

UDC 575.2 + 576.312.32 : 581.143

Еволюція клітинних популяцій *in vitro*: особливості, рушійні сили, механізми і наслідки

В. А. Кунах

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

kunakh@imbg.org.ua

*Розглянуто основні ознаки та відмінності клітинних популяцій, типи і напрями дії добору у таких популяціях. Висвітлено популяційно-генетичні основи адаптації клітин до умов росту *in vitro*, зокрема, проаналізовано особливості еволюції геному в процесі дедиференціювання клітин та подальшої адаптації їх до умов росту в пересадній культурі. Обговорено головні чинники мінливості та добору в клітинних популяціях *in vitro*, вплив умов вирощування на структуру клітинних популяцій та деякі закономірності мінливості культивованих клітин і рослин-регенерантів. Наведено особливості створення стабільних клітинних ліній – продуцентів біологічно активних речовин. Викладено погляди і припущення автора, сформовані в результаті аналізу як літературних даних, так і багаторічних власних досліджень з генетики клітинних популяцій. Серед низки інших обґрунтовано такі ключові положення: 1) культура клітин *in vitro* є динамічно-гетерогенною 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 за конкретних умов; 2) у процесі адаптації клітин до умов росту *in vitro* виявляються три періоди: первинної популяції ізольованих клітин, становлення штаму (клітинної лінії), сформованого штаму; поділ на періоди визначається типом, напрямом та жорсткістю «природного» добору, що діє в клітинній популяції; сформовані (адаптовані до росту *in vitro*) штами є генетично гетерогенними, для них характерна наявність фізіологічного і генетичного гомеостазу, що визначається здебільшого дією стабілізуючого добору; 3) культивовані клітини вищих рослин здатні до синтезу практично усіх класів сполук вторинного (спеціалізованого) обміну (алкалоїди, стероїди, терпеноїди та ін.); 4) будь-яка соматична клітина з живим (функціонально активним) ядром при її ізолюванні та подальшому вирощуванні за умов культури тканин внаслідок процесів «соматональної» мінливості, що відбуваються в рамках закону гомологічних рядів у спадковій мінливості М. І. Вавилова, може відновити у своїх нащадках, у тому числі серед рослин-регенерантів, увесь генетичний поліморфізм (або, принаймні, значну його частину), властивий даному виду, та, ймовірно, навіть і роду рослин. Це відкриває можливість збереження і відновлення природного поліморфізму в культурі клітин і тканин *in vitro*.*

*Ключові слова: еволюція геному, клітинні популяції, добір, ріст *in vitro*.*

Культивовані *in vitro* клітини і тканини екаріотів є основою сучасних клітинних і генних технологій. З-поміж них варто згадати клітинні технології оздоровлення, збереження і прискореного розмноження унікальних генотипів, у тому числі із застосуванням методу криоконсервації; створення принципово нових генотипів (організмів) методами клітинної і генної інженерії та клітинної селекції; отримання біологічно активних речовин, серед яких і ре-

комбінантних білків з біомаси культивованих клітин і тканин для потреб медицини, косметичної та харчової промисловостей; методи клітинної терапії, які включають технології, що ґрунтуються на використанні стовбурових клітин тощо [1–7].

Не менше широко культивовані клітини використовують як модельні об'єкти і біологічні системи для вивчення найактуальніших проблем сучасної біології: особливостей перебігу, сигнальних шляхів і механізмів клітинної проліферації, у тому числі онкогенезу і пухлинної проліферації; дедиферен-

ціювання клітин, зокрема, їхній перехід до стану стовбуровості; тоти-, плюри- і омніпотентності; регенерації тканин, окремих органів і цілісних організмів та ін. [2, 8–12].

Методологію вирощування та вивчення ізолюваних клітин і тканин вищих еукаріотів почали інтенсивно розробляти у 1930-х рр. Цитогенетичні дослідження культивованих клітин ссавців і людини свого піку досягли у 1960-х рр. [8–10, 13], а рослин – у кінці 1960-х–на початку 1970-х років (див. [2], розд. 1). На прикладі чималого числа видів встановлено, що клітини за умов *in vitro* характеризуються значними цитогенетичними порушеннями. На основі отриманих результатів склалася думка про високий рівень спадкової мінливості культивованих клітин, про генетичну, перш за все хромосомну, нестабільність клітинних ліній і штамів.

Основні результати і ключові висновки, зроблені на ґрунті отриманих як на той час, так і пізніше експериментальних даних щодо особливостей генетичної мінливості і еволюції клітинних популяцій *in vitro* рослинних культур і клітин ссавців, у тому числі людини, збігаються [2, 9–11, 14]. Спільним у дослідників культивованих клітин еукаріотів став погляд на культуру *in vitro* як нову, експериментально створену біологічну систему [2, 9, 10]. Перехід до системного аналізу популяцій культивованих клітин виявився найпродуктивнішим, саме він дозволив виявити основні закономірності динаміки клітинних популяцій, їхньої адаптації до умов ізолюваного росту, головні напрями еволюції як геному культивованих клітин, так і клітинних популяцій як біологічної системи.

Особливості мінливості і еволюції клітинних популяцій *in vitro*, рушійні сили, механізми та наслідки цих процесів будуть розглянуті далі переважно на прикладі культивованих клітин вищих рослин – об'єкті, досвід експериментальної роботи з яким у автора набагато більший. Викладені нижче узагальнення ґрунтуються, перш за все, на експериментальних даних, отриманих у відділі генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (ІМБіГ). При цьому варто врахувати, що аналогії між клітинними культурами тварин і рослин не є безперечними. Певні специфічні особливості можуть мати, наприклад, рослинні культури близьких видів і навіть сортів та ліній. Те ж саме стосується і клітин ссавців (див. наприклад [2, 9, 10, 13, 14]). Подібними у культивованих

клітин еукаріотів *a priori* можуть бути лише загальні риси і ключові моменти мінливості й адаптивної еволюції, як, зокрема, подібною є будова їхніх клітин і основні моменти функціонування і метаболізму.

Розгляд розпочнемо з деяких основних положень генетики клітинних популяцій, яку значною мірою як науковий напрямок було сформовано саме у відділі генетики клітинних популяцій ІМБіГ.

Основні ознаки та відмінності клітинних популяцій. 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 масштабного обміну спадковою інформацією немає. Відсутність класичної комбінативної мінливості дозволяє віднести клітинні популяції, ґрунтуючись на класифікації Добжанського [15], 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 в клітин еукаріотів, особливо багатоклітинних організмів, виробився ще один тип спадкової мінливості – епігенетична мінливість, яка в клітинних популяціях відіграє велику, а подекуди й ключову роль. Як вважає Вахтін [9, 10], взаємодією спадкової мінливості і добору пояснюються генетичні аспекти таких процесів, як пристосування клітинних популяцій до зміни умов середовища, їхнє старіння та відмирання, перетворення популяцій нормальних соматичних клітин на злоякісні тощо. За аналіз 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.

Ще одним типом 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 вже давно є встановленими фактами (подроблиці і посилання див. [2, 10, 13, 16, 17]).

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 [18]. Висунуто і обґрунтовано положення про те, що рослина – це система клітинних популяцій, яка характеризується пластичністю свого генофонду. В основі останнього лежить пластичність геному соматичних клітин, що за взаємодії з клітинним доббором 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, оскільки вони, очевидно, не зачіпають генетичного коду і, в принципі, є зворотними, що особливо яскраво виявляється у процесах дедиференціювання–редиференціювання [16, 17].

Перенесення клітин у культуру *in vitro* означає припинення їхнього існування як одного із структурних елементів цілісного організму, до складу якого вони входили раніше. Індукція дедиференціювання (у рослин – калюсогенезу) призводить до змін морфологічних і функціональних особливостей, які були властивими нормальній диференційованій клітині, деякі з них починають проліферувати, у інших клітин змінюється швидкість розмноження. При цьому клітина за умов *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 напрямку та інтенсивності дії клітинного доббору і, як наслідок, до істотних порушень у структурі клітинних популяцій. В 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, [2], розд. 8.3; [19–28]).

Добір у клітинних популяціях. У сформованих (тривалий час пасажованих за умов *in vitro*) штамах і клітинних лініях, як і в цілому організмі, переважають дві форми добору – стабілізуювальний і рушійний (прямий, прогресивний). У клітинних популяціях інтактних організмів домінує стабілізуювальний добір, що ґрунтується на перевагах норми над усіма можливими відхиленнями. Нормою для інтактного організму в клітинних популяціях, що проліферують, наприклад, у меристемі рослин є клітини з диплоїдним каріотипом та епігеномним, властивим клітинам даної популяції. Усі аберантні форми (клітини з хромосомними і геномними мутаціями) менше пристосовані, вони або втрачають здатність до поділів, або діляться менш інтенсивно і згодом витісняються із складу популяції клітинами з незмінним генотипом [2] (розд. 4.2; 4.3).

Добір у клітинних популяціях ґрунтується на диференційному розмноженні спадково відмінних варіантів клітин. Розбіжності у темпах проліферації спричиняють 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 піддається дії негативної селекції, не відбудеться, зменшуватиметься лише його частка [9].

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 стабілізуювального добору в клітинних популяціях [2] (розд. 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 епігеномним), в результаті інтенсивність стабілізуювального добору падає, спадково змінені варіанти повільніше витісняються зі складу популяцій. Одночасно з погіршенням (різкою зміною) умов середовища підвищується частота виникнення нових аберантних форм. За-

галою, коли клітини перебувають в умовах існування, що виходять за межі норми реакції їхнього генотипу, тобто переходять до справді стресового стану (наприклад, при перенесенні їх в умови *in vitro*), у популяції клітин починає діяти дестабілізуювальний добір. Ця форма добору призводить до різкого посилення генетичної мінливості внаслідок порушення корелятивних систем організму, головним чином, гормональної системи, що виникає за стресових впливів ([2] розд. 4.4; 8.3; 8.4; [29]). Результатом дії дестабілізуювального добору є значне зростання генетичного розмаїття у клітинних популяціях. На фоні високої геномної мінливості в подальшому як виявлення тиску змінених умов існування починає діяти рушійний чи стабілізуювальний (залежно від конкретних умов) добір.

Особливості й ефективність дії різних форм добору у процесі формування популяцій культивованих клітин і в сформованих штаммах детально розглянуті у книзі [2] (розд. 8.3 і 8.4). Тут відмітимо лише, що популяції ізольованих клітин порівняно з такими мітотично активних клітин інтактних організмів є набагато генетично гетерогеннішими. Ця гетерогенність є стабільною [2] (розд. 8.1.3), що свідчить про переважаючу дію в таких популяціях стабілізуювального добору. При цьому слід врахувати, що коли ознака, за якою йшов добір, стабілізується, це не означає, що дія добору в популяції за цією ознакою припинилась: змінюється лише роль добору в популяції – його дія спрямовується на підтримання досягнутої структури популяції і нової середньої величини ознаки. Якщо інтенсивність такого підтримуючого добору знижується, зменшується і середня проліферативна активність клітин у популяції. Такий добір не можна назвати стабілізуювальним, якщо суворо дотримуватися визначення, тому що в цьому разі всі спадкові варіанти з підвищеною проліферативною активністю характеризуватимуться збільшеною 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 стабілізуювальна 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 [30–33] (див. також [2], розд. 8.3).

Отже, одним із найважливіших чинників підтримання генетичної гетерогенності є фенотиповий поліморфізм, який забезпечує існування популяції за мінливих умов довкілля, зумовлюючи її лабільність, наявність преадаптацій. Тому поліморфізм можна розглядати як вияв еволюційно сформованого генетичного гомеостазу. Природний добір закріплює існування поліморфізму за рахунок контролю чисельних співвідношень необхідних форм [34]. Між чинниками добору і спадковою мінливістю існує пряма залежність. У разі різкої зміни умов зовнішнього середовища популяція має можливість пристосуватися до них внаслідок або використання наявного мутаційного резерву, або ж зростання частоти виникнення нових мутацій. Поява неспрямованих спонтанних мутацій та наступний добір сприяють поступовим змінам популяції, причому ці зміни можуть створювати враження спрямованих. Такі положення популяційної генетики, встановлені спочатку для вищих організмів, нині є загальноприйнятими для популяцій будь-якого типу.

Однак популяціям культивованих клітин притаманні деякі специфічні особливості, зокрема:

- клітинні популяції відрізняються від таких багатоклітинних організмів відсутністю комбінативної мінливості та наявністю і великим значенням для функціонування ізольованих 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 далі відхиляються умови життєдіяльності клітин від оптимальних, тим вищий рівень спадкової мінливості і генетичної гетерогенності, що й спостерігається за таких екстремальних умов, як ізольований ріст *in vitro*;

- у процесі одержання і формування штамів, здатних до тривалого субкультивування, геном як окремих клітин, так і генетична структура клітинних популяцій докорінно змінюються; окремі геномні зміни можуть перевищувати навіть природні міжвидові відмінності [19–28].

Ці та інші особливості популяцій культивованих клітин розглянуто далі.

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

тини рослин є клоновою популяцією, у якій роль організмів виконують окремі клітини. Вихідні клітини інтактних багатоклітинних організмів не запрограмовані на виконання цих функцій. Тому явища, що відбуваються в клітинних популяціях протягом їхньої адаптації до умов тривалого культивування *in vitro*, є процесами формування нової біологічної системи і мають загальнобіологічне значення. Це унікальна модель глибокої, але (якщо потрібно) зворотної (за індукування процесів морфогенезу і регенерації) регресивної еволюції біологічної системи – від багатоклітинного рівня до одноклітинного. У загальній теорії еволюції регресом (морфофізіологічним регресом) постулюється шлях розвитку, який веде до спрощення організації, втрати важливих, навіть основних морфофізіологічних і фізіологічних ознак, які характеризують більше або менше диференційованих предків [35].

За введення клітин і тканин еваріотів у культуру *in vitro* внаслідок дедиференціювання та (у рослин) калюсоутворення спрощуються організація клітин та їхня структура, втрачаються деякі важливі і навіть головні морфологічні і фізіологічні ознаки, властиві вихідним диференційованим клітинам. Тому, спираючись на загальноновизнані еволюційні терміни, калюсогенез, подібно до канцерогенезу, можна вважати регресивним шляхом розвитку клітин [8], а геномні зміни, що спостерігаються при цьому, – регресивними. Здатність до таких перебудов, вірогідно, і визначає можливість дедиференціювання клітин і, в кінцевому підсумку, – калюсоутворення.

Першим етапом отримання культури ізольованих клітин є індукція процесів дедиференціювання і подальших поділів дедиференційованих клітин (проліферації). У багатьох видів рослин, особливо у дводольних, здатність до дедиференціювання притаманна клітинам будь-якого рівня диференціювання і спеціалізації за умови, що вони містять живе ядро [36]. 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, тобто до «ювенілізації» геному. Це проявляється розмаїттям геномних перебудов, рівень, ти-

пи та спрямованість яких у різних об'єктів неоднакові. 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. Особливо значна реорганізація геному на всіх рівнях вивчення (геномному, хромосомному, молекулярному) спостерігається у тих рослин і тканин, у яких в онтогенезі 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 генотип/середовище. Вона ґрунтується на тому, що поранення, компоненти живильного середовища, конкретні умови культивування клітин впливають на експресію генів, відповідальних за дедиференціювання (калюсоутворення).

Ці самі чинники детермінують включення певних елементів мутаторної системи.

У цілому геномні реорганізації, які рееструються 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 онтогенезі вихідного організму та виявляються у разі проходження мітозу *in vitro*;
- зміни та мутації, що з'явилися під впливом умов індукування калюсоутворення, які (умови) у деяких випадках виходять за межі норми реакції конкретного генотипу та спричиняють геномні перебудови [36, 37].

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, внаслідок димінуції хромосом і хроматину;
- цитоміксис (обмін ядерним матеріалом між клітинами);
- зміна кількості В-хромосом (спочатку, як правило, збільшення їхньої кількості, а за тривалого пасажування – втрата, особливо тканиноспецифічних);
- фрагментація, перешнуровування і брунькування ядер (амітоз);
- аномалії мітозу і цитокінезу, зокрема, утворення синцитіїв; вони часто обумовлені аномаліями мікротрубочок;
- злиття ядер у багатоядерних клітинах;
- виникнення мікроядер за відсутності аберантних анафаз;
- сегрегація ядерного матеріалу в профазах і метафазах не лише поліплоїдних, а й диплоїдних клітин, яка призводить до редукції числа хромосом;
- поява, а надалі поступове зникнення політенних хромосом, яке може відбуватися, очевидно, поступово, за рахунок зменшення кількості ниток у початково політенних хромосомах;
- соматичний мейоз і кросинговер;
- транспозиції мобільних генетичних елементів та ін.

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

Розвиток цих процесів уявляється наступним чином. Початковим індуктором дедиференціювання є травма, внаслідок якої запускаються процеси мінливості (спочатку – епігеномної), що супроводжують дедиференціювання клітин і перші етапи їхньої проліферації, спрямовані у природі на загоєння рани. У клітинах рослин змінюється компетентність щодо фітогормонів, сахарози та інших регуляторів росту. Використання цих біологічно активних компонентів під час культивування тканин *in vitro* за оптимальних концентрацій не лише прискорює і посилює, а й спотворює запрограмований перебіг процесів мінливості.

Іншими словами, геномна мінливість, що спостерігається за калусоутворення *in vitro*, – це гіпертрофоване та дещо спотворене виявлення процесів,

які відбуваються в природі під час індукції дедиференціювання та проліферації клітин, наприклад за поранення [36–37].

Адаптація клітин до умов росту в пересадній культурі. Отримання пристосованої до умов тривалого росту культури клітин – процес складний і багатоступінчастий. Він вимагає, як уже зазначалося вище, радикальної перебудови як функцій і метаболізму вихідних клітин багатоклітинного організму, так і структури клітинних популяцій. Адаптація до умов тривалого вирощування клітин і тканин *in vitro* проходить, як і інших біологічних угруповань, на основі взаємодії процесів мінливості і добору.

Мінливість на перших етапах культивування є наслідком фізіологічної адаптації. У подальшому протягом субкультивування відбуваються процеси генетичної адаптації, які проявляються у зміні генетичної структури клітинних популяцій. За адаптації клітинних популяцій до умов росту *in vitro* можна виділити три періоди: первинної популяції ізольованих клітин, становлення та сформованого штаму [33, 38].

Клітини, що перебувають у періоді первинної популяції (первинний калус і перші 2–3 пасажі), характеризуються порівняно незначними генетичними відмінностями від мітотично активних клітин вихідної рослини (вихідного експланта чи ранового калусу), 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 для процесу адаптації клітин до умов росту в пересадній культурі – остаточно перестають діяти інтегративні механізми 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 істотних перебудов зазнають фізіологічні процеси в клітинах і структура клітинних популяцій в цілому. Саме для цього періоду характерні найзначніші зміни, внаслідок яких клітинні угруповання як біологічна система адаптуються до змінених порівняно з первинним калусом (нульовим пасажем) умов існування.

Зокрема, у періоді становлення переважають наступні явища:

- змінюється морфологія і темп росту клітинних штаблів (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;
- підвищується рівень і розширюється спектр геномних порушень, перш за все, збільшується кількість клітин зі зміненими числами хромосом;
- змінюються рівень і спектр аберацій хромосом; найсуттєвішу роль у цьому 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;
- підвищується рівень гетерогенності за більшістю цитологічних, біохімічних та молекулярно-біологічних маркерів;
- одночасно відбуваються позитивна селекція клітин, пристосованих до умов *in vitro*, та елімінація непристосованих та ін.

На фоні високого рівня і широкого спектра мінливості та гетерогенності дія рушійного добору зумовлює генетичну адаптацію популяцій клітин. При цьому деякі лінії припиняють свій ріст і гинуть, очевидно, внаслідок відсутності адаптивних змін. Практично за всіма ознаками спостерігаються можливі типи еволюції споріднених клітинних штаблів – дивергенція, конвергенція, паралелізм [2, 28, 38–43].

Головні чинники мінливості і 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 події (зумовлюючи, серед іншого, й апоптоз). Водночас гормони є складовими загальних мутагенних та антимутагенних систем рослин, які визначають рівні природного (спонтанного) мутування. Аналіз результатів власних експериментів і літературних даних дозволив припустити, що головною причиною високої геномної мінливості культивованих клітин рослин

є порушення гормонального балансу ([2], розд. 8; [44]). Розглянемо це положення та наслідки, що з нього випливають, детальніше.

В інтактних організмах гормональний стан і компетентність проліферуючих тканин спрямовані на створення оптимальних умов для ділення та росту клітин. У нормі гормональний фон і відповідна компетентність клітин зумовлюють стабілізуювальний добір, внаслідок якого з популяції клітин, що діляться, видаляються клітини з геномними порушеннями, які виникають з тих чи інших причин. У тканинах, що диференціюються, гормональний фон і компетентність клітин інші – залежно від майбутніх функцій під впливом фітогормонів відбуваються не лише морфологічні і біохімічні зміни клітин, а й запрограмовані зміни їхнього геному, спрямовані в кінцевому підсумку на виконання конкретної функції (див. [2], розд. 4).

У культурі *in vitro* ситуація інша. Тут одне з головних завдань – отримання з вихідних диференційованих (спеціалізованих) тканин клітин, що швидко діляться і ростуть (проліферують). Для цього емпірично створюють відповідні умови: до живильного середовища для культивування додають 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 і його повернення до стану, характерного для проліферуючих клітин, тобто до «ювенілізації» геному. Це виявляється у вигляді різноманітних геномних перетворень, рівень, типи та спрямованість яких у різних об'єктів різні. Ці зміни є, в основному, запрограмованими [2] (розд. 7.2). Тому ми вважаємо, що для рослин, які за природних умов 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 епігеномних змін.

При застосуванні оптимальних для проліферації впливів, у тому числі гормональних, умови існування клітин у первинному калюсі *in vitro* можна порівняти з такими *in vivo* у цілісному (але пораненому) організмі. Ці умови зберігаються *in vitro* протя-

гом певного часу, як правило, впродовж перших двох, щонайбільше чотирьох пасажів. У результаті первинний калюс і клітини кількох перших пасажів являють собою систему, яку можна порівняти в цілому з меристемою інтактною 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), переважаючи дію стабілізуючого добору.

За подальшого субкультивування відбувається добір клітин, що найінтенсивніше діляться, та/або ділянок ізольованих тканин, що найшвидше ростуть; тобто добираються клітини зі зміненням гормональним балансом та/або зміненою реакцією (компетентністю) на гормони. При цьому поступово зникають інтегративні 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 їхнього культивування, але 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 провідна роль належить екзогенним гормонам та компетентності клітин (насамперед компетентності щодо гормонів). Для клітин диких видів рослин з простими геномами характерним є невисокий рівень та неширокий розмах геномної, зокрема, каріотипової мінливості. Клітини більшості культурних видів характеризуються *in vitro* значно ширшим розмахом мінливості. Це зумовлено, очевидно, не лише поліплоїдним станом геному переважної кількості культурних рослин, а й тривалим впливом дестабілізуючого добору в процесі їхнього окультурення і подальшого вирощування – селекції. У результаті відселектовані форми лабільніші, помітніше реагують на зміни умов вирощування (у тому числі на гормональні впливи): під час введення в культуру *in vitro* демонструють ширший розмах мінливості, особливо каріотипової. У багатьох таких видів рослин результати дестабілізуючого добору виявляються вже у первинному калюсі [2] (розд. 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 за конкретних умов ізольованої культури. Головні механізми мінливості, на основі яких за вирішальної ролі добору здійснюється еволюція геномної структури клітинної популяції, – це:

– зміна кількості і морфології хромосом внаслідок порушень та відхилень від нормального перебігу мітозу, циклу розрив–злиття–міст (циклу мостів) та інших процесів (див. попередній розділ);

– соматичний кросинговер;

– зміна експресії генів, у тому числі їхня репресія і дерепресія, в основі чого лежить переважно зміна метилювання ДНК;

– ампліфікація і делеція (редукція) повторів ДНК;

– транспозиції;

– генні мутації.

Оскільки культурі ізольованих клітин і тканин рослин притаманні зміни кількості хромосом, підвищення рівня їхніх структурних перебудов, зміни кількості і розподілу С-гетерохроматину, а інші відхилення у 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 з різними наборами хромосом, стабілізації їхньої кількості та співвідношення на визначеному рівні, добору 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, а надалі зростає генетична гетерогенність популяції за числом і морфологією хромосом в результаті відхилень від нормального перебігу мітозу та циклу мостів. І лише потім реєструються переважно ті зміни (перебудови), які формують нові клітинні варіанти з відмінностями на рівні послідовностей ДНК.

Дані, що підтверджують саме такий перебіг подій, є практично в усіх опублікованих роботах, де наведено результати вивчення геномної мінливості у динаміці субкультивування (пасажування) клітинних культур найрізноманітніших видів рослин (див., наприклад, [19–28, 45–51]).

Після 8–10-го пасажу штами здебільшого стабілізуються за багатьма вивченими ознаками. Вони

гетерогенні, але їм притаманне 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 за перманентно високого рівня мутаційного тиску ([2], розд. 8.3.2; [45–51]). Варто зазначити, 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 можна регулювати екзогенними фітогормонами [30, 53]. Змінюючи наявність або відсутність та співвідношення фітогормонів у живильному середовищі, можна також впливати на рівень плоідності культивованих клітин. Механізми подібної регуляції розглянуто в публікаціях [2] (розд. 8.3.2) і [31, 54].

Особливо потрібно підкреслити, що культивовані впродовж тривалого часу (десятки і більше пасажів) клітинні культури з активним неорганізованим типом росту є гетерогенними популяціями клітин з реорганізованими геномами. Популяції, в яких більшість становлять клітини з вихідним геномом (геномом, властивим клітинам/тканинам вихідних експлантів), як правило, в субкультивованій культурі не ростуть, вони припиняють ріст і гинуть на перших етапах субкультивування (у періоді становлення штаму). У деяких експериментах встановлено пряму кореляційну залежність між здатністю до тривалого росту калюсу *in vitro* і часткою клітин з реорганізованим геномом (подробити і посилання див. [2]). 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, численні результати експериментів, накопичені на всіх рівнях дослідження – від клітинного до біохімічного і молекулярно-генетичного, – свідчать про те, що в період сформованого штаму більшість клітинних популяцій характеризується відносною стабільністю ознак, які з'явилися у період становлення, наявністю фізіологічного і генетичного гомеостазу, зумовленого переважною дією стабілізуювального добору (напряма і сила якого значно відрізняються від таких в інтактному організмі та в рановому калюсі). Геномні реорганізації сформованих штамів мають невідповідний, каналізований характер, що свідчить про певну єдність меха-

нізмів адаптації та еволюції геному рослин у природі та в культурі *in vitro*.

Подібні процеси і періоди (стадії) відомі для клітин людини і тварин у культурі протягом становлення постійних клітинних ліній, за пухлинного росту, а також за нормального онтогенезу [9, 10, 13, 14, 55]. Такі події і явища властиві також прокаріотам за різкої зміни умов існування [56]. Це свідчить про універсальність адаптаційних механізмів клітинних популяцій, яка не залежить від ступеня еволюційного розвитку організмів.

Вплив умов вирощування на генетичну структуру клітинних популяцій. Вплив деяких компонентів живильних середовищ та умов індукції диференціювання і калюсогенезу (температура, освітлення, мінеральний склад середовища та вміст 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 детально розглянуто в [2] (розд. 7.2; 9) [31, 57]. Склад культурального середовища та інші зовнішні чинники значною мірою визначають напрям змін геному культивованих клітин у процесі їхньої адаптації до умов росту *in vitro* і тому їх можна використовувати як регулятори мінливості і клітин не лише в разі індукції калюсоутворення, а й при отриманні субкультивованих культур і сформованих клітинних штамів. Одержання та подальше субкультивування клітинних культур за неоднакових умов та на різних за складом живильних середовищах можуть призводити до формування штамів, які відрізняються за багатьма параметрами:

- рівнем і типом хромосомних аберацій;
- розмахом мінливості за кількістю хромосом і їхнім 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* неоднаково реагують на зміну культуральних умов. Несформовані штами, які перебувають у стадії первинної популяції або в періоді становлення, після змі-

ни умов культивування започатковують культуру, що, як правило, відрізняється за генетичними та іншими параметрами від вихідної популяції. Зміна умов культивування сформованих штамів (субкультивованих понад рік) у багатьох випадках спричиняє зміни генетичної структури клітинних популяцій, які найкраще можна виявити хромосомним аналізом. Через 2–4 пасажі (інколи пізніше) за змінених умов спостерігається або стабілізація популяції на новому рівні генетичної гетерогенності, або наближення (повернення) до вихідної генетичної структури популяції. Тобто сформовані штами (на відміну від тих, що перебувають у періоді становлення) характеризуються наявністю не лише фізіологічного, а й генетичного гомеостазу, зумовленого переважно дією стабілізуючого добору [2] (розд. 8.3 і 8.4) [58, 59].

Сформовані штами за стабільних умов навіть упродовж десятків років вирощування в промислових масштабах на заводах лише зрідка 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. За подальшого культивування в змінених умовах у популяції часто відновлюється вихідне співвідношення клітин з різним числом хромосом [2] (розд. 8, 9) [54].

Деякі закономірності мінливості культивованих клітин і рослин-регенерантів. Накопичені результати свідчать про наявність певних закономірностей геномної мінливості у культивованих клітинах: ті зміни, які відбулися в культивованих клітинах, у природі зумовлюють як внутрішньовидову, так навіть і міжвидову варіабельність. Це встановлено як на хромосомному рівні, так і на рівні послідовностей ДНК, зокрема, на прикладі послідовностей рДНК. Зроблено висновок про не випадковий характер змін геномів культивованих клітин вивчених видів рослин, а саме: про їхню подібність до змін, які відбулися в природі у процесі видоутворення, про певну єдність механізмів адаптації та еволюції геному рослин у природі та в культурі *in vitro* [16, 17, 19–28].

Аналіз біохімічних змін також свідчить про те, що в деяких випадках мінливість *in vitro* може виходити за межі роду, тобто клітини зі зміненим геномом здатні набувати ознак, властивих представ-

никам інших родів цієї родини. Наприклад, для тропічної лікарської рослини раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* у природі притаманне накопичення кількох десятків алкалоїдів, здебільшого резерпіну. Культивовані клітини також можуть акумулювати цінні алкалоїди (клітинна селекція дозволила отримати штами – суперпродуценти за деякими алкалоїдами – див. [2, 3, 46, 61]), але серед них резерпіну практично немає, а близько 90 % становлять аймалін та інколи 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 [46, 61].

Також відомо, що культивовані клітини різних видів маку, зокрема, *Papaver bracteatum* та *P. somniferum* звичайно не накопичують морфінових алкалоїдів. У їхній біомасі переважають сангвінарин та його похідні у кількості і співвідношеннях, наближених до таких у клітинах інтактних рослин іншого виду родини *Papaveraceae* – Маклея. Подібних прикладів описано чимало [22, 23, 62, 63].

Виявлена особливість – каналізованість геномних змін у процесі адаптації клітин до умов росту *in vitro* – певною мірою дає можливість прогнозувати такі зміни і вести цілеспрямований пошук соматоклональних варіантів подібно до того, як це роблять у дослідах з інтактними рослинами на основі закону гомологічних рядів у спадковій мінливості М. І. Вавилова. Експериментально це доведено в роботі з кукурудзою – після клітинної селекції отримано рослини-регенеранти з новими ознаками, які раніше виявляли лише у поодиноких випадках в окремих генотипів (ліній), зокрема, одержано соматоклональні варіанти з високою успадковуваною здатністю до регенерації цілісних рослин [64, 65].

Однак не всі геномні зміни, що спостерігаються в популяціях культивованих клітин, виявляються на рівні рослин-регенерантів.

Регенерація рослин у культивованих протягом тривалого часу штаммах із суттєво перебудованим геномом індукується з низькою частотою, більшість отриманих регенерантів є аномальними і, як правило, багато з них гине на ранніх етапах онтогенезу. Отримані життєздатні регенеранти мають переважно нормальний каріотип, вони диплоїдні, рідше – тетраплоїдні, частота рослин зі значними перебудовами геному серед них є низькою. Це встановлено

нами на прикладі багатьох видів рослин (подробіці і посилання див. [2], розд. 7.3).

На основі отриманих результатів нами зроблено висновок про те, що в генетично гетерогенних популяціях здатність до регенерації мають переважно диплоїдні, рідше – тетраплоїдні клітини без видимих хромосомних аберацій [66–69]. 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 поклали на культуру ізольованих клітин і тканин як на невичерпне джерело нових форм рослин з раніше невідомими ознаками, цінних для генетико-селекційної роботи. На сьогодні соматоклональних варіантів з принципово новими ознаками отримано одиниці (підтвердження і посилання див. [2, 4, 6, 7, 11, 12, 22, 23, 68–71]).

Таким чином, 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 соматоклональної мінливості лише в окремих випадках долає бар'єр конкретного виду рослин. Найчастіше мінливість серед рослин-регенерантів, отриманих від одного генотипу, лежить у межах популяційної мінливості вихідної рослини.

Створення стабільних клітинних ліній – продуцентів біологічно активних речовин. Описана вище динамічна стабільність генетичної структури сформованих клітинних штаблів (стабільність їхнього генофонду) лежить в основі створення і застосування у виробництві клітинних біотехнологій одержання цінної сировини рослинного походження для потреб медицини, харчової і косметичної промисловості та ін. (подробіці див. [2, 3, 5, 46]).

Розроблена у відділі генетики клітинних популяцій ІМБіГ низка таких клітинних ліній і штаблів 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 штаблів-продуцентів розробленої нами методики підтримуючого добору і спеціальних скла-

дів живильних середовищ, а також інших умов культивування. Це стосується перш за все найпродуктивніших у світі штаблів раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina*, що вже протягом майже 40 років стабільно накопичують 1,8–2,2 % аймаліну, а також високопродуктивних, у тому числі за промислових умов зростання, штаблів женьшеню *Panax ginseng*, золотого кореня *Rhodiola rosea*, арнебії барвної *Arnebia euchroma*, унгернії Віктора *Ungernia victoris*, синяка подорожничкового *Echium plantagineum*, деяких видів маку *Papaver* і тирличів *Gentiana* тощо.

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

– культивовані клітини здатні до синтезу практично всіх класів сполук вторинного (спеціалізованого) обміну (феноли, глікозиди, алкалоїди, у тому числі стероїди, флавоноїди, 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 оптимізацією складу живильного середовища і підбором 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 у клітинній культурі диференційованих (морфогенних) структур;

– синтез вторинних сполук, як правило, поліпшується у разі сповільнення або припинення росту клітинної культури;

– стабільність синтезу вторинних сполук неоднакова для різних класів речовин і різних клітинних культур: синтез стероїдних глікозидів переважно стабільний, тоді як синтез багатьох типів алкалоїдів – нестабільний (за винятком, наприклад, індольних алкалоїдів в отриманих нами клітинних лініях раувольфії зміїної);

– для метаболізму вторинних сполук у культурі клітин рослин часто характерними є регресивні змі-

ни як в онтогенетичному, так і філогенетичному плані; тобто спеціалізований обмін у культурі має ознаки, специфічні для філогенетично архаїчних груп рослин або ювенільної стадії інтактною рослини (подробити і посилання див. [2, 3, 5]).

З урахуванням цих закономірностей створено клітинні штами за рахунок 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 їхнього 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 потрібних алкалоїдів;

- підбір високопродуктивної рослини-донора (вихідного генотипу), а інколи – ще й конкретного її органа або тканини – для отримання клітинної культури;

- маніпуляції з культурою клітин, включаючи одержання мутантів, соматоклонів та інші підходи клітинної селекції, спрямовані на отримання генетично змінених високопродуктивних штамів (клітинних популяцій зі зміненим генофондом);

- розробку складу живильного середовища, умов і способів вирощування, оптимальних для стабільної реалізації генетично обумовленої здатності до синтезу цільових речовин;

- вплив на ріст (проліферацію) клітин у культурі для призупинення чи сповільнення росту, що може змінювати метаболізм клітин у напрямку синтезу речовин спеціалізованого обміну, зокрема, з цією метою успішно застосовують інгібітори транскрипції і трансляції;

- пошук сигналів, за допомогою яких у рослинах здійснюється 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 в багатьох випадках спрощує умови культивування і підвищує вміст цільових вторинних метаболітів;

- одержання трансгенних культур (як клітинних і тканинних, так і цілих рослин) для синтезу

цільового продукту, зокрема, тваринного походження, вакцин, специфічних білків людини і т. п. (молекулярне фермерство) (подробити і посилання див. [2, 3, 5]).

У нашому відділі розроблено математичні моделі, що дозволяють цілеспрямованіше створювати і характеризувати нові клітинні лінії і штами-продукенти [77–80].

Пластичність геному соматичних клітин і адаптивність рослин. Підсумок. Аналіз результатів багаторічного вивчення динаміки генетичної структури клітинних популяцій, ролі і особливостей дії добору в процесі адаптації клітин до умов вирощування *in vitro*, мінливості і 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 за конкретних умов;

- адаптація клітин до умов тривалого культивування *in vitro* – процес складний і багатоступінчастий; на різних стадіях формування культури *in vitro* (дедиференціювання клітин і їхньої подальшої проліферації, перших пасажів *in vitro*, тривалого субкультивування) спостерігаються неоднакові типи і рівні мінливості, діють різні форми природного добору – дестабілізуювальний, рушійний (спрямований) або переважно стабілізуювальний;

- 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 характерна наявність фізіологічного і генетичного гомеостазу, які зумовлені здебільшого дією стабілізуювального добору;

– сформовані штами є генетично гетерогенними клітинними популяціями; розмах мінливості за низкою ознак у культурі тканин деяких видів рослин (їхніх окремих генотипів?) може 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;

– подібність геномних змін, що спостерігаються за 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, безперечно, має 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 детектуються у 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 не відомими селекціонерам; насамперед це стосується видів рослин із простими (неполіплоїдними) геномами;

– встановлення особливостей і виявлення основних чинників і рушійних сил геномної мінливості клітинних популяцій *in vitro* дає змогу пев-

ною мірою регулювати не лише генетичну структуру клітинних популяцій, а й функціонування їхнього геному, зокрема, біосинтез вторинних метаболітів; завдяки цьому створено високопродуктивні клітинні лінії і штами рідкісних та особливо цінних лікарських рослин – альтернативне джерело екологічно чистої сировини для фармацевтичної промисловості.

Узагальнення викладених вище даних дозволило висловити наступне припущення:

– будь-яка соматична клітина з живим (функціонально активним) ядром при її ізолюванні та подальшому вирощуванні за умов 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, у тому числі серед рослин-регенерантів, генетичний поліморфізм (або, принаймні, значну його частину), властивий даному виду, та, можливо, навіть і роду рослин.

Така особливість соматичних клітин відкриває нові горизонти як у клітинній біології і теорії еволюції, так і в різних напрямках прикладних досліджень, у тому числі для збереження і відновлення природного поліморфізму, що досягається культивуванням клітин і тканин в умовах *in vitro*.

V. A. Kunakh

Evolution of cell populations *in vitro*: peculiarities, driving forces, mechanisms and consequences

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnogo Str., Kyiv, Ukraine, 03680

Summary

This review outlines the major features and distinctions of cell populations, types and directions of selection in such populations. Population-genetic basis for cell adaptation to growth conditions in vitro is elucidated; in particular, peculiarities of genome evolution in the course of cell dedifferentiation and further cell adaptation to growth conditions in passaged culture are evaluated. Main factors of variation and selection in cell populations in vitro, influence of growth conditions on structure of cell populations and some regularities of cultured cells and regenerated plants are considered. Details of creation of stable cell lines-producers of biologically active substances are presented. Views and suppositions of author resulting from analysis of both literature data and own multiyear studies on cell population genetics are set forth. Among others are substantiated such key statements: cell culture in vitro presents dynamically-heterogeneous biological system, clone population, which is developing (evolving) as a result of major driving factors of evolution – variation, heredity, selection and drift of genes (genotypes); interaction between these processes determines the biological characteristics of each particular cell line grown in specific

conditions; in adaptation of cells to growth conditions *in vitro* one can single out three periods: the initial population of isolated cells, the period of strain (cell line) formation and the established strain. The division into periods is determined by the type, direction and intensity of «natural» selection that acts in cell population. Formed (adapted to growth *in vitro*) strains are genetically heterogeneous, they are characterized by the presence of physiological and genetic homeostasis, which are mostly caused by the action of stabilizing selection; cultured cells of higher plants are able to synthesize practically all classes of secondary (specialized) compounds (alkaloids, steroids, terpenoids, etc.); any somatic cell with living (functionally active) nucleus during its isolation and further cultivation in tissue culture, as a result of the process of «somaclonal» variability occurring according to the N. I. Vavilov's law of homologous series in hereditary variability, can restore in its descendants, including regenerated plants, the entire genetic polymorphism (or at least a significant part of it) characteristic of the plant's species and may be even its genus. This provides an opportunity to preserve and restore the natural polymorphism in cultured cells and tissues *in vitro*.

Keywords: genome evolution, cell populations, selection, growth *in vitro*.

В. А. Кунах

Эволюция клеточных популяций *in vitro*: особенности, движущие силы, механизмы и последствия

Резюме

Рассмотрены основные признаки и отличия клеточных популяций, типы и направления действия отбора в таких популяциях. Освещены популяционно-генетические основы адаптации клеток к условиям роста *in vitro*, в частности, проанализированы особенности эволюции генома в процессе дедифференцирования клеток и последующей адаптации их к условиям роста в пассируемой культуре. Обсуждены главные факторы изменчивости и отбора в клеточных популяциях *in vitro*, влияние условий выращивания на структуру клеточных популяций и некоторые закономерности изменчивости культивированных клеток и растений-регенерантов. Приведены особенности создания стабильных клеточных линий – продуцентов биологически активных веществ. Изложены взгляды и предположения автора, сформированные в результате анализа как литературных данных, так и многолетних собственных исследований по генетике клеточных популяций. Среди прочего обоснованы следующие ключевые положения: 1) культура клеток *in vitro* является динамично-гетерогенной биологической системой – клоновой популяцией, развивающейся (эволюционируемой) в результате действия основных движущих факторов эволюции – изменчивости, наследственности, отбора и дрейфа генов (генотипов); взаимодействие этих процессов обуславливает биологические особенности каждой конкретной клеточной линии, выращиваемой в конкретных условиях; 2) в процессе адаптации клеток к условиям роста *in vitro* выявляются три периода: первичной популяции изолированных клеток, становления штамма (клеточной линии), сформированного штамма; разделение на периоды определяется типом, направлением и жесткостью «природного» отбора, действующего в клеточной популяции; сформированные (адаптированные к росту *in vitro*) штаммы являются генетически гетерогенными, для них характерно наличие физиологического и генетического гомеостаза, что обусловлено в основном действием стабилизирующего отбора; 3) культивируемые клетки высших растений способны к синтезу практически всех классов соединений вторичного (специализированного) обмена (алкалоиды, стероиды, терпеноиды и др.); 4) любая соматическая клетка с живым (функционально активным) яд-

ром при ее изолировании и последующем выращивании в условиях культуры тканей вследствие процессов «сوماклональной» изменчивости, происходящих в рамках закона гомологических рядов в наследственной изменчивости Н. И. Вавилова, может восстановить в своих потомках, в том числе среди растений-регенерантов, весь генетический полиморфизм (или, в крайнем случае, значительную его часть), присущий данному виду, и, вероятно, даже и роду растений, что открывает возможность сохранения и восстановления природного полиморфизма в культуре клеток и тканей *in vitro*.

Ключевые слова: эволюция генома, клеточные популяции, отбор, рост *in vitro*.

REFERENCES

1. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* / Eds Y. P. S. Bajaj, T. Nagata, J. Kumlehn.–Berlin etc.: Springer, 1986–2012 p.
2. *Kunakh V. A. Biotechnology of medical plants. Genetic, physiological and biochemical basis.*–Kyiv: Logos, 2005.–730 p.
3. *Kunakh V. A. Plant biotechnology for human life improvement // Biotechnology (Ukr.).*–2008.–I, N 1.–P. 28–39.
4. *Ignatova S. A. Cell technologies in plant growing, genetics and breeding of crops: tasks, possibilities, development of systems in vitro.*–Odessa: Astroprint, 2011.–224 p.
5. *Kunakh V. A., Mozhylyevskaya L. P. Human life span and plant biotechnology // Molecular and Applied Genetics.*–Minsk, 2013.–Vol. 14.–P. 56–62.
6. *Mitrofanova I. V. Somatic embryogenesis and organogenesis as a biotech basis of obtaining and preservation of perennial horticultural plants.*–Kyiv: Agrarna nauka, 2011.–344 p.
7. *Cherevchenko T. M., Lavrentyeva A. N., Ivannikov R. V. Biotechnology of tropical and subtropical plants in vitro.*–Kyiv: Naukova dumka, 2008.–560 p.
8. *Olenov Y. M. Cellular heredity, differentiation of cells and carcinogenesis as problems of evolutionary genetics.*–Leningrad: Nauka, 1967.–310 p.
9. *Vakhtin Y. B. Genetic theory of cell populations.*–Leningrad: Nauka, 1980.–168 p.
10. *Vakhtin Y. B., Pinchuk V. G., Schvemberger I. N., Butenko Z. A. Clonal-selectional concept of tumor growth.*–Kyiv: Naukova Dumka, 1987.–216 p.
11. *Dubrovna O. V., Chugunkova T. V., Baval A. V., Lal'ko I. I. Biotechnological and cytogenetic basis establishment of plants resistant to stress.*–Kyiv: Logos, 2012.–428 p.
12. *Lutova L. A., Ezhova T. A., Dodueva I. E., Osipova M. A. Developmental genetics of plants: for biological specialities of Universities / 2nd issue revised and suppl.*–Saint-Petersburg: Publ. House N-L, 2010.–432 p.
13. *Gavrilov V. I. Transplantable cells in virology.*–M.: Meditsina, 1964.–264 p.
14. *Mamaeva S. E. The patterns of the karyotypic evolution of cells in culture // Tsitologiya.*–1996.–38, N 8.–P. 787–814.
15. *Dobzhansky Th. Mendelian populations and their evolution // Genetics in 20th century / Ed U. C. Dunn.*–New York: Acad. press, 1952.–P. 573–589.
16. *Kunakh V. A. Genome plasticity of somatic cells and adaptability of plants // Molecular and Applied Genetics.*–Minsk, 2011.–Vol. 12.–P. 7–14.
17. *Kunakh V. A. Developmental genome plasticity as a basis for plant adaptability. Zhebrak readings III / Institute of Genetics and Cytology of NAS of Belarus / Ed. A. V. Kilchevsky.*–Minsk, 2011.–56 p.

18. Kordium V. A. Our «Shagreen leather» is our problem. We have to solve it ourselves.–Kyiv: Logos, 2006.–264 p.
19. Solov'yan V. T., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Genome rearrangements in cell culture of *Rauwolfia serpentina*. Diverse pattern of genome variations // *Tsitologiya*.–1994.–**30**, N 2.–P. 250–254.
20. Solov'yan V. T., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Genome rearrangements in cell culture of *Rauwolfia serpentina*. II Communication with interspecies variability // *Tsitologiya*.–1994.–**30**, N 3.–P. 399–403.
21. Solov'yan V. T., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Special features of genomic variation of cell culture of *Rauwolfia srpentina* // *Cytology and Genetics*.–1994.–**28**, N 5.–P. 21–25.
22. Kunakh V. A. Plant genome evolution in cell culture *in vitro*. Peculiarities, reasons, mechanisms and consiquencies // *Genetics and breeding in Ukraine at the turn of millenniums* / Ed. V.V. Morgun.–K.: Logos, 2001.–P. 53–67.
23. Kunakh V. A. Mechanisms and some pegularities to somaclonal variability of the plants // *Bull. of Vavilov Soc. Geneticists and Breeders of Ukr.*–2003.–**1**, N 1.–P. 101–106.
24. Andreev I. O., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Plant genome rearrangements in cell culture *in vitro* // *Biopolym. Cell*.–2004.–**20**, N 1–2.–P. 42–49.
25. Andreev I. O., Spiridonova K. V., Solovyan V. T., Kunakh V. A. Variability of ribosomal RNA genes in *Rauwolfia* species: parallelism between tissue culture-induced rearrangements and interspecies polymorphism // *Cell Biol. Int.*–2005.–**29**, N 1.–P. 21–27.
26. Kunakh V. A., Andreev I. O., Spiridonova K. V. 18-S and 5-S gene interspecies polymorphism and variability in tissue culture of *Rauwolfia serpentina* Benth. and *Gentiana* L. // *Physiol. Biochem. Cultivated Plants*.–2006.–**38**, N 2.–P. 110–123.
27. Andreev I. O., Spiridonova K. V., Maidanyuk D. M., Kunakh V. A. Genetic effects of tissue culture on maize // *Physiol. Biochem. Cultivated Plants*.–2009.–**41**, N 6.–P. 487–495.
28. Andreev I. O. Plant tissue culture as a model of evolutionary processes // *Achievements and problems of genetics, breeding and biotechnology* / Ed. V. A. Kunakh.–K.: Logos, 2012.–Vol. 4.–P. 7–12.
29. Belyaev D. K. Destabilizing selection // *The development of the theory of evolution in the USSR: 1917–1970*.–Leningrad: Nauka, 1983.–P. 266–277.
30. Kunakh V. A. Cytogenetic behaviour of tissue culture of *Haplopappus* // *Culture of isolated organs, tissues and cells of plants*.–M.: Nauka, 1970.–P. 155–158.
31. Kunakh V. A. Polyploidy in cell and tissue cultures *in vitro* and its putative reasons // *Experimental polyploidy in crops*.–K.: Naukova dumka, 1974.–P. 39–56.
32. Sidorenko P. G., Kunakh V. A. Character of caryotype variability in cell population of tissue culture of *Haplopappus gracilis* with long-term passaging // *Tsitol. Genet* 1970.–**4**, N 3.–P. 235–241.
33. Sidorenko P. G., Kunakh V. A. Production of culture of isolated tissues of *Haplopappus gracilis* and *Crepis capillaris* and their cytogenetic characteristic // *Tsitol. Genet*.–1972.–**6**, N 6.–P. 483–486.
34. Inge-Vechtomov S. G. Genetics with basis of breeding: textbook for high school students / 2nd issue revised and suppl.–Saint-Petersburg: Publ. House N-L, 2010.–720 p.
35. Severtsov A. N. Principal directions of the evolutionary process. Morphobiological theory of evolution.–Moscow; Leningrad: Biomedgiz, 1934.–150 p.
36. Kunakh V. A. Genome variability in plant somatic cells. 3. Callus formation *in vitro* // *Biopolym. Cell*.–1997.–**13**, N 5.–P. 362–371.
37. Kunakh V. A. Variability of plant genome in process of dedifferentiation and callus formation *in vitro* // *Russ. J. Plant. Physiol.*–1999.–**46**, N 6.–P. 919–929.
38. Kunakh V. A. Cytogenetic studies on cell populations in culture of isolated plant tissues // Ph.D. thesis, 03.00.15 – Genetics.–K., 1975.–16 p.
39. 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 // *Biopolym. Cell*.–2010.–**26**, N 6.–P. 499–507.
40. Bublyk O. M., Andreev I. O., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) variability in *Ungernia victoris* tissue culture // *Topics in experimental evolution of organisms* / Ed. V. A. Kunakh.–K.: Logos, 2010.–Vol. 9.–P. 8–12.
41. Bublyk O. M., Andreev I. O., Spiridonova E. V., Kunakh V. A. Variability of PCR-markers based on disease resistance and abiotic stress response genes in *Ungernia victoris* tissue culture // *Topics in experimental evolution of organisms* / Ed. V. A. Kunakh.–K.: Logos, 2011.–Vol. 11.–P. 213–218.
42. 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 in *Gentiana pneumonanthe* L. tissue and organ culture // *Bull. Vavilov. Soc. Geneticists and Breeders of Ukr.*–2011.–**9**, N 1.–P. 22–31.
43. Konvalyuk I. I., Drobyk N. M., Mel'nyk V. M., Twardovska M. O., Kravets N. B., Kunakh V. A. RAPD- and ISSR-analysis of *Gentiana lutea* L. tissue and organ culture in various conditions of maintenance // *Achievements and problems of genetics, breeding and biotechnology* / Ed. V. A. Kunakh.–K.: Logos, 2012.–Vol. 4.–P. 523–527.
44. Kunakh V. A. Genomic variability of somatic cells of plants and factors that regulate this process // *Tsitol. Genet*.–1980.–**14**, N 1.–P. 73–81.
45. Gubar E. K., Kunakh V. A. Karyotype variability of cultured *Crepis* cells (*Crepis capillaris* L. Wallr.) // *Genetika*.–1992.–**28**, N 6.–P. 51–61.
46. Kunakh V. A. Somaclonal variation in *Rauwolfia* // *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somaclonal variation in crop improvement*. II.–Berlin; Heidelberg; New York: Springer, 1996.–Vol. 36.–P. 315–332.
47. Spiridonova K. V., Andreev I. O., Solovyan V. T., Kunakh V. A. Peculiarity of some gene rearrangements in of *Rauwolfia serpentina* Benth. cell culture *in vitro* // *Repts Nat. Acad. Sci. Ukr.*–2000.–N 2.–P. 165–170.
48. Spiridonova K. V., Andreev I. O., Solovyan V. T., Kunakh V. A. Molecular and biological characteristics of genomic rearrangements in *Rauwolfia serpentina* Benth. cell culture *in vitro* // *Genetics and breeding in Ukraine at the turn of the millennium* / Ed. V.V. Morgun.–K.: Logos, 2001.–Vol. 1.–P. 422–427.
49. Twardovska M. O., Strashniuk N. M., Mel'nyk V. M., Adonin V. I., Kunakh V. A. Chromosomal variability in a tissue culture of rare species of the genus *Gentiana* L. // *Tsitol. Genet*.–2008.–**42**, N 4.–P. 12–17.
50. Bublyk E. N., Adonin V. I., Kunakh V. A. Cytogenetic variation of *Ungernia victoris* cell lines during cultivation on nutrient media of different composition // *Tsitol. Genet*.–2008.–**42**, N 1.–P. 29–36.
51. Bublyk O. M., Andreev I. O., Spiridonova E. V., Kunakh V. A. Variability of *Ungernia victoris* morphogenic and non-mor-

- phogenic tissue culture as results from RAPD-analysis // Bull. of Vavilov Soc. Geneticists and Breeders of Ukr.–2008.–6, N 1.–P. 44–51.
52. Kunakh V. A. Peculiarities of structural mutagenesis in populations of cultured plant cells // Advances of modern genetics / Ed. N. P. Dubinin.–M.: Nauka, 1984.–Vol. 12.–P. 30–62.
 53. Kunakh V. A., Zossimovich V. P. Effect of kinetin on the frequency and types of chromosome aberrations in a tissue culture of *Haplopappus gracilis* // Genetika.–1977.–13, N 8.–P. 1355–1365.
 54. Kunakh V. A., Sidorenko P. G., Zossimovich V. P. Kinetin influence on reproduction of cells with varying ploidy // Achievements of polyploidy / Ed. V. P. Zossimovich.–K.: Naukova dumka, 1977.–P. 203–215.
 55. Brodskii V. Ya. The forms of variability in a cell population as well as in an organism population. The biology of the development of the cardiac myocytes // Ontogenez.–1994.–25, N 5.–P. 29–43.
 56. Braun V. Bacterial genetics.–M.: Nauka, 1968.–446 p.
 57. Kunakh V. A. Genome variability in plant somatic cells. 4. Variability in the process of dedifferentiation and callus formation *in vitro* // Biopolym. Cell.–1998.–14, N 4.–P. 298–319.
 58. Kunakh V. A. Genome variability in the somatic plant cells. 6. Variability and selection in the course of adaptation to *in vitro* conditions // Biopolym. Cell.–2000.–16, N 3.–P. 159–185.
 59. Kunakh V. A. Genome variability in somatic plant cells. 7. Variability of population-genetic parameters in the culture *in vitro* // Biopolym. Cell.–2002.–18, N 5.–P. 377–393.
 60. Kunakh V. A. Genome variability and accumulation of indoline alkaloids in *Rauwolfia serpentina* Benth. cell culture // Biopolym. Cell.–1994.–10, N 1.–P. 3–30.
 61. Kunakh V. A. Twenty five years long stable biosynthesis of ajmaline by related hormone-independent *Rauwolfia serpentina* cell lines // Euromedica-Hannover-2005 (16–17 Juni) International Congress and Exhibition: Programm Abstracts.–Hannover, 2005.–P. 22.
 62. Kunakh V. A., Katsan V. A. Biosynthesis of poppy isoquinoline alkaloids in nature and in the *in vitro* culture. 1. Opium poppy (*Papaver somniferum* L.) // Ukr. Biokhim. Zh.–2003.–75, N 5.–P. 41–54.
 63. Kunakh V. A., Katsan V. A. Biosynthesis of poppy quinoline alkaloids in nature and *in vitro* culture. 2. (*Papaver bracteatum* Lindl.) // Ukr. Biokhim. Zh.–2004.–76, N 5.–P. 29–44.
 64. Maidanyuk D. M., Andreev I. O., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Genetic polymorphism of the maize somaclonal lines derived from P346 line // Biopolym. Cell.–2007.–23, N 4.–P. 324–331.
 65. 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 // Biopolym. Cell.–2007.–23, N 5.–P. 416–424.
 66. Kunakh V. A. Relationship between ploidy and spontaneous organogenesis in *Crepis capillaris* and *Haplopappus gracilis* strains // Tsitol. Genet.–1974.–8, N 4.–P. 303–308.
 67. Kunakh V. A. Cytogenetic peculiarities of isolated tissue culture and regenerated plants in connection with their application in breeding // New methods for creation and application of original materials for plant breeding.–K.: Naukova dumka, 1979.–P. 186–193.
 68. Kunakh V. A. Cytogenetic variability of cell populations in culture of isolated plant tissues // Tissue and cell cultures in plant breeding.–M.: Kolos, 1979.–P. 38–51.
 69. Kunakh V. A., Alkhimova E. G., Voityuk L. I. Variability of the chromosome number in callus tissues and pea regenerants // Tsitol. Genet.–1984.–18, N 1.–P. 20–25.
 70. Kuchko A. A., Oliylyk T. M. Somaclonal variation in potatoes.–Kyiv: Dovira, 1998.–192 p.
 71. Bublyk O. M., Andreev I. O., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Genetic variability in regenerated plants of *Ungernia victoris* // Biologia plantarum.–2012.–56, N 2.–P. 395–400.
 72. Poronnik O. O., Kunakh V. A. Biosynthesis of naphthoquinone pigments in plants from *Boraginaceae* family in nature and *in vitro* culture // Ukr. Biokhim. Zh.–2005.–77, N 6. P. 24–36.
 73. Strashniuk N. M., Les'kova O. M., Mel'nyk V. M., Twardovska M. O., Konvalyuk I. I., Kunakh V. A. Biologically active substances of *Gentiana* L. genus. 3. Flavonoid contents in tissue culture // Phytotherapy.–2008.–N 3.–P. 82–87.
 74. Poronnik O. O., Shabliij V. A., Kunakh V. A. Generation of *Echium plantagineum* L. tissue culture which is producer of shikonin pigments // Biotechnology (Ukr.).–2008.–1, N 3.–P. 56–63.
 75. Poronnik O. O., Kuchma M. D., Kunakh V. A. Generation of *Echium plantagineum* L. callus culture – producer of shikonin // Bull. of Vavilov Soc. Geneticists and Breeders of Ukr.–2008.–6, N 3.–P. 282–286.
 76. Konvalyuk I. I., Hrytsak L. R., Mel'nyk V. M., Drobyk N. M., Kunakh V. A. Obtaining and characterization of isolated root culture from plants of genus *Gentiana* // Biotechnology (Ukr.).–2011.–4, N 3. P. 29–35.
 77. Miryuta N. Ju., Parnikozha I. Ju., Ammouri Ju., Kunakh V. A. The application of thermodynamic approach for population cell dynamic investigation *in vitro* for *Rauwolfia serpentina* Benth. tissue culture as indole alkaloids producer // Biotechnology (Moscow).–2006.–N 2.–P. 78–95.
 78. Miryuta N. Yu., Kunakh V. A. The dynamics of cell systems *in vitro*. I. Temporal organization and stability of *Rauwolfia serpentina* culture tissues at circadian level // Biotechnology (Ukr.).–2011.–4, N 5.–P. 25–38.
 79. Miryuta N. Yu., Kunakh V. A. Dynamic of cell population systems *in vitro*. II. Temporal organization and robustness of *Rauwolfia serpentina* Benth culture tissues system at passage level // Biotechnology (Ukr.).–2011.–4, N 6.–P. 18–30.
 80. Miryuta N. Yu., Kunakh V. A. Dynamic of cell population systems *in vitro*. III. Hypothesis of cell differential process self-control and its phenomenology realization by the example of *Rauwolfia serpentina* Benth tissues culture // Biotechnology (Ukr.).–2012.–5, N 3.–P. 40–51.

Received 30.03.13