивність може бути значно підвищена в результаті селекції. Це знайшло свої практичне підтвердження на прикладі одержання штаму АЕ-3 [45].

Штам АЕ-3, очевидно, практично повністю реалізує свій генетичний потенціал за даних умов. Подальше підвищення його продуктивності, можливість якого витікає з даних, наведених, зокрема, на рис. 5, б, може бути досягнуто, очевидно, оптимізацією умов вирощування. Це припущення було підтверджене в експерименті. Так, зміна умов глибинного вирощування штаму АЕ-3 на поверхневе на фоні підтримуючого добору призвела до значного зростання його продуктивності. Середній вміст шиконіну в біомасі калусної культури (калусна лінія АЕ-3к) зріс до 10,3 % (в суспензії — 6,3 %) за розмаху мінливості від 4 до 18 % [44]. Інших відмінностей, зокрема, на цитологічному і біохімічному рівнях між варіантами штаму АЕ-3 (суспензійна культура) і АЕ-3к (калусна лінія) не виявлено [46].

Наведені дані свідчать про ефективність застосування в клітинній селекції рослин статистично-генетичних методів для визначення гетерогенності, мінливості, успадкованості і використання цих параметрів для розробки оптимальних шляхів підвищення продуктивності клітинних культур. Однак слід враховувати ті чисельні погрішності, з якими нерозривно пов'язане визначення успадкованості кількісних ознак у популяціях культивованих клітин і які детально розглянуті на початку цього розділу та в роботах [40—42, 44]. Таким чином, нині можлива лише досить груба оцінка ролі спадкових і середовищних факторів у загальній фенотиповій варіабельності ознак. Але для більшості випадків, як свідчать результати наших досліджень, цього цілком достатньо, оскільки коефіцієнти успадкованості підлягають істотним коливанням залежно від умов, в яких знаходиться популяція [41]. Величини коефіцієнтів успадкованості селективної ознаки є важливими для оцінки добору в популяціях культивованих клітин, оскільки вони безпосередньо визначають його ефективність [5, 8, 38].

Висновки. Будь-які популяції є, як правило, генетично гетерогенними, вони складаються з неоднакових у генетичному відношенні особин і груп. Разом з тим популяція не є випадковим поєднанням особин, вона має певну структуру і особини, що її формують, пов'язані специфічними закономірними відносинами. Популяція — це єдність, якій властиві визначена цілісність та здатність до самовідтворення. Систему популяції можна розглядати як стабільну систему з відомою рівновагою (на даний момент), що підтримується за допомогою саморегулювання. Здатність популяції до саморегуляції, яка виявляється в тому, що певна частина генів після тимчасових зсувів внаслідок зміни умов існування, штучного добору чи інших факторів намагається повернутися до вихідного стану, визначається як явище популяційного (генетичного) гомеостазу [6]. В цілому ж механізми саморегулювання лежать в основі існування і функціонування будь-яких біосистем.

На прикладі природних популяцій показано, що найвищий рівень різноманіття біосистеми характерний для моментів піку чисельності. Різноманіття зменшується або зростає у відповідності до фази популяційного циклу. При досягненні мінімального рівня різноманіття в біосистемах набирають сили механізми гомеостазу, які перешкоджають виходу системи з властивого їй в нормі коливального режиму [25].

Ці положення стосуються і клітинних популяцій. Зокрема, клітини вищих рослин, що трива-

лий час вирощуються в умовах *in vitro*, тобто сформовані клітинні штами, являють собою динамічну, рівноважну, генетично гетерогенну клонову (неменделівську) популяцію. Однією з головних особливостей клітинних популяцій *in vitro* є їхня висока мінливість, що виявляється на всіх рівнях дослідження — анатомогістологічному, цитоморфологічному, цитогенетичному, генетичному, біохімічному, молекулярно-біологічному. Показано, що адаптивність популяцій, їхня стійкість та надійність, особливо клонових популяцій, в тому числі і клітинних, зростають у певних межах пропорційно ступеню генетичної мінливості, яка існує в популяції. Механізми підтримання цілісності генофонду клонових популяцій, а це перш за все стабілізуючий добір, пов'язаний зі спільністю адаптивного типу, є досить ефективними [3].

Популяціям культивованих клітин притаманна подібна природній ритмічна динаміка чисельності зі своїми особливостями, зумовленими вирощуванням клітин у пересадачній культурі. Як і в природі, найбільше різноманіття морфотипів спостерігається в піку чисельності популяції (в кінці пасажу, [34, 47, 48]), а найвища генетична гетерогенність виявляється під час максимумів розмноження (піків мітотичної активності) — як добових, так і пасажних підйомів числа мітозів (рис. 1, 4) [26—28, 40, 42].

При виникненні клону (нової популяції) з однієї або декількох клітин більшість генотипів материнської популяції втрачається. Це супроводжується випадковим дрейфом генів (генотипів) та генетичним ефектом «вузької шийки пляшки» — явищами, добре вивченими та описаними для панміктичних популяцій. Генофонд популяцій, що відновлюються, визначається спочатку збіднілим різноманіттям вихідних генотипів («ефект засновників»), яке в подальшому змінюється внаслідок процесів, спрямованих на відновлення генофонду материнської популяції [4, 7, 24].

Подібні явища в цілому властиві і клітинним популяціям *in vitro*. Елементарною структурною одиницею такої популяції, здатної до відтворення в звичайних умовах головних її властивостей, є багатоклітинний агрегат живою масою біля 0,1 г [28, 39, 46]. Однак, на відміну від панміктичних, на клітинних популяціях встановлено і можливість відновлення окремими клітинами генетичної структури вихідної популяції, особливостей різноманіття її генофонду. Результати вивчення можливого впливу дрейфу генів та ефекту засновників (родоначальників) на особливості динаміки клітинних популяцій свідчать про відсутність помітного внеску ефекту «вузької шийки пляшки» у формування

різноманіття за адаптивними ознаками, перш за все, за особливостями генетичної гетерогенності, та про його суттєвий внесок у явище дивергенції клонів за неадаптивними ознаками в даних умовах існування, наприклад, за рівнем біосинтезу деяких вторинних метаболітів [39].

У процесах відновлення генетичного різноманіття ефективність дії механізмів генетичного (популяційного) гомеостазу є високою: вже приблизно через рік клони у своїй більшості практично не відрізняються за генетичною структурою між собою та від вихідної популяції. Тут спостерігаються практично ті ж явища, які відбуваються в процесі адаптації клітин при введенні їх у культуру *in vitro* і описані нами в попередніх повідомленнях [2, 3]. Зокрема, різка зміна умов існування окремої клітини внаслідок її вицнення із складу сформованої популяції призводить, очевидно, до стресового стану. В результаті підвищується рівень геномної мінливості, починає діяти дестабілізуюча форма добору, гетерогенність серед нащадків однієї клітини зростає. Їхня адаптація завершується формуванням нової популяції, у якій встановлюється динамічна рівновага між процесами мінливості та стабілізуючого добору і спостерігаються ті ж явища стабільної гетерогенності, що були властиві вихідній популяції.

Високу ефективність механізмів гомеостазу, діючих у клітинних популяціях *in vitro*, підтверджує також відносна стабільність генетичної структури сформованих штамів, що спостерігається на тлі високого рівня, який може перевищувати 50 %, аберацій хромосом, порушень мітозу, існування типів поділів клітин та ядер, наслідком яких є значні геномні реорганізації тощо [19—21, 49].

Ці та наведені вище результати досліджень, на думку автора, свідчать про те, що головним механізмом генетичного гомеостазу, який діє в клітинних популяціях, є добір, форма його може змінюватися залежно від конкретних умов існування біологічної системи: в несприятливих умовах функціонує дестабілізуюча форма добору, внаслідок чого невпинно зростає генетична гетерогенність, а при досягненні адаптивного рівня гетерогенності починає діяти стабілізуючий добір різного ступеня жорсткості. Між цими станами, очевидно, суттєву роль відіграє русійний (прямий) добір. Таким чином, і в популяціях культивованих клітин, подібно панміктичним популяціям у природі, системоутворюючим фактором є саме стабілізуючий добір.

Одним із важливих параметрів, що характеризують панміктичну популяцію за кількісними ознаками, є коефіцієнт h^2 , який відображає частку

спадкової мінливості в загальній фенотиповій мінливості популяції. Теоретичне обґрунтування та досліді, проведені Вахтіним на ізольованих клітинах тварин та людини, а пізніше — і наші спільні досліді на культивованих клітинах рослин, показали правомірність і ефективність застосування цього параметра (з певними застереженнями) і для клітинних популяцій. Однак в цілому правомірність застосування в генетиці клітинних популяцій статистично-генетичних методів, розроблених для панміктичних популяцій для визначення гетерогенності, мінливості і успадкованості, ще потребує експериментальних підтверджень. Важливість таких дослідів зумовлена стрімко зростаючою актуальністю підвищення продуктивності клітинних культур, що все ширше використовуються в біотехнологічній промисловості.

Таким чином, вивчення особливостей мінливості популяційно-генетичних параметрів в культурі *in vitro*, зокрема, динаміки генетичної структури, фенотипової гетерогенності та успадкованості показало, що в клітинних популяціях діють переважно ті ж закони, які описані для менделівських популяцій [4, 6, 7, 9, 23—25, 38, 41, 47]. Виявлена відмінність — це здатність окремої клітини при клонуванні відновлювати генетичну структуру вихідної популяції, головні особливості і різноманіття генофонду. Тобто в популяціях культивованих клітин для адаптивних ознак властива, очевидно, відсутність ефекту «вузької шийки пляшки», що в нормі супроводжує явище випадкового дрейфу генів (генотипів). Можливо, це зумовлено вираженою тотипотентністю певних рослинних клітин, здатних до регенерації цілісного організму і відповідно до формування генетичного різноманіття, що спостерігається серед клітин різного ступеня і напрямку диференціації в інтактних організмах [50].

У роботі [1] відмічено, що для соматичних клітин рослин властива еволюційно закріплена висока лабільність геному, здатність до перепрограмування і зміни його структури, до «ювенілізації» стану і в цілому здатність не лише до прогресивної еволюції в процесі розвитку, але й до регресивної еволюції геному при реалізації програми дедиференціації клітин. Це дозволяє рослинам виживати як біологічній системі, а клітинам — адаптуватися до існування в умовах, які виходять далеко за межі норми реакції генотипу в тому визначенні цього терміну, яке сьогодні є загальноприйнятим.

Викладені в попередніх публікаціях та в даній роботі результати експериментів свідчать про те, що для рослин може бути властивим відновлення невеликою групою клітин чи навіть однією клі-

тиною не лише генофонду гетерогенної популяції культивованих клітин, не лише цілісної рослини з генетичним розмаїттям клітин, що її формують, але й, можливо, відновлення (відтворення) щонайменше деяких особливостей структури геному споріднених видів. Зокрема, як описано в роботах [51, 52], мінливість рослинного геному в культурі *in vitro* характеризується не лише розмаїттям, що виходить за межі міжвидового різноманіття, але і як на молекулярному, так, очевидно, й на хромосомному рівні підкоряється закону гомологічних рядів спадкової мінливості Вавілова. Тобто клоновані *in vitro* клітини рослин демонструють розмаїття, яке властиве і описане для природних видів і навіть може значно його перевищувати.

Чи дійсно одна клітина в окремих випадках здатна не лише зберігати, але й реалізувати потенцію відновлювати значну чи, щонайменше, деяку частину генетичного різноманіття даного виду або й роду рослин, повинні висвітлити подальші дослідження.

V. A. Kunakh

Genome variability in somatic plant cells. 7. Variability of population-genetic parameters in the culture *in vitro*

Summary

The results concerning the peculiarities of cell populations maintained *in vitro* conditions for a long time as a novel experimentally developed biological system were reviewed. The selection forms operating in cell populations were discussed. The circadian and passage rhythm of changes in the genetic structure of the prolific component of the population was established. It was concluded that the stable rhythm of cell propagation, time-dependent pattern of division in cells with differing genomes, the dynamic stability of the genetic heterogeneity and especially the unique potential to restore the genetic structure of the initially heterogeneous population by individual cells upon cloning suggest the existence of the highly effective physiological and genetic homeostasis in the cell populations *in vitro*. It was speculated that a single cell was capable not only to retain, but under certain conditions, realize its potential to recover the genetic variety of the species involved and probably the plant genus as well. The features of phenotypic heterogeneity of the cell populations according to the quantitative characteristics, in particular, the level of the secondary alkaloid compounds and naphthoquinone accumulation, and possible ways of estimating the quantitative traits heritability were also discussed. The usage of proposed statistical-genetic methods in the cell selection for evaluation of heterogeneity, variability, heritability is stated to be effective, these parameters being beneficial to optimize the ways for improvement of cell culture productivity.

B. A. Кунах

Геномная изменчивость соматических клеток растений. 7. Изменчивость популяционно-генетических параметров в культуре *in vitro*

Резюме

Сделан обзор данных, касающихся особенностей клеточных

популяций, длительное время выращиваемых в условиях *in vitro*, как новой экспериментально созданной биологической системы. Рассмотрены формы отбора, действующие в клеточных популяциях. Выявлено суточную (циркадную) и пассажную ритмику изменений генетической структуры пролиферирующей составляющей популяции. Сделано заключение о том, что стабильная ритмика размножения клеток, разграничения во времени деления клеток с разными геномами, динамическая стабильность генетической гетерогенности и особенно уникальная способность к воссозданию генетической структуры исходной гетерогенной популяции отдельными клетками при клонировании свидетельствуют о наличии высокоэффективного физиологического и генетического (популяционного) гомеостаза в клеточных популяциях *in vitro*. Высказано предположение, что одна отдельная клетка способна не только сохранять, но и в определенных условиях реализовать способность восстанавливать генетическое разнообразие данного вида, а, возможно, и рода растений. Рассмотрены также особенности фенотипической гетерогенности клеточных популяций по количественным признакам, в частности, по уровню накопления вторичных соединений — алкалоидов и нафтохинонов и возможные пути определения наследственности количественных признаков. Приведены данные по эффективности применения в клеточной селекции предложенных статистико-генетических методов для определения гетерогенности, изменчивости, наследуемости и использования этих параметров для разработки оптимальных способов повышения продуктивности клеточных культур.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 4. Изменчивость в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 4.—С. 298—319.
2. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 5. Изменчивость роста и митотического режима в процессе адаптации к условиям выращивания *in vitro* // Биополимеры и клетка.—1999.—15, № 5.—С. 343—359.
3. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 6. Изменчивость и отбор в процессе адаптации к условиям выращивания *in vitro* // Биополимеры и клетка.—2000.—16, № 3.—С. 159—185.
4. Майр Э. Зоологический вид и эволюция.—М.: Мир, 1968.—598 с.
5. Вахтин Ю. Б. Генетическая теория клеточных популяций.—Ленинград: Наука, 1980.—168 с.
6. Глазко В. И., Глазко Г. В. Русско-англо-украинский толковый словарь по прикладной генетике, ДНК-технологии и биоинформатике.—К.: Нора-принт, 2000.—462 с.
7. Dobzhansky Th. Mendelian populations and their evolution // Genetics in 20th century.—New York: Acad. press, 1952.—Р. 573—589.
8. Вахтин Ю. Б., Пинчук В. Г., Швембергер И. Н., Бутенко З. А. Клонально-селекционная концепция опухолевого роста.—К.: Наук. думка, 1987.—216 с.
9. Шварц С. С., Гурвич Э. Д., Ищенко В. Г., Сосин В. Ф. Функциональное единство популяции // Журн. общ. биологии.—1972.—33, № 1.—С. 3—14.
10. Павлова М. К. Получение одноклеточных клонов в культуре ткани табака // Культура изолирован. органов, тканей и клеток растений.—М.: Наука, 1970.—С. 178—183.
11. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений.—К.: Наук. думка, 1980.—488 с.
12. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция.—К.: Наук. думка, 1990.—280 с.
13. Туманишвили Г. Д. Перспективы исследования роли межклеточных взаимодействий в дифференцировке и росте // Межклеточ. взаимодействия в дифференцировке и росте.—М.: Наука, 1970.—С. 7—23.
14. Туманишвили Г. Д. О понятии «пролиферативный пул» // Цитология.—1972.—14, № 7.—С. 821—829.
15. Фидеева Т. С., Иркаева Н. М. Генетические механизмы, определяющие особенности полиплоидов, и эволюционное значение полиплоидов // Теор. и практ. пробл. полиплоидии.—М.: Наука, 1974.—С. 104—114.
16. Demoise C. F., Partanen C. R. Effects of subculturing and physical condition of medium on the nuclear of a plant tissue culture // Amer. J. Bot.—1969.—56, N 2.—P. 147—152.
17. Шмальгаузен И. И. Избранные труды. Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии.—М.: Наука, 1982.—384 с.
18. Беляев Д. К. Дестабилизирующий отбор // Развитие эволюцион. теории в СССР: 1917—1970 гг.—Л.: Наука, 1983.—С. 266—277.
19. Кунах В. А. Цитогенетическая характеристика культуры ткани гаглопаппуса // Культура изолирован. органов, тканей и клеток растений.—М.: Наука, 1970.—С. 155—158.
20. Сидоренко П. Г., Кунах В. А. Характер изменчивости карิโอטיפа в популяции клеток культуры ткани *Naploparpus gracilis* при длительном пассировании // Цитология и генетика.—1970.—4, № 3.—С. 235—241.
21. Кунах В. А. Полиплоидия в культуре клеток *in vitro* и ее возможные причины // Эксперим. полиплоидия у культур растений / Под ред. В. П. Зосимовича.—К.: Наук. думка, 1974.—С. 39—57.
22. Георгиевский А. Б. К дискуссии о нейтральных признаках // История и теория эволюц. учения.—Л.: Наука, 1974.—С. 85—90.
23. Георгиевский А. Б. Эволюция адаптаций. Историко-методологическое исследование.—Л.: Наука, 1989.—190 с.
24. Тоцкий В. М. Генетика.—Одеса: Астропринт, 1998.—Т. 1, 2.
25. Емельянов И. Г. Разнообразие и его роль в функциональной устойчивости и эволюции экосистем.—К.: ИПЦ Междунар. Соломонов ун-т, 1999.—168 с.
26. Кунах В. А., Лезейда В. С. Цитогенетическое изучение цитокининнезависимого штамма культуры клеток табака // Эксперим. генетика растений / Под ред. В. П. Зосимовича.—К.: Наук. думка, 1982.—С. 74—79.
27. Кунах В. А., Аллатова Л. К. Динамика митотической активности и плоидности делящихся клеток в культуре тканей табака в течение пассажа // Эксперим. генетика растений / Под ред. В. П. Зосимовича.—К.: Наук. думка, 1982.—С. 79—89.
28. Кунах В. А. Геномная изменчивость и накопление индолиновых алкалоидов в культуре клеток раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina Benth* // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 1.—С. 3—30.
29. Кунах В. А., Костенюк И. А., Воллосович А. Г. Увеличение количества ядерной ДНК при биосинтезе алкалоидов в культуре тканей раувольфии змеиной // Докл. АН УССР, Сер. Б.—1986.—№ 7.—С. 62—65.
30. Каллак Х. И., Ярвекюль Л. Я. Цитогенетическая характеристика некоторых штаммов каллуса гороха // Генетика зерновых и бобовых культур.—Орел, 1972.—Вып. 44.—С. 7—16.
31. Gupta K. C. Cytology of Fenugreek calli cultivated *in vitro* // Cytologia.—1973.—38.—P. 437—447.
32. Левенко Б. А. Культура клеток в исследованиях по полиплоидии // Теор. и практ. пробл. полиплоидии.—М.: Наука, 1974.—С. 115—123.

33. Воллосович Н. Е., Воллосович А. Г., Ковалева Т. А., Шамина З. Б., Бутенко Р. Г. Штаммы культуры ткани *Rauwolfia serpentina Benth* и их продуктивность // Растит. ресурсы.—1976.—12, № 4.—С. 578—583.
34. Кунах В. А., Каухова И. Е., Алпатова Л. К., Воллосович А. Г. Особенности поведения клеток в культуре тканей *Rauwolfia serpentina Benth* // Цитология и генетика.—1982.—16, № 5.—С. 6—10.
35. Binarova P., Dolezel J. Alfalfa embryogenic cell suspension culture: Growth and ploidy level stability // J. Plant Physiol.—1988.—133, N 5.—P. 561—566.
36. Кунах В. А. Особенности митотического режима и роста клеток *Naploparpus gracilis* в культуре *in vitro* // Цитология и генетика.—1973.—7, № 6.—С. 510—513.
37. Ву Дык Куанг, Шамина З. Б. Цитогенетический анализ клонов, полученных от индивидуальных клеток и протопластов кукурузы // Цитология и генетика.—1985.—19, № 1.—С. 26—32.
38. Рокицкий П. Ф. Введение в статистическую генетику.—Минск: Вышэйшая школа, 1974.—448 с.
39. Кунах В. А., Можилевская Л. П., Губарь С. И. Особенности получения и изменчивость суспензионных культур и клеточных клонов раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina Benth in vitro* // Биотехнология.—2001.—№ 4.—С. 9—21.
40. Вахтин Ю. Б., Гужова И. В., Николаева Л. А., Кунах В. А. Гетерогенность культуры ткани раувольфии змеиной по содержанию аймалина // Цитология.—1985.—27, № 6.—С. 717—720.
41. Шенелев В. Н., Вахтин Ю. Б. Соматоклональная изменчивость культуры ткани раувольфии по содержанию аймалина при различных условиях культивирования // Цитология.—1996.—38, № 6.—С. 590—595.
42. Николаева Л. А., Вахтин Ю. Б., Гужова И. В., Смирнова И. И., Кунах В. А. Поддерживающий отбор в культуре ткани *Rauwolfia serpentina Benth* // Докл. АН УССР.—1985.—№ 7.—С. 73—75.
43. Кунах В. А., Можилевская Л. П., Алпатова Л. К., Губарь С. И. Устойчивость к 5-метилтриптофану и накопление алкалоидов в каллусной культуре раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina Benth* // Биотехнология.—2001.—№ 3.—С. 3—10.
44. Кунах В. А., Поронник О. О. Гетерогенность за вмістом шиконіну і підтримуючий добір у культурі клітин арнебії барвлячої *Arnebia euchroma* // Доп. НАН України.—2000.—№ 7.—С. 191—195.
45. Кунах В. А., Поронник О. А., Захленюк О. В., Адонин В. И. Получение и характеристика новых клеточных линий арнебии красящей *Arnebia euchroma* (Royle) Jonst., продуцирующих шиконин // Физиология и биохимия культур. растений.—1999.—31, № 3.—С. 208—213.
46. Поронник О. А., Кунах В. А., Адонин В. И. Накопление шиконина и цитологические особенности высокопродуктивной клеточной линии *Arnebia euchroma* при поверхностном и глубинном выращивании // Биополимеры и клетка.—1999.—15, № 6.—С. 501—509.
47. Kunakh V. A. Somaclonal variation in *Rauwolfia* // Biotechnol. in Agriculture and Forestry. Somaclonal variation in crop improvement / Ed. Y. P. S. Bajaj.—Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1996.—Vol. 36.—P. 315—332.
48. Поронник О. О., Мірюта Н. Ю., Адонін В. І., Кунах В. А. Динаміка клітинних популяцій арнебії барвлячої при глибинному і поверхневому вирощуванні *in vitro* // Физиология и биохимия культур. растений.—2000.—32, № 5.—С. 377—385.
49. Кунах В. А. Особенности структурного мутагенеза в популяциях культивируемых клеток растений // Успехи современной генетики / Под ред. Н. П. Дубинина.—М.: Наука, 1984.—Вып. 12.—С. 30—62.
50. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 1. Изменчивость в онтогенезе // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 6.—С. 5—35.
51. Кунах В. А. Еволюція геному рослин в культурі клітин *in vitro*: особливості, причини, механізми та наслідки // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть.—К.: Логос, 2001.—Т. 1.—С. 53—67.
52. Спірідонова К. В., Андрєєв І. О., Солов'ян В. Т., Кунах В. А. Молекулярно-біологічні особливості геномних перебудов у культивованих *in vitro* клітинах раувольфії зміїної // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть.—К.: Логос, 2001.—Т. 1.—С. 422—427.