

Генетична мінливість *in vitro*

Одним із найважливіших чинників підтримки генетичної гетерогенності є фенотиповий поліморфізм, який забезпечує існування популяції в мінливих умовах довкілля, зумовлюючи її лабільність, преадаптацію. Тому поліморфізм можна розглядати як вияв еволюційно сформованого генетичного гомеостазу. Природний добір закріплює існування поліморфізму, контролюючи чисельні співвідношення різних форм. Між факторами добору і спадковою мінливістю існує пряма залежність. У разі різкої зміни умов зовнішнього середовища популяція має можливість пристосуватись до них або використовуючи наявний мутаційний резерв, або за рахунок зростання частоти виникнення нових

мутацій. Виникнення неспрямованих спонтанних мутацій та наступний добір сприяють поступовим змінам популяції, причому ці зміни можуть створювати враження спрямованих. Ці положення популяційної генетики загальноприйняті для популяцій будь-якого типу.

Проте популяціям культивованих клітин властиві деякі особливості, зокрема:

- 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 неменделівські з епігенетичною мінливістю;
- виділення клітин із цілісного організму призводить до порушення тканинного і організменного гомеостазу, що є причиною мутацій. Тому чим сильніше відхиляються умови життєдіяльності клітин від оптимальних, тим вищий рівень спадкової мінливості й генетичної гетерогенності, що спостерігається в таких екстремальних умовах, як ріст *in vitro*;
- у процесі одержання і формування штамів, здатних до тривалого субкультивування, геном як окремих клітин, так і генетична структура клітинних

популяції докорінно змінюються; окремі геномні зміни значно перевищують навіть природні міжвидові відмінності.

Динаміка генетичної структури клітинних популяцій *in vitro*

Будь-яка популяція (виходячи з визначення) є генетично гетерогенною.

Генетична структура популяції, її динаміка визначаються шляхом вивчення частоти зустрічальності окремих генів та/або генотипів у репрезентативних вибірках.

Тому для встановлення генетичної структури клітинних популяцій досліджують геноми окремих клітин. Одним із методів є клонування окремих клітин у різних селективних умовах і середовищах з метою визначення частоти досліджуваної ознаки в популяції. У такий спосіб вивчають ознаки стійкості або чутливості до різних хімічних, фізичних або біологічних чинників, залежність від факторів живлення, зокрема прото- чи автотрофності по відношенню до різних метаболітів та деякі інші біохімічні ознаки. Нині найпоширенішим для популяційно-генетичного аналізу культивованих клітин є каріотипічний метод, тобто вивчення кількості і морфології хромосом. Зручність і перевага цього методу над іншими зумовлена його особливостями: маючи високу роздільну здатність, особливо у разі використання методів диференційного фарбування і гібридизації ДНК, він дає уявлення про мінливість як генотипу, так і фенотипу, оскільки каріотип є однією з важливих морфологічних ознак клітини.

За допомогою цитогенетичних методів вивчають лише клітини, які діляться мітотично, тобто так званій проліферативний пул культури. У різних рослинних культур тканин він коливається від 70 до 90 % популяції. Додаткове чи паралельне вивчення рівня плоідності клітин, які не входять до проліферативного пулу, наприклад методами кількісного вивчення ДНК в окремих клітинах, дає змогу робити повний аналіз генетичної структури клітинної популяції за рівнем плоідності і вивчати її динаміку та зміни внаслідок

впливу тих чи інших чинників.

Динаміка геномних змін протягом пасажу

Сформовані клітинні штами, переважна більшість яких є гетерогенними і міксоплоїдними, протягом пасажу характеризуються відносно стабільним розподілом клітин за числом хромосом. У таких штаммах плоїдність клітин, що діляться, не зазнає різких змін, модальний клас протягом пасажу є стабільним.

У інших штаммах відбуваються істотні зміни, генетична структура клітинних популяцій ритмічно, від пасажу до пасажу змінюється.

Наприклад, у диплоїдному штамі Г2Л малохромосомного виду гаплопапусу *Narlorarpus gracilis* ($2n = 4$) з родини Asteraceae протягом пасажу частота диплоїдних метафаз виявляється в межах 72,2—80,5 %, триплоїдних — 7,6—14,5, тетраплоїдних — 3,2—14,6 %. Ці флуктуації мають коливальний (синусоїдальний) характер, невеликий розмах і істотно не змінюють характер розподілу клітин, що діляться, за числом хромосом. Інший штам рослини — Г4Г-3, в якому переважають поліплоїдні клітини, характеризується достовірними змінами частоти клітин різних рівнів плоїдності. Зокрема, на 5-ту добу росту виявляється значніша кількість диплоїдних клітин, ніж в інші доби, за певного зниження частоти тетрашюїдний метафаз, а частота клітин з числом хромосом, більшим тетраплоїдного, зменшується майже вдвічі на 9—10-ту добу порівняно з іншими добами росту. Значно змінюється кількість анеуплоїдів.

Штам ПП-1 культури тканин лікарської рослини полісціасу папоротелистого *Polyscias filicifolia* з родини Araliaceae має переважно диплоїдні клітини, кількість яких коливається протягом пасажу від 73 до 95 %. У тканині трапляються також триплоїдні, тетраплоїдні, гаплоїдні та анеуплоїдні клітини переважно з диплоїдною кількістю хромосом. Гаплоїдні клітини діляться протягом перших 15 діб, а частота диплоїдних клітин найнижча (72,9 %) на 15-ту добу росту, коли в цьому штамі спостерігається максимум мітотичної активності. В культурі тканин полісціасу зміна кількості хромосом протягом пасажу істотно

не змінює модального класу, який формується диплоїдними клітинами.

Інша динаміка геномної структури популяції спостерігається, наприклад, у штамі КЗЛ-А культури тканин скереди *Crepis capillaris* гаплоїдні, клітини якої діляться лише на початку пасажу, кількість диплоїдних, триплоїдних та анеуплоїдних клітин зменшується наприкінці субкультивування (табл. 2.1). Тетраплоїдні клітини найчастіше трапляються на 30-ту добу росту, коли їхня частота досягає 40 %, а високополіплоїдні — на 14-ту добу, становлячи в цей час близько 25 % популяції. Отже, частота різних генотипів (клітин різних рівнів плідності) цього штаму протягом пасажу змінювалась не менше, ніж у 2—3 рази. І ця картина спостерігалась від пасажу до пасажу з незначними варіаціями.

Істотні зміни геномної структури клітинної популяції протягом пасажу, тісний зв'язок із мітотичною активністю та накопиченням вторинних метаболітів

(індольних алкалоїдів) спостерігаються у культурі тканин раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina*. Так, клітинна лінія А калюсної культури раувольфії, що характеризується високим темпом росту і накопичує понад 0,5 % цінного для медицини протиаритмічного алкалоїду аймаліну (рис. 2.1, 1—3), є досить гетерогенною популяцією з варіюванням клітин за кількістю хромосом від 11 до 82 при $2n = 22$. Розподіл культури за кількістю хромосом стабільний продовж багатьох років вирощування як на агаризованому, так і рідкому середовищі. Протягом пасажу в калюсній культурі спостерігали 5—6 достовірних підйомів мітотичної активності (рис. 2.1,4). Розрахункові дані (за кількістю клітин і виходом біомаси) свідчать, що за цей час у культурі відбувається близько шести клітинних репродукцій.

Отже, в сформованих клітинних штаммах різних видів рослин, які протягом багатьох пасажів при аналізі на 5—12-ту добу росту характеризуються стабільним розподілом клітин за кількістю хромосом, протягом пасажу (циклу

вирощування) відбуваються зміни частоти зустрічальності клітин різних рівнів плоїдності, які у різних штамів мають різний ступінь вираженості. В одних вони практично не впливають на сумарний розподіл клітин за кількістю наборів хромосом і не призводять до істотних змін характеристики штаму. В інших штамів зміни плоїдності клітин, що діляться, впродовж пасажу досить значні. В одних випадках вони мають коливальний (синусоїдальний) характер, в інших — частота клітин високих рівнів плоїдності поступово збільшується наприкінці пасажу (в стаціонарній фазі росту), ще в інших — частка поділів із максимальною для цього штаму кількістю хромосом найвища в логарифмічній фазі росту.

Поведінка (здатність до розмноження) окремих генотипів (компаратментів) популяції залежить від багатьох факторів: • частки клітин із різними генотипами в момент субкультивування; • наявності в живильному середовищі метаболітів, які можуть вибірково стимулювати чи пригнічувати проліферацію клітин різних генотипів; • тривалості мітотичного циклу клітин із різною кількістю хромосом; • темпів поглинання поживних речовин із середовища та виділення метаболітів у середовище клітинами різних генотипів. Взаємодія цих та інших факторів створює динамічну картину частот клітин з різними генотипами протягом циклу вирощування, що характерна для конкретного штаму, конкретної клітинної популяції.