

УДК 580.027 2 633.88

Н.М. Страшнюк, Л.Р. Грицак

Тернопільський державний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка
46027 Тернопіль, вул. М. Кривоноса. 2**ВИКОРИСТАННЯ КУЛЬТУР КЛІТИН І ТКАНИН ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН ДЛЯ ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН***лікарські рослини, культури клітин і тканин, in vitro, біологічно активні речовини*

Лікувальні властивості рослин залежать від наявності в них комплексу різних за хімічною структурою і терапевтичною дією речовин. Культивовані клітини рослин зберігають притаманну вихідному виду здатність синтезувати широкий спектр речовин вторинного метаболізму алкалоїдів, терпеноїдів, глікозидів, сапонінів, полісахаридів, ефірних олій, дубильних речовин, флавоноїдів, вітамінів, рослинних гормонів, мікроелементів, органічних кислот, мінеральних солей тощо [15]. І тому для отримання цінних біологічно активних речовин, поряд з традиційними технологіями, в основі яких лежить використання цілих організмів (мікроорганізмів, рослин, тварин), використовують біотехнологічні методи, що ґрунтуються на культивуванні вільних та іммобілізованих клітин [28].

Культура клітин, для того щоб стати об'єктом промислового вирощування, повинна витримати конкуренцію з дикорослими і культурними лікарськими, технічними рослинами, а також з мікробіологічним виробництвом і хімічним синтезом. Порівняно з традиційною лікарською сировиною, культури клітин мають такі переваги: незалежність від впливу факторів навколишнього середовища (клімату, сезону, погоди, ґрунтових умов, шкідників тощо), вищий вихід і якість продукту завдяки оптимізації і стандартизації умов вирощування, економія посівних площ [10].

Однак, у сучасному біотехнологічному виробництві використовується невелика кількість клітинних і тканинних культур. Зумовлено це відносно низькою продуктивністю штаблів, а також тим, що продуктивність відселектованих варіантів, як правило, швидко знижується до середнього популяційного рівня. Тому актуальним залишається з'ясування закономірностей, що лежать в основі такої нестабільності. Обмеженням у створенні високорентабельних технологій є недостатня кількість фундаментальних знань про генетичну, біохімічну, фізіологічну регуляцію вторинного метаболізму в рослинній клітині [10]. Можливі функції вторинних речовин в інтактній рослині остаточно не вивчені, але для більшості з них спрямована, в основному, на захист рослини від різних стресових факторів, тобто вони виконують регуляторну функцію, забезпечуючи життєдіяльність організму [7].

Показано, що іноді в культивованих клітинах у спеціалізованому обміні проявляються особливості, характерні для філогенетично ранніх груп рослин або ювенільної стадії розвитку рослин [10]. Популяція клітин *in vitro* проходить певний онтогенез, розмноження (поділ)—розтягнення—диференціація—старіння—смерть. Співвідношення клітин, які знаходяться на різних стадіях розвитку, змінюється залежно від того, який процес переважає. Диференціювання калусної клітини, яка виходить з циклу поділу, полягає в її спеціалізації на синтезі видоспецифічних вторинних сполук [13].

Дані про контроль біосинтезу вторинних метаболітів клітинною диференціацією неоднозначні. Якщо у деяких випадках синтез вторинних речовин починається з появою в культурі морфогенних структур, то в інших — високий вихід досліджуваних речовин спостерігається в недиференційованій калусній тканині [28].

Також суперечливі повідомлення про взаємозв'язок синтезу вторинних сполук з ростом клітин. У багатьох культурах при періодичному режимі вирощування вторинні метаболіти накопичуються в значних кількостях лише при сповільненні або зупинці росту, хоча у деяких випадках синтез продукту сприяє росту клітин. Можливо, механізми й умови, які блокують

поділ клітин та їх активний ріст, є одночасно механізмами активації, які забезпечують синтез ферментів вторинного метаболізму [10].

Оскільки взаємозв'язок синтезу вторинних сполук з ростом клітин на початкових етапах введення того чи іншого виду *in vitro* невідомий і непередбачуваний, то спочатку необхідно створити оптимальні умови для росту, тобто для накопичення біомаси, а потім дослідити вплив цих умов на біосинтез вторинних метаболітів. Якщо утворення біомаси не пов'язане з синтезом вторинної речовини, необхідно встановити баланс між біомасою і виходом речовини [9].

Отже, при введенні в культуру *in vitro* будь-якого виду важливим є: вибір генотипу донорної рослини; з'ясування специфіки фізіолого-біохімічних процесів, що відбуваються у рослинному організмі; дослідження впливу екзогенних та ендогенних факторів на ріст і накопичення вторинних метаболітів у культурах клітин і тканин, пошук способів підвищення біопродуктивності отриманих клітинних штаблів

Вибір генотипу донорної рослини

Збільшення синтезу вторинних метаболітів у культурах клітин може бути досягнуто, якщо вихідні батьківські рослини, експланти яких використовуються, накопичують великі кількості вторинних метаболітів. Тому, відбираючи рослину-донор експлантів, слід детально дослідити її генотип, умови зростання та вплив факторів середовища на реалізацію геному

Так, при дослідженні трьох культивованих популяцій («Auvergne», «Baviere», «Jura») тирличу жовтого (*Gentiana lutea* L.), які вирощувались на висоті 1500 та 740 метрів над рівнем моря біля Тренто (Італія), встановлено, що концентрація загальних білків у сухій речовині листків зменшувалась у всіх популяціях із зниженням висоти над рівнем моря [48]. Вміст хлорофілу та каротиноїдів також змінювався у популяціях «Baviere» та «Jura», а для рослин популяції «Auvergne» ці показники не залежали від зміни висоти над рівнем моря. Співвідношення хлорофілу *a* і *b* у рослинах досліджуваних популяцій не змінювалось при зниженні висоти над рівнем моря [48].

Для отримання культури барвінку рожевого (*Catharanthus roseus*) М. Ценк із співробітниками зібрав 184 зразки насіння з різних місць зростання [64]. З проростків цих рослин були відібрані декілька з найбільшим вмістом (більше, ніж 0,7% сухої маси) гіпотензивних індольних алкалоїдів — серпентину і зймалцину, з яких були отримані калусні культури, що містили у 4-5 разів більше досліджуваних алкалоїдів, ніж калуси, отримані з низькопродуктивних рослин [64]. Однак, У. Реллер не виявив подібної залежності в утворенні серпентину калусними культурами, отриманими із взятих з різних місць зростання рослин барвінку рожевого. Японські дослідники також не спостерігали кореляції між вмістом алкалоїду берберину в інтактних рослинах і калусних культурах *Thalictrum minus* [64]. Можливо, ці протиріччя пояснюються тим, що оцінка вихідного генотипу визначалася лише за фенотипом

Для отримання клітинних культур маку сподійного (*Papaver somniferum*) було використано ізогенну лінію. Апікальні меристеми, ізольовані одночасно з різних рослин одного віку, культивувались на однакових середовищах. Отримані калуси суттєво відрізнялись як за ростовими характеристиками, так і за синтезом алкалоїдів [33].

При дослідженні синтезу нікотину в калусних культурах, отриманих від двох різних пар рослин потюну (*Nicotiana tabacum*), що відрізнялися за вмістом нікотину і були ізогенні за іншими локусами, виявлено високий вихід нікотину у культурах, інційованих з високопродуктивних рослин.

З метою відбору високопродуктивних ліній для введення в культуру *in vitro* нами використовувались рослини видів роду *Gentiana* L. із різних популяцій: *G. lutea* (г. Пожижевська), *G. acaulis* (г. Шпиц, г. Туркул), *G. ascleptadea* (г. Пожижевська, г. Данцел), *G. punctata* (г. Пожижевська, г. Іверла) [31].

Отримані із високопродуктивних вихідних рослин культури *Catharanthus roseus* і *Nicotiana tabacum* синтезували серпентин і нікотин, відповідно, у більших, порівняно з іншими лініями, кількостях [3]. Ці клітини, мабуть, володіють підвищеним біохімічним потенціалом, завдяки якому вони здатні продукувати і накопичувати вторинні метаболіти. Забезпечуючи стабільні культури цих клітин відповідними фізіологічними стимулами, тобто діючи на пускові

механізми або «ефектори» шляхів біосинтезу вторинних метаболітів, можна індукувати *in vitro* синтез значних кількостей вторинних метаболітів [3].

Незважаючи на суперечливість наведених даних, більшість дослідників традиційно при відборі рослин чи ліній для отримання біологічно активних речовин враховують їх генетичні характеристики [27]. Однак, це зовсім не означає, що як експлантат може використовуватися лише тканина, багата досліджуваною речовиною, оскільки висока концентрація речовини може відображати накопичення її в тканинах шляхом направленого транспорту, а не лише як продукт синтезу за місцем локалізації. Тому вибір органу рослини для введення в культуру має важливе значення [28]. Так, наприклад, вміст стероїду діосгенину в культурі клітин діоскореї (*Dioscorea floribunda*), отриманої з бульби, був на порядок вищий, ніж в культурі клітин з пагона. Часто клітини *in vitro* готипотентні щодо синтезу вторинних сполук, тобто будь-яка клітина при створенні відповідних умов культивування може продукувати речовини, властиві для досліджуваної рослини [9].

Слід зазначити, що гени, які відповідають за регуляцію біосинтезу вторинних метаболітів, присутні і в тих клітинах, в яких, як правило, вторинні метаболіти не синтезуються. У деяких випадках біосинтетичний потенціал культури клітин відновлюється при регенерації рослини. Наприклад, культура клітин наперстянки при довготривалому культивуванні втрачала здатність до синтезу глікозидів, а в рослинах, які регенерували з цієї культури, їх біосинтез відновлювався. Отже, генетична інформація в клітинах зберігається, а не для її реалізації потрібні специфічні умови [27].

Вважають, що культивовані клітини, ізольовані від високопродуктивних рослин і тканин, містять необхідну генетичну інформацію для біосинтезу цих метаболітів [27].

Сомаклональна мінливість та її вплив на синтез культурами клітин і тканин біологічно активних речовин

Культури клітин рослин характеризуються великою морфофізіологічною і генетичною гетерогенністю. Перша залежить від виду тканини, складу живильного середовища та способу культивування; вона проявляється залежно від фази росту та кількості пасажів. Генетична гетерогенність може залежати від гетерогенності вихідного експланту і від складу середовища. Калусні і суспензійні культури відрізняються за морфологією та ступенем гетерогенності клітинної популяції, за морфогенетичним та біосинтетичним потенціалами [13].

Варіації, що виникають, можуть мати фізіологічну, епігенетичну і генетичну природу. Як правило, фізіологічні зміни не мають стабільного характеру і зникають при зміні умов культивування. Складніше відрізнити генетичні та епігенетичні зміни — ті та інші стабільно передаються протягом багатьох клітинних генерацій, і не зникають при зміні умов культивування [8].

Результати досліджень особливостей хромосомної мінливості клітин при калусоутворенні дуже суперечливі. Значна кількість експериментальних даних свідчить про те, що вже серед перших мітозів після індукції дедиференціації спостерігається міксоидія з широким розмахом щодо числа хромосом і наявності різних аномалій мітозу. У багатьох публікаціях наведено дані про те, що серед перших клітинних поділів рівень порушень невеликий, і лише при подальшій проліферації, особливо в процесі пасивування *in vitro*, відзначається зростання рівня і розширення спектру хромосомних аномалій. Причина суперечності отриманих даних полягає у використанні різного вихідного матеріалу і/або різних умовах індукції калусоутворення [20].

Стан геному в клітинах різних органів і тканин може бути різним. Відмінності виникають в онтогенезі як у результаті запрограмованих змін у процесі диференціації клітин, так і в результаті накопичення мутацій. Кількість і спектр цих геномних змін залежить від багатьох факторів — виду рослини, особливостей її генотипу, віку і умов проростання, типу тканини і рівня спеціалізації клітин тощо [18]. Умови індукції дедиференціації і калусоутворення не тільки виявляють певну частину цих змін при вступі клітин у мейоз, але в деяких випадках приводять до виникнення нових перебудов [20].

При використанні як вихідного матеріалу диплоїдних клітин, у первинному калусі спостерігається, за окремими винятками, диплоїдні мітози. Це показано на прикладі не тільки октогенетично молодих тканин і органів (меристеми, зародки, молоді листки, деякі частини проростків тощо), але і при використанні високодиференційованих клітин тих видів рослин і/або тканин, які в онтогенезі не піддавались поліплоїдії. Наприклад, диплоїдний калус був отриманий із нормальної тканини і тканин пухлини (корончастий гал) стебла соняшника [41], із коренешків і сононамбура [43], у клітинах якого перед початком проліферації вміст ДНК був близьким до $4C$ [45], з різних органів скерди *Crepis capillaris* [40, 59], із ділянок листків і цибулин *Ornithogalum thyrsoides* та інших рослин, диференційованим тканинам котрих не властива поліплоїдія. У таких первинних калусах протягом всього періоду їх росту, як правило, не відзначається суттєвих змін числа хромосом. Такі дані отримані при культивуванні первинних калусів, отриманих із молодих листків *Nicotiana tabacum* [19].

Однак, при використанні як первинних експлантів серцевинної паренхіми того ж виду тютюну, клітини якого піддані поліплоїдії, було встановлено наступне. Число хромосом у перших після індукції калусоутворення мітозах коливалось від 40 до 215 при $2n=48$. Диплоїдні і тетраплоїдні клітини склали 12,5 і 17,5% вивчених клітин, відповідно. Клітини більш високих рівнів плоідності (містять понад 100 хромосом) склали близько 50%. Другий мітоз відзначали через 1-2 дні після першого. Частота зустрічальності клітин з більшим, ніж 100, числом хромосом, знизилась у другому мітозі вдвічі (до 22,7%). Культивована тканина складалась на 70% з клітин з числом хромосом від 77 до 96 [61].

На основі проведених досліджень різних ділянок стебла *N. tabacum* було зроблено висновок, що у вихідних міксоплоїдних експлантах перші поділи *in vitro* відбуваються, в основному, у диплоїдних та тетраплоїдних клітинах. Клітини вищих рівнів плоідності піддаються редукції числа хромосом внаслідок фрагментації ядер, і лише після цього приступають до поділу [39].

Цікаві дані отримані також на прикладі гороху *Pisum sativum*. У цієї рослини показано відсутність поліплоїдних клітин у листках і достатньо висока їх частота в коренях і сім'ядолях. Калус, що утворювався на частині листка, більше, ніж на 90% складався з диплоїдних клітин [19]. Калус стеблового походження на трегину складався з поліплоїдних клітин. У калусі з ділянок коренів спостерігали ширший розмах мінливості за числом хромосом (від n до $6n$), при цьому частка тетраплоїдних мітозів перевищувала 30% [19].

В арабідозеиса калус, отриманий з насіння на відміну від калусів листового і стеблового походження складався практично повністю з диплоїдних клітин [54]. Однак, у дослідях з проростками *Nigella sativa* найстабільнішим був калус з листків. Він містив, крім диплоїдних, незначну кількість тетраплоїдних клітин. У клітинах калусу з стебел рівень плоідності складав $12n$, з насіння — $8n$ [42].

Рівень і типи мінливості залежать також від виду рослини і від особливостей його генотипу. Наприклад, порівняння чотирьох видів арабідозеиса показало, що з пиляків у всіх випадках формувалися анеуплоїдні калуси, а з насіння, що проростали, — в основному диплоїдні. При цьому рівень мінливості за числом хромосом був різним у різних видів і навіть у межах одного виду в різних калусах, отриманих з аналогічних експлантів [34]. У двох видів картоплі, *Solanum tuberosum* і *S. phureja* у ділянках листків, на яких *in vitro* утворювався калус, поліплоїдні клітини виникали внаслідок ендоредуплікації. Кількість циклів редуплікації була видоспецифічною, а рівень поліплоїдії залежав від початкового рівня плоідності генотипу, у тому числі від частини поліплоїдних ядер у вихідній міксоплоїдній цілянці листка [58]. Подібні результати були пізніше отримані в аналогічних дослідях з люцерною [32]. При культивуванні протопластів, отриманих з зародків двох сортів рису різновидності *jaratica*, були встановлені відмінності в плоідності культивованих клітин. В одного сорту калуси були диплоїдні, а в іншого — міксоплоїдні, і містили диплоїдні, тетра-, окто-, і анеуплоїдні клітини. Автори вважають, що поліплоїдні клітини могли виникнути як наслідок ендополіплоїдії при вирощуванні протопластів у культурі *in vitro* [56].

Рівень і тип хромосомної мінливості *in vitro* залежать від початкового рівня плоідності вихідної рослини та експланта. У представників різних видів, сортів, форм і генотипів або

навіть при використанні однієї рослини, але різних вихідних експлантів, залежність темпу поліплоїдії від початкового рівня шлюїдності може бути різною. Наприклад, у *Crepis capillaris* темп поліплоїдії клітин первинного калусу на експлантах від гаплоїдної рослини був вищим, ніж на аналогічних експлантах диплоїдної [60]. У картоплі при вивченні чотирьох дигаплоїдів і одного тетраплоїдного сорту висока частота спонтанного подвоєння числа хромосом (42–50%) спостерігалась у клітинах культури бульбодисків у трьох дигаплоїдних генотипах, а в четвертого дигаплоїду і тетраплоїду подвоєння не відбувалось [51].

Досліджувались первинні калуси, отримані з ділянок листка диплоїдної рослини *N. tabacum* (сорт Самсон), з його недозрих пиляків і з ділянок листків трьох гаплоїдів, отриманих при культивуванні тих же пиляків [20]. Було встановлено, що 4 калуси з листків диплоїда не відрізнялись між собою за кількістю хромосом. У них переважали диплоїдні мітози (87–93%), зустрічались також тетраплоїдні (до 2%), гіподиплоїдні (2,3–4,7%) і гаплоїдні (2,3–4,9%) клітини. У таких же умовах калуси гаплоїдного походження суттєво відрізняються між собою. Різниця була встановлена і між зразками з різних ділянок одного листка. У деяких калусів значним був відсоток гіпогаплоїдних клітин, який досягав в одному випадку 43%. Подібні результати були отримані і при вивченні первинних калусів з пиляків. Але відсоток диплоїдних мітозів у ряді випадків був значно вищий [20]. Загальним для калусів тютюну гаплоїдного походження, особливо з пиляків, була порівняно невелика кількість анеуплоїдних клітин.

Подібні дані отримані при аналізі калусів томатів, індукованих на ділянках листків гаплоїдної, диплоїдної і тетраплоїдної рослин, а також отриманих з пиляків диплоїда [62]. Відмінність від тютюну полягала у більшій варіації мінливості всіх типів первинних калусів томатів за кількістю хромосом і у вищій частоті клітин як з редукованим, так і з збільшеним числом хромосом. Це, напевно, обумовлено особливостями томату як об'єкта дослідження. Вони полягають у тому, що різним його органам, з тому числі і листкам, властива міксоплоїдія (поїсоматія). При цьому частота клітин з різними C рівнями ДНК у диплоїдних і тетраплоїдних рослин практично однакова в межах від $2C$ до $16C$ і більше, і досягає, наприклад у черешкових старпочих листках рівня $123C$. Це свідчить про те, що у томату в нормі в ході онтогенезу проходять процеси як редукції, так і ендоредуплікації, а сама міксоплоїдія контролюється генетично як число ендоредуплікацій і перебуває під впливом умов вирощування рослин [62].

Отже, початковий рівень шлюїдності експланта може суттєво впливати не тільки на темпи поліплоїдії, але і на процеси редукції кількості хромосом при калусоутворенні. При цьому у різних видів рослин залежність процесу мінливості числа хромосом від початкового рівня шлюїдності має різну ступінь вираженості [20].

Рівень геномної мінливості клітин первинного калусу залежить також від умов вирощування рослин і навіть від стадії клітинного циклу вихідного експланта [44, 55]. Це, напевно, обумовлено тим, що умови вирощування можуть суттєво впливати на особливості геномної мінливості в онтогенезі. Наприклад, як у диплоїдних, так і у тетраплоїдних рослин томатів, кількість ендоредуплікацій у клітинах листків і сім'ядолей, а звідси і особливості міксоплоїдії їхніх тканин, були різними при вирощуванні рослин у теплиці та *in vitro* [62]. Подібні дані отримані і для інших рослин [18]. Напевно, саме тому, наприклад, у суниці *Fragaria ananassa* листові експланти рослин, що вирощуються *in vitro*, порівняно з такими однорічних тепличних рослин утворили калус, який характеризувався підвищеним рівнем геномної мінливості, зокрема анеуплоїдією [55].

Показано, що поліплоїдія і анеуплоїдія можуть виникати в культурі на початку клітинних поділів і частота таких змін збільшується з віком культури. Так, при культивуванні калусів гороху, одержаних із тканин сім'ядолей, анеуплоїдні та триплоїдні клітини були виявлені уже в перших пасажах при цьому з віком культури зростала і частота перебудов хромосом, які виявляли в анафазах клітин, що дивилися [8]. Ефективним прийомом, який доводить, що зміна кількості хромосом у культивованих клітинах рослин пов'язана не з вихідною гетерогенністю тканин, а, власне, з умовами культивування, є клоонування окремих клітин. Встановлено, що калусні клони, що культивуються на одній середовищі і при однакових умовах,

розрізняються за кількістю хромосом. У рослин-регенерантів в умовах *in vitro* відбуваються зміни кількості хромосом, їх перебудови, а також типові генні мутації [30]. Так, наприклад, при проведенні цитогенетичного аналізу калусу *Gentiana scabra* та регенерованих з нього рослин, було встановлено, що всі регенеранти характеризувалися такою ж, як материнські рослини, кількістю хромосом ($2n=26$). Однак, у деяких випадках серед калусних культур зустрічались анеуплоїдні і тетраплоїдні клітини, як результат дії умов культивування. Для рослин-регенерантів характерними були фенотипові варіації, що проявлялись у зміні висоти рослин, форми листків і коренів, кількості стебел та часу цвітіння [46].

Встановлено, що, крім зміни кількості і структури хромосом, у клітинах рослин в умовах *in vitro* відбуваються і генні мутації. Вони приводять до виникнення певних варіантів та ознак, які проявляються на рівні не тільки клітин, але й цілих рослин. Частоти генних мутацій достатньо великі і можуть бути використані для підвищення генетичного різноманіття культивованих рослин [8].

Отже, клітини рослин, потрапивши в умови культивування *in vitro*, піддаються генетичним змінам. Збереження клітинами генетичної стабільності може розглядатися лише як виключення. Прямі цитологічні спостереження за числом і структурою хромосом культивованих клітин рослин свідчать, що каріотипи культивованих клітин легко піддається модифікації. Частина таких клітин гине, але деяка частина може розмножуватися і витіснити нормальні хромосомні варіанти. Встановлено, що клітини із зміненими каріотипами можуть володіти морфогенетичними потенціями і давати початок рослинам-регенерантам із зміненим числом і структурою хромосом [8].

Процеси поліплоїдії і редукції числа хромосом у диференційованих клітинах є генетично обумовленими. Встановлено, що в онтогенезі рослин у різних тканинах вміст і співвідношення фітогормонів і інгібіторів змінюється, що регулює в них, а також у сусідніх органах і тканинах, процеси диференціації і морфогенезу [12, 22], а вплив екзогенних фітогормонів залежить від стадії онтогенезу [23].

На прикладі культивованих *in vitro* клітин і тканин показано, що дедиференціація, диференціація і соматичний ембріогенез індукуються екзогенними фітогормонами [8]. Змінюючи співвідношення між фітогормонами в умовах *in vitro* можна або протягом тривалого часу вирощувати диференційовану тканину, або викликати формування кореневих і стеблових зародків, або закладку ембріоїдних структур.

Виявлено, що кінетин, один з найбільш використовуваних і найбільш вивчених фітогормонів з цитокініновою активністю, є речовиною, що викликає як у інтактних рослин, так і в культурі тканин, поліплоїдизацію клітинних популяцій внаслідок індукування ецломітозів [53], порушення цитокінезу [17] та селективну стимуляцію поділу поліплоїдних клітин [29]. Торрі з співробітниками [47] встановили, що при дії на диплоїдні клітини гороху кінетин викликав два цикли редуплікації хромосом, внаслідок чого з'являлись тетраплоїдні метафази. Дія на тетраплоїдні клітини кортекса кореня не приводила до додаткової реплікації. У процесі росту культури клітин на середовищі з кінетином кількість тетраплоїдних, а потім і октоплоїдних мітозів збільшувалась, і вже через п'ять днів диплоїдні клітини складали менше, ніж 10% клітинної популяції [57].

Подібну дію на клітинні популяції мають ауксини 3-індолпропіонова кислота (ІОК) [1] і 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д) [14] і гібереліни [2]. У досліджах італійських дослідників [36] при вирощуванні калусної тканини *Naploarppus gracilis* встановлено, що поліплоїдизація калуса залежить від співвідношення в живильному середовищі цитокінінів та ауксинів. Поліплоїдні штами з перевагою тетраплоїдних клітин отримані на середовищі, доповненому 0,02 мг/л кінетину та 1 мг/л ІОК, з перевагою октоплоїдних — на середовищі з 0,02 мг/л кінетину та 2 мг/л α -нафтилоцтової кислоти (НОК). Штами з перевагою диплоїдних клітин отримані на середовищі з 0,02 мг/л кінетину та 4 мг/л ІОК [36]. Подібні результати були отримані в культурі тканин *Allium cepa*, де додавання в живильне середовище 5 мг/л ІОК приводило до збільшення числа диплоїдних клітин до 100%, а використання цитокініну — 6-(3-метил-2-бутен-1-іл-аміно)-пурину — стимулювало розвиток коренів з більшою, ніж у

контролі, кількістю диплоїдних клітин [52]. Отже, функціональна і хромосомна впливність клітин в онтогенезі рослин у певній мірі регулюється гормональним шляхом.

У рослин морфогенез може також регулюватися фітохромною системою шляхом диференціальної експресії генів [25]. Біохімічно це визначається як зміна у співвідношенні фітогормонів та інгібіторів [24]. Тому, не виключено, що фітохромна система може впливати на хромосомну впливність в онтогенезі рослин. Підтвердженням цього припущення можуть бути дані про різну шлюбність диференційованих клітин, різних органів рослин, у тому числі епикотіля, що вирощується в темноті та на світлі [38].

Подальше вивчення природних механізмів регуляції плоїдності клітин у рослин і пошуки шляхів целеспрямованого втручання у ці механізми є важливим для багатьох галузей біології, і перш за все, для біології розвитку, для вирішення деяких практичних питань експериментальної генетики рослин, для з'ясування залежності між змінами рівня шлюбності та змінами синтезу культурами клітин і тканин біологічно активних речовин.

Зміни вторинного метаболізму в культурах клітин можуть бути викликані різними факторами: зовнішніми умовами культивування (світлом, температурою, швидкістю обертання посудини для культивування); внутрішніми умовами культивування (компонентами живильного середовища — регуляторами росту, макро- і мікропоживними речовинами, джерелами вуглецю, попередниками і елісторами, асраїдєю і перемішуванням культури, рН живильного середовища); попередньою обробкою клітин перед культивуванням, відсутністю диференціювання тканини в деяких калусних і суспензійних культурах; змінами біосинтетичного потенціалу культур клітин, одержаних із різних частин рослин; структурними перебуваннями геномів культивованих клітин викликаними ендоредуплікацією і (або) процесами фрагментації ядерної ДНК (особливості, які властиві росту клітин *in vitro*) [3].

Для багатьох культур клітин рослин характерним є те, що після фази швидкого поділу клітин у системі періодичного культивування швидкість раптово знижується і починається формування вторинних продуктів, а також інших ознак спеціалізації клітин. Це так званий профазно-ідофазний розвиток. Первинний метаболіт переважно синтезується як прямий результат метаболічних процесів, що підтримують життєдіяльність і ріст клітин, та послідовно накопичується із збільшенням сухої маси клітини. На противагу цьому, вторинний метаболіт не є продуктом метаболізму, що підтримує клітини в активному стані поділу, і накопичення цих метаболітів запізнюється порівняно з ростом клітин. Тому, умови культивування, що сприяють швидкому росту, дуже рідко сприяють біосинтезу вторинних метаболітів [3]. Отже, для одержання необхідного специфічного продукту при періодичному вирощуванні культур клітин рослин необхідно намагатись досягнути оптимальних умов як для накопичення біомаси, так і для біосинтезу і накопичення вторинних метаболітів.

При вирощуванні *in vitro* в інших фізико-хімічних умовах проходить розрепресування заблокованої в нативних умовах генетичної інформації, наступають зміни, перебудови у структурі хромосомного апарату, виникають порушення клітинного поділу. Важливим є те, що клітини зі зміненими каріотипами в умовах культури не елімінують з популяції, а можуть успішно репродукуватися. І тому, у багатьох випадках *in vitro* клітина набуває здатності утворювати ті речовини, які в нативних умовах у материнській клітині не синтезуються [5, 13, 63]. Так, деякі культури в умовах *in vitro* можуть продукувати підвишені кількості алкалоїдів, наприклад, апоскополамін виявлений у більшій кількості в екстрактах із культур *Datura stramonium*, порівняно з інтактними рослинами, де цей алкалоїд присутній лише у слідових кількостях. Крім того, деякі культури синтезують алкалоїди, не виявлені *in vivo*, наприклад, едулінін у *Ruta graveolens* і ароморін у *Stephania cepharantha* [3].

Встановлено, що на якісний склад та кількісний вміст біологічно активних речовин культивованих *in vitro* пагонів *G. lutea* впливають концентрації фітогормонів (6-бензиламінопурину (БАП) та ІОК) та їх співвідношення у живильному середовищі [49]. Змінюючи склад середовища або використовуючи двофазне культивування, можна підібрати оптимальні умови з великим виходом біомаси та високим вмістом біологічно активних речовин. У культивованих *in vitro* коренях *G. lutea* вміст генціопікрину був меншим від аналогічного показника у культивованих пагонах, сверціамарин відсутній [49].

Довготривале культивування калусної культури мелси лікарської приводило до змін кількості продукованої ефірної олії та співвідношення між її складовими компонентами [37]. Вміст цитронелалю, цитронелолу, неролу і гераніолу під впливом екзогенних регуляторів росту підвищувався, тоді як синтез гераніл ацетату пригнічувався. Живильні середовища, доповнені високими концентраціями БАП, стимулюють нагромадження у рослинах значної кількості (більше, ніж 10%) алдоаромодентрону. Цей сесквітерпеновий вуглеводень є лише слідовим складником у контрольних рослин *M. officinalis* [37].

Отже, підібравши тип експланту та маніпулюючи складом живильного середовища, можна направлено впливати на генотипову конституцію клітинної популяції, створювати умови для преференціального розмноження в ній клітин із заданим числом хромосом і отримувати клітинні лінії з генетично детермінованою здатністю до надсинтезу тої чи іншої речовини [4, 18]. Застосування таких підходів особливо актуальним є для лікарських рослин, потреби в яких у фармацевтичній промисловості та в народній медицині зростає, а запаси у природі через нерегламентовану господарську діяльність обмежені.

Способи підвищення біосинтетичної активності культур клітин і тканин

Регулятори росту та інші подібні біологічно активні речовини можуть бути використані не тільки для регуляції процесів вторинного метаболізму культивованих клітин різних видів рослин, різних за типом росту та ступенем диференціації (у тому числі трансформованих агробактеріями), але й для одержання нових штамів, підвищена продуктивність яких може бути обумовлена змінами генетичної структури клітинних популяцій. Такі речовини безсумнівно привертають увагу ще й тому, що вони на відміну, наприклад, від типових мутагенів, викликають направлені зміни генетичної структури клітинних популяцій. Високий рівень гетерогенності та мінливості культивованих клітин, особливо геномної мінливості, що призводить у деяких випадках до нестабільної продуктивності, може бути джерелом одержання нових штамів-продуцентів [18].

З використанням експериментального мутагенезу стало можливим одержання продуктивних штамів, що накопичують у ряді випадків важливі продукти, які синтезуються вихідними рослинами у незначних кількостях [18]. У деяких випадках доцільно збільшити спонтанну генетичну мінливість обробкою мутагенами. Вважають, що в популяціях клітин можуть виникати варіанти, в яких збільшення кількості потрібного метаболіту відбувається як наслідок змін на рівні структурних або регуляторних генів. При цьому у культивованій клітині використовуються шляхи метаболізму, що відмінні від властивих рослині і, що найбільш важливо і бажано, не підлягають контролю розвитку а, отже, можливі на рівні неорганізовано проліферуючих клітин [6]. Завдяки мінливості клітин у культурі *in vitro* можливе отримання штамів, які б забезпечували високий вихід цінних продуктів метаболізму рослинної клітини.

Так, при клопуванні суспензійної культури клітин пасльону, виділено штам, які накопичують більше, ніж 3% від сухої маси, стероїдного алкалоїду соланідину. Застосування мутагенезу з наступною селекцією дозволило отримати штам діоскорей дельтовидної, який містив 3% діосгеніну від сухої маси [5, 8].

Для збільшення виходу біомаси рослинних клітин і цільового продукту використовується метод відбору особливо активних поодиноких клітин з використанням радіоактивно мічених антитіл проти цільового продукту. Наприклад, Отже отриманий клон клітин *Catharanthus roseus*, який продукує вдвічі більше аймаліцину, порівняно з вихідними клітинами [11].

При вирощуванні *Papaver bracteatum* виявлено, що зміна рН живильного середовища, опромінення тканин нейтронами, введення в поживне середовище аналогів амінокислот, а також механічне пошкодження тканини при їх пасивуванні виявляє стимулюючу дію на біосинтез у клітинах маку сангвінаріну [16].

Генетична трансформація та інші генно-інженерні маніпуляції дозволили створити перспективні високопродуктивні культури [21]. Особливо слід відзначити трансформанти, виділені за допомогою агробактерії та її плазмид, зокрема, одержання «бородатих коренів», продуктивність яких виявилась досить високою [18, 21]. Ці культури здатні синтезувати весь спектр коренеспецифічних вторинних метаболітів. Завдяки високій ростовій активності генетично трансформованих коренців можливе одержання їх значної біомаси, порівняно з

культурою клітин. Роставий індекс більшості стабільних корепевих культур становить від 20 до 50 за період 2-3 тижневого культивування. Тому, якщо врахувати, що при такому культивуванні концентрація вторинних метаболітів аналогічна цій рослині, загальна продуктивність культивованих коренів може бути значно вищою, ніж продуктивність цілої рослини. Цікавою особливістю генетично трансформованих коренів є їх здатність виділяти біологічно активні речовини у живильне середовище (від 10 до 75% їхнього ендогенного вмісту). Можливо, це зумовлено відсутністю їх відтоку в надземні органи рослини, що робить перспективним утилізацію живильного середовища в промислових масштабах [26].

Для трансформації рослин роду *Gentiana*: *G. acaulis*, *G. cruciata*, *G. lutea*, та *G. purpurea* були використані штами ATCC15834 та A4M70GUS *A. rhizogenes* [50]. Отримані в результаті мікроклонального розмноження пагони перелічених вище видів рослин були інюкульовані суспензією клітин *A. rhizogenes*. Адвентивні корені з'являлися в місцях інюкуляції у рослин усіх 4 видів. Кореневі апекси культивувались на живильному середовищі без фітогормонів протягом 2-6 років. Вони характеризувались значним розгалуженням та плагіотропізмом [50]. Спонтанне формування бруньок відбувалось на коренях *G. cruciata*. Корені *G. lutea*, *G. acaulis* і *G. purpurea* культивували на середовищах з високою концентрацією кінетину, що викликало формування пухких калусних тканин. Лише у випадку з *G. purpurea* ці калуси були органогенними. Регенеровані пагони *G. cruciata* та *G. purpurea* дали початок рослинам, які проявляли типові для трансформованих *A. rhizogenes* фенотипи рослин: короткі міжвузля та покручені листки. У коренях *G. acaulis* та *G. cruciata*, трансформованих за допомогою *A. rhizogenes* A4M70GUS, позитивна реакція X-glc вказала на активність бета-глюкуронідази ДНК, отримані з волосатих коренів і з коренів трансгенних рослин, гібридизувати відповідними геномними пробами саузерн-блотингу, завдяки чому була доведена стабільна і генетична трансформація чотирьох видів *Gentiana* [50].

У результаті трансформації коренів *G. lutea* *Agrobacterium rhizogenes* штам ATCC 15834 вибрано 9 клонів з добре розвинутою морфологічною структурою та високою інтенсивністю росту. У 2 із 9 клонів серед вторинних метаболітів у найбільшій кількості синтезувалися лекофіноїди, в інших – ксантони. В одному із клонів вміст генцицину був низьким до такого в коренях штактих рослин [49]. Отримані *in vitro* пагони та трансформовані корені *G. lutea*, за припущеннями авторів, можуть бути оригінальним джерелом сировини для фармацевтичної промисловості [49].

При проведенні нами трансформації з використанням *A. rhizogenes* штам YEB отримані культури ізольованих коренів *G. lutea* характеризувались інтенсивнішим ростом та вищим, порівняно з не трансформованими культурами, вмістом біологічно активних речовин [35].

Для отримання метаболітів можна застосувати іммобілізовані клітини рослин. Оскільки, при культивуванні рослинних клітин у вільному стані спостерігається агрегація клітин, диференціювання та зміна їх активності. Іммобілізовані клітини рослини позбавлені цього недоліку і мають переваги: їх вирізняє підвищена стійкість до механічних подразнень; фаза росту співпадає з фазою утворення метаболітів; клітини можна легко перенести на нове середовище або у реакційну суміш [11].

Знання особливостей і механізмів структурно-функціональної мінливості геному культивованих клітин, розробка генетичних основ клітинної селекції дозволять цілеспрямовано створювати стабільні штами-суперпродуценти біологічно активних речовин, у тому числі тих, що інтенсивно використовуються в фармацевтичній промисловості. Використання таких штамів підвищить рентабельність і конкурентоздатність клітинних біотехнологій одержання цінних продуктів рослинного походження.

ЛІТЕРАТУРА

1. Араратян Л. А. Специфічність мутаційної мінливості хромосом від дії підрілощової кислоти // Експериментальні мутації та селекція рослин. - К.: Наукова думка, 1971. — С. 47–53.
2. Бегларян Н. П. О некоторых цитологических особенностях мутанта подсолнечника, индуцированного гибберелловой кислотой // Цитология и генетика. 1970. — Т. 4, № 6. — С. 547–552.

- 3 Биотехнология сельскохозяйственных растений / Пер с англ В И Негрука с предислов Р Г Бутенко М: Агрпромиздат, 1987 – 301 с
- 4 Бондаренко А М Клеточные технологии и соматоклональная изменчивость в селекции пшеницы // Физиология и биохимия культурных растений – 1996 – Т 28, №3 – С 183-195
- 5 Бутенко Р Г Индукция морфогенеза в культуре тканей растений — М: Наука, 1980 — С 42-54
- 6 Бутенко Р Г Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения // Культура клеток растений и биотехнология, 1986 – Т 18 – С 3–20
- 7 Бутенко Р Г, Гусев М В, Киркин А Ф, Корженевская І І, Маркова Е Н Клеточная инженерия — М: Высшая школа, 1987 — 127 с
- 8 Бутенко Р Г, Гостимский С А Изменчивость генома растительной клетки при культивировании в условиях *in vitro* // Биотехнология – 1985 – № 2 – С 79-85
- 9 Валиханова Г Ж Биотехнология растений -- Алматы, «Конятык» 1996 – 272 с
- 10 Валиханова Г Ж, Рахимбаев И Р Культура клеток и биотехнология растений Алматы, КазГУ, 1989 — 80 с
- 11 Виестур У Э, Шмите И А, Жилевич А В Биотехнология биотехнологические агенты, технология, аппаратура – Рига: Изд-во «Знание», 1987 – 283 с
- 12 Гордищенко И И, Сапожникова П Ф, Дерендовская А И Эндокринные регуляторы роста и укоренения черенков можжевельника казацкого // Физиол. раст., 1976 — Т 23, №4 — С 753–759
- 13 Калинин Ф Л, Сарлацкая В В, Полищук В Е Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений К: Наук. думка, 1980 — 488 с
- 14 Калдак Х, Каареп Ю Цитогенетическая характеристика действия 2,4 Д на каллусные ткани *Parlorarrhus gracilis* // Уч. запіски Тартуского ун-та, тp. по цитологии и генетике — Tartu 1976 С 32–51
- 15 Катаева Н В, Бутенко Р Г культура клеток и биотехнология -- М: Наука 1986 -- 285 с
- 16 Кузнецова И Н, Рабинович С А Действие стрессовых факторов на биосинтез бизофенантридиновых алкалоидов в культуре тканей *Paraver bracteatum* // Тез. докл. междунар. конф. Биология культивируемых клеток и биотехнология, Новосибирск, 2-6 августа 1988 – 240 с
- 17 Кулаева О Н и др. О восстановлении белково-нуклеинового обмена срезаемых листьев в процессе их изменения под действием кинетина // ДАН СССР - 1963 — Т 152, № 6 — С 1475–1478
- 18 Кунах В А Генотипная изменчивость и накопление индолоидовых алкалоидов в культуре клеток раувольфии змеиной. *Rauwolfia serpentina* Benth // Биополимеры и клетка - 1994 Т 10, № 1 - С 3-30
- 19 Кунах В А Генотипная изменчивость соматических клеток растений 1 Изменчивость в онтогенезе // Биополимеры и клетка — 1997 — Т 10, №6 — С 3–35
- 20 Кунах В А Генотипная изменчивость соматических клеток растений 4 Изменчивость в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* // Биополимеры и клетка — 1998 — Т 14, №4 — С 298–320
- 21 Кучук П В Генетическая инженерия растений – К: Наук. думка, 1998 – 152 с
- 22 Лылов Д, Андропова Т Изменение на цитокинините в позата // Физиол. раст. (Болгария) — 1975 – Т 1, № 4 – С 3–11
- 23 Лиходат Т В Значение генного и питользаматического уровней регуляции в компетенции клеток разного возраста к действию индолит-3-уксусной кислоты // Структура и функции клеточного ядра. Новосибирск. 1975 – С 43–44
- 24 Ложникова В Н, Чайлахян М Х Реакция прерывания темноты светом и ингибиторы роста // ДАН СССР, 1975 Т 222, № 5 – С 1242–1245
- 25 Мор Г Молекулярные основы фитоморфогенеза // Физиол. и биохимия культ. раст., 1976 Т 8, № 5 — С 462–472
- 26 Мусеяно М М Физиология растений. Пидручник -- К: Вища шк., 1995 — С 467-470
- 27 Пирузян Э С. Основы генетической инженерии растений — М: Наука, 1988 — 304 с
- 28 Рахимбаев И Р, Колумбасва С Ж, Джокебаева С А Культура клеток и клеточная инженерия растений Алматы, КазГУ, 1993 – 80 с
- 29 Сидоренко П Г, Кунах В А Влияние кинетина на репродукцию клеток различной ploidy IV Всесоюз. совещ. по полиплоидии 12–14 ноября 1975 г. Тезисы докл. -- К: Наукова думка, 1975 – С 112–114
- 30 Сидоров В А Биотехнология растений. Клеточная селекция – К: Наук. думка, 1990 – 280 с
- 31 Страпняк Н М, Грицак Л Р, Бяк В Я, В В Грзбинко Види роду *Centiana* L. у флорі України: хорология, біологічна активність, використання // «Наукові записки» Тернопільського державного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія 4: Біологія, № 4(11), 2000 — С 53-59

- 32 Хрусталева Л. И., Карлов Г. И. Кинетика полиплоидизации клеток в первичном каллусе у различных генотипов люцерны // Цитология и генетика — 1995 — Т 29 № 2 — С 31–36
- 33 Шамина З. Б. Методические указания по клеточной селекции — М., 1984 — 36 с
- 34 Арноя J. A., Scholl R. L. Induction of haploid callus from anthers of four species of *Arabidopsis* // Z. Pflanzenphysiol — 1978 — Vol 90, N 1 — P 33–43
- 35 Baranchuk S. O., Havrylova O. M., Khorostkivska O. Yu. Root culture transformation of *Gentiana lutea* L. *Agrobacterium rhizogenes* // Conference on genetics and molecular biology for students and young scientists devoted to 100th anniversary of genetics. Abstract book - Lviv Spolom, 2000 - P 43
- 36 Bennici A., Biuatti M., D'Amato F., Pagliai M. Nuclear behaviour in *Haplopappus gracilis* callus grown in vitro on different culture media // Colloq Int CNRS, — 1971 — N 193 — P 245–250
- 37 Binder G., Vandenberg T., AbouMandour A. A., Czygan F. C. Regeneration of plants and production of volatiles from callus cultures of *Melissa officinalis* L. 3. Effect of exogenous growth regulators on essential oil composition // J of Appl Botany-Angewandte Botanik — 1996 — Vol 70, N 5-6 — P 181–184
- 38 Bocker G., van Oostveldt P., van Parijs R., Fredericq H. Phytochrome controlled endonucleolysis during the process of cell elongation in the epicyotyl of *Prunum sativum* seedlings // Arch Int Physiol Ft biochim — 1975 — Vol 83, N 1 — P 169–171
- 39 Brossard D. Etude cytophotométrique des variations du contenu en DNA nucléaire au cours de la différenciation de la moelle de Tabac (*Nicotiana tabacum*) cultivée in vitro // Compt rend Acad Sci — 1974 — Vol 278, N 20 — P 2517–2520
- 40 Brossard D. Neoformation de bourgeons végétatifs et inflorescentiels à partir de disques foliaires du *Crepis capillaris* L. Wallr. cultivés in vitro // ibid — 1979 — Vol 93, N 1 — P 69081
- 41 Butcher D. N., Sogeki A. K., Tommerup S. C. Factors influencing changes in ploidy and nuclear DNA levels in cells from normal, crown gall and habituated cultures of *Helianthus annuus* L. // Protoplasma — 1975 — Vol 86 — P 295–308
- 42 Chand S., Roy S. C. Study of callus tissues from different parts of *Nigella sativa* (Ranunculaceae) // Experimentia — 1980 — Vol 36, N 3 — P 305–306
- 43 Dodds J. H., Phillips R. DNA and histone content of immature tracheary elements from cultured artichoke explants // Planta — 1977 — Vol 135, N 3 — P 213–216
- 44 Ito M., Stern H. Studies of meiosis in vitro. I. In vitro culture of meiotic cells // Develop Biol — 1967 — Vol 16, N 1 — P 36–53
- 45 Jeoman M. M., Evans P. K., Naik G. G. Changes in mitotic activity during early callus development // Nature — 1966 — Vol 209 — P 1115–1116
- 46 Lee M.-K., Bang J. W., Lee H.-K. Chromosomal stability in the cultured cells and the regenerated plants of *Gentiana scabra* var. *buergeri* // Chromosome Research — 1995 — 3, Supplement 1 - P 116
- 47 Libberga K. R., Torrey J. W. Hormone-induced endoreduplication prior to mitosis in cultured pea root cortex cells // Developm Biol — 1973 — Vol 60, N 4 — P 293–299
- 48 Menghini A., Panceschi N., Romano B., Venanzi G., Bezzi A., Aiello N. Altitudinal effects on pigment and protein contents in *Gentiana lutea* L. leaves // Annali Della Facoltà Di Agraria Università Degli Studi Di Perugia 44 Part. — 1990 (1993) — Vol 1, N 9 — P 253–259
- 49 Menković N., Šavikin-Fodulović K., Momčilović T., Grubišić D. Quantitative determination of secoiridoid and γ -pyrone compounds in *Gentiana lutea* cultured in vitro // Planta Med — 2000 — Vol 66 — P 96–98
- 50 Momčilović T., Grubišić D., Neskojic M. Micropropagation of four *Gentiana* species (*G. lutea*, *G. cruciata*, *G. purpurea* and *G. acaulis*) // Plant Cell Tissue and Organ Culture — 1997 — Vol 49, N 2 — P 141–144
- 51 Mozafari J., Wolyn D. J., Ait-Khan S. F. Chromosomal doubling via tuber disk culture in dihaploid potato as determined by confocal microscopy // Plant Cell Repts — 1997 — Vol 16 - P 229–333
- 52 Nadi S., Frindborg G., Eriksson T. Effects of 6-(3-methyl-2-buten-1-ylamino)-purine and 6-naphthalenacetic acid on root formation and cytology of root tips and callus in tissue of *Allium cepa* var. *Profilerum* // Hereditas — 1977 - Vol 86, N 1 — P 57–61
- 53 Nagl W., Racker W. Shift of DNA replication from diploid to polyploid cells in cytokinin controlled differentiation // Cytobios — 1974 — Vol 10, N 39 — P 137–144
- 54 Negruțiu D., Beeftink F., Jacobs M. *Arabidopsis thaliana* as model system in somatic cell genetics. I. Cell and tissue culture // Plant Sci Lett — 1975 — Vol 5 — P 293–304
- 55 Nebha N. S., Kartha K. K., Sushnoff C. Nuclear DNA content and isozyme variation in relation to morphogenic of strawberry (*Fragaria ananassa*) callus cultures // Can J Bot — 1991 — Vol 69, N 2 — P 239–244
- 56 Nishibayashi S., Nayashi Y., Kyojuka J., Shimamoto K. Chromosome variations in protoplast derived calli and in plants regenerated from the calli of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) // Jap J Genet — 1989 — Vol 64, N 5 — P 355–361

- 57 Phillips R, Torrey J G DNA synthesis cell division and specific cytodifferentiation in cultured pea root cortical explant // *Developm Biol* — 1973 — Vol 32, N 2 — P 336-347
- 58 Pijnaker L P, Sree Ramulu k, Dijkhuis P, Ferwerd M A Flow cytometric and karyological analysis of polysomaty and polyploidization during callus formation from leaf segments of various potato genotypes // *Theor and Appl Genet* --- 1989 — Vol 77, N 1 — P 102-110
- 59 Reinert J, Kuster H J Diploide, chlorophyllhaltige Gewebekulturen aus Blättern von *Crepis capillaris* (L.) Waltz // *Z Pflanzen physiol* — 1966 — Vol 54, N 3 — p 213-222
- 60 Sacristan M D Karyotypic changer in callus cultures from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* L // *Chromosoma* — 1971 — Vol 33 — P 373-383
- 61 Shinoda T, Tabata M Chromosome numbers in cultured pith tissue of tobacco // *Jap J Genet* — 1967 Vol 42 N 3 - P 195-201
- 62 Smulders M J M, Rus-Kortekaas W, Griffioen I J W Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants // *Plant Sci* — 1994 — Vol 97, N 1 — P 53-60
- 63 Whipkey A, Simon J S, Charles D J, Janick J In vitro production of artemisinin from *Artemisia annua* L // *J Herbs Spices and Med Plants* — 1992 — Vol 1, N 1-2 — P 15-22
- 64 Zenk M N, El-Shagi H, Aerts H, Stockigt I, Weiler F W, Deus B Formation of the indole Alkaloides Serpentine and Ajmalicine in Cell Suspension Cultures of *Catharanthus roseus* // *Plant Tissue Culture and Biotechnological Application* Berlin - Heidelberg - N Y, Springer Verlag 1977 — P 27-43

N.M. Strashnyuk, L.R. Hrytsak

USAGE OF MEDICINAL PLANTS CELLS AND TISSUES CULTURES FOR OBTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

There have been considered problems of usage of cells and tissues cultures of medicinal plants for obtaining biologically active substances. The analysis of various factors influence on the biosynthetic activity of medicinal plants cells and tissues cultures and the ways of its increasing has been made.

Надійшло 12.02.2001