

Е.Н. БУБЛИК, В.И. АДОНИН, В.А. КУНАХ  
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,  
ул. Акад. Заболотного, 150, Киев 03143, Украина  
E-mail: [kunakh@imbg.org.ua](mailto:kunakh@imbg.org.ua)

## ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ *UNGERNIA VICTORIS* ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА



*Клеточные линии U. victoris, полученные от одной луковицы и длительное время выращиваемые на различных по составу агаризованных и жидких средах, значительно отличались по числу хромосом. Не обнаружено влияния компонентов питательных сред, в том числе фитогормонов, на формирование определенных соотношений клеток разной пloidности. При этом установлено увеличение доли метафаз с диплоидным набором хромосом при переводе каллуса в жидкую среду.*

© Е.Н. БУБЛИК, В.И. АДОНИН, В.А. КУНАХ, 2008

**Введение.** Унгерния Виктора, *Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko ( $2n = 22$ ), принадлежит к семейству *Amaryllidaceae*. Это лекарственное растение было высоко оценено как врачами древнего Тибета, так и современной медициной. Фармакологическая ценность вида обусловлена синтезом изохинолиновых алкалоидов, основные из которых – галантамин и ликорин [1].

Унгерния Виктора – эндемик, распространенный только на Гиссарском хребте и его южных отрогах (Таджикистан, Узбекистан). На сегодняшний день проблемой является не только недостаточность природной сырьевой базы унгернии Виктора для получения биологически активных веществ, но и сохранение генофонда этого исчезающего вида.

В качестве альтернативного источника лекарственного сырья и метода ускоренного размножения растений широко используют культуру тканей *in vitro*. Однако в большинстве изученных случаев культивируемые клетки характеризуются высоким уровнем соматической изменчивости – различных перестроек генома, в том числе изменений числа хромосом, которые часто наблюдают в культуре *in vitro* [2, разд. 7, 8]. Изменения генома осложняют сохранение генофонда растений в культуре *in vitro* и могут приводить к нарушению синтеза вторичных метаболитов [2, разд. 13].

Существенное влияние на уровень и спектр возникающих *in vitro* геномных aberrаций оказывают условия культивирования и компоненты питательных сред, среди которых особое значение придается влиянию экзогенных фитогормонов. Литературные данные по влиянию компонентов питательных сред и условий культивирования на изменение числа хромосом в культуре *in vitro* достаточно противоречивы. Возможно, это связано с тем фактом, что разные виды растений реагируют на внешние факторы, в частности на экзогенные фитогормоны, по-разному [2, разд. 7–9]. Наша работа, посвященная исследованию влияния компонентов сред на хромосомную изменчивость культуры тканей унгернии Виктора, является следующим шагом в направлении изучения этой проблемы.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования служили 8 клеточных линий *U. victoris*, полученных из одной луковицы в 1995 г. Растение-донор произрастало в районе естественного ареала на Памире (Южные склоны

Гиссарского хребта, Таджикистан). Каллусную ткань получали из свежих чешуй луковицы.

С целью поиска условий, оптимальных для биосинтеза веществ вторичного метаболизма и высокого прироста биомассы, культуры выращивали на разных по составу питательных средах. Использовали агаризованные и жидкие среды с общей минеральной основой по прописи Воллосовича и др. [3], но с различным содержанием сахарозы, фитогормонов и микродобавок. Компоненты, по которым отличались использованные варианты питательных сред, приведены в табл. 1. Полный состав сред и условия культивирования приведены в описании к патенту [4]. Генеалогия изученных клеточных линий *U. victoris* приведена на рис. 1.

Длительное выращивание клеток на разных по составу питательных средах не привело к возникновению у изученных клеточных линий существенных отличий ни по морфологии, ни по темпу роста. Линии характеризуются стабильным неорганизованным типом и интенсивным темпом роста. Выход сырой (свежей) биомассы с 1 л среды на 50–60-е сутки роста составляет 400–500 г, иногда до 580 г. В перерасчете на сухую массу выход составляет 19–39 г/л за пассаж, а ростовой индекс колеблется в пределах 4–6 для каллусной культуры и 3–5 – для суспензионной при длительности пассажа до пересадки 40–50 сут и до съема урожая – 55–65 сут. Содержание алкалоидов в биомассе незначительно, а галантамин найден лишь в следовых количествах [5].

Для цитогенетического анализа ткань фиксировали в ацеталкоголе (1 : 3) в течение суток и готовили давленные ацетоорсеиновые препараты по методике [6]. Фиксацию тканей проводили на 5, 8, 13-е сутки пассажа в одно и то же время суток, данные трех сроков фиксации по каждой из линий объединяли в общий пул. Суспензионные культуры анализировали на 13-е сутки пассажа. Для каждого срока фиксации подсчитывали число хромосом в метафазных пластинках на нескольких препаратах, приготовленных из разных участков каллусной ткани.

В ходе исследования выяснилось, что анализ числа хромосом унгернии Виктора осложнен большим количеством полиплоидных метафаз, значительной длиной хромосом и отсутствием данных по их морфологии. Точность подсчета хромосом в метафазе зависела от их числа. Метафазы с числом хромосом от  $2n$  до  $3n$  подсчитаны с точностью до одной хромосомы, от  $4n$  до  $6n$  – с точностью до двух хромосом, свыше  $6n$  – до трех-четырех хромосом. В связи с указанной причиной и для удобства статистической обработки результатов полученный в исследовании ряд хромосомных чисел разбивали на классы (клетки окологаплоидные, околодиплоидные, околотриплоидные и т.д.). Достоверность отличий полученных данных определяли по критерию Стьюдента.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Согласно литературным данным, диплоидное число хромосом для рода *Ungernia* составляет  $2n = 22$  [7]. Проведенный нами анализ пока-

Таблица 1

Компоненты, по которым отличались использованные варианты питательных сред

Среда	Сахароза, %	Регуляторы роста	Витамины	Другие добавки
			мг/г	
5C1	5	Кинетин – 0,1; 2, 4-Д – 1	Тиамин – 1, пиридоксин – 0,5, никотиновая кислота – 0,5	Глицин – 2, мезоинозит – 80, гидролизат казеина – 500
5C01	5	Кинетин – 1; $\alpha$ -НУК – 2	То же	То же
5C3H	5	Кинетин – 0,02; $\alpha$ -НУК – 0,5	»	Мезоинозит – 20, гидролизат казеина – 50
5C	5	–	Тиамин – 1	–
2C	2	–	То же	–

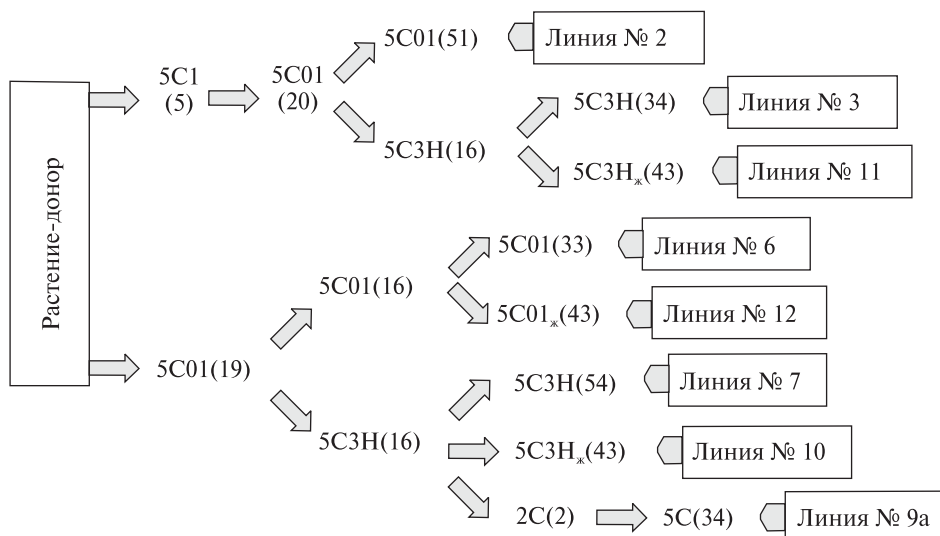


Рис. 1. Генеалогия клеточных линий *U. victoris*: использованные питательные среды и количество пассажей на них (в скобках). Нижний индекс «ж» в названии среды означает, что каллусная ткань выращивалась в жидкой среде без агара на качалках, в остальных случаях выращивание было поверхностным на агаризованных средах

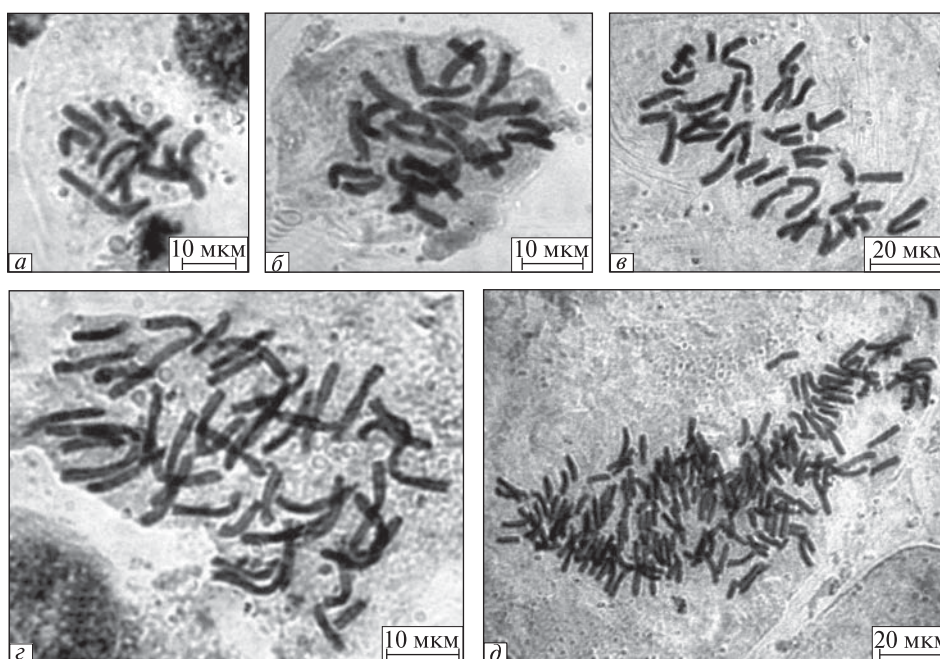


Рис. 2. Метафазы с разным числом хромосом в культуре тканей *U. victoris* ( $2n = 22$ ): а – 11 хромосом; б – 22; в – 33; г – около 44 хромосом; д – около 150 хромосом

зал, что изученные клеточные линии представляют собой миксоплоидные клеточные популяции. Размах хромосомных чисел в них составлял от гаплоидного до гипероктаплоидного. Встречались отдельные высокоплоидные клетки с набором хромосом, достигающим

36n (рис. 2). Значительную долю составляли анеуплоидные клетки всех уровней ploидности, их суммарная частота у всех линий достигала 50%.

Данные по структуре клеточных популяций каллусных линий, выращиваемых на ага-

ризованных средах разного состава, приведены на рис. 3. Две из клеточных линий — № 2 и 6 — имели почти идентичную историю культивирования (рис. 1). Несмотря на это, структура их клеточных популяций коренным образом отличалась. Линия № 2 характеризовалась четко выраженным модальным классом с околодиплоидным числом хромосом, он составил  $82,3 \pm 2,1 \%$ . У линии № 6 модальный класс был околотетраплоидным ( $57,8 \pm 3,6 \%$ ), существенную долю составляли «соседние» околотриплоидный и околопентаплоидный классы —  $14,6 \pm 2,6$  и  $13,5 \pm 2,5 \%$  соответственно.

Структура линии № 3 существенно отличалась от «материнской» линии № 2 (рис. 1), а также от всех остальных линий. Она характе-

ризовалась наличием трех ведущих классов: околодиплоидные клетки составляли  $41,5 \pm 2,7 \%$ , околотриплоидные —  $32,1 \pm 2,5 \%$ , околотетраплоидные —  $17,9 \pm 2,1 \%$ , т.е. по сравнению с линией № 2 за счет модального околодиплоидного класса произошло увеличение долей клеток в первую очередь околотриплоидного, а также околотетраплоидного классов ( $P < 0,001$ ).

Модальный класс линии № 7 составляли околотетраплоидные метафазы ( $49,5 \pm 3,0 \%$ ), также были достаточно высоки доли клеток с околодиплоидным и околотриплоидным наборами хромосом. По сравнению с исходной линией № 6 (рис. 1) у линии № 7 содержание околопентаплоидных клеток ниже на  $0,1\%$ -

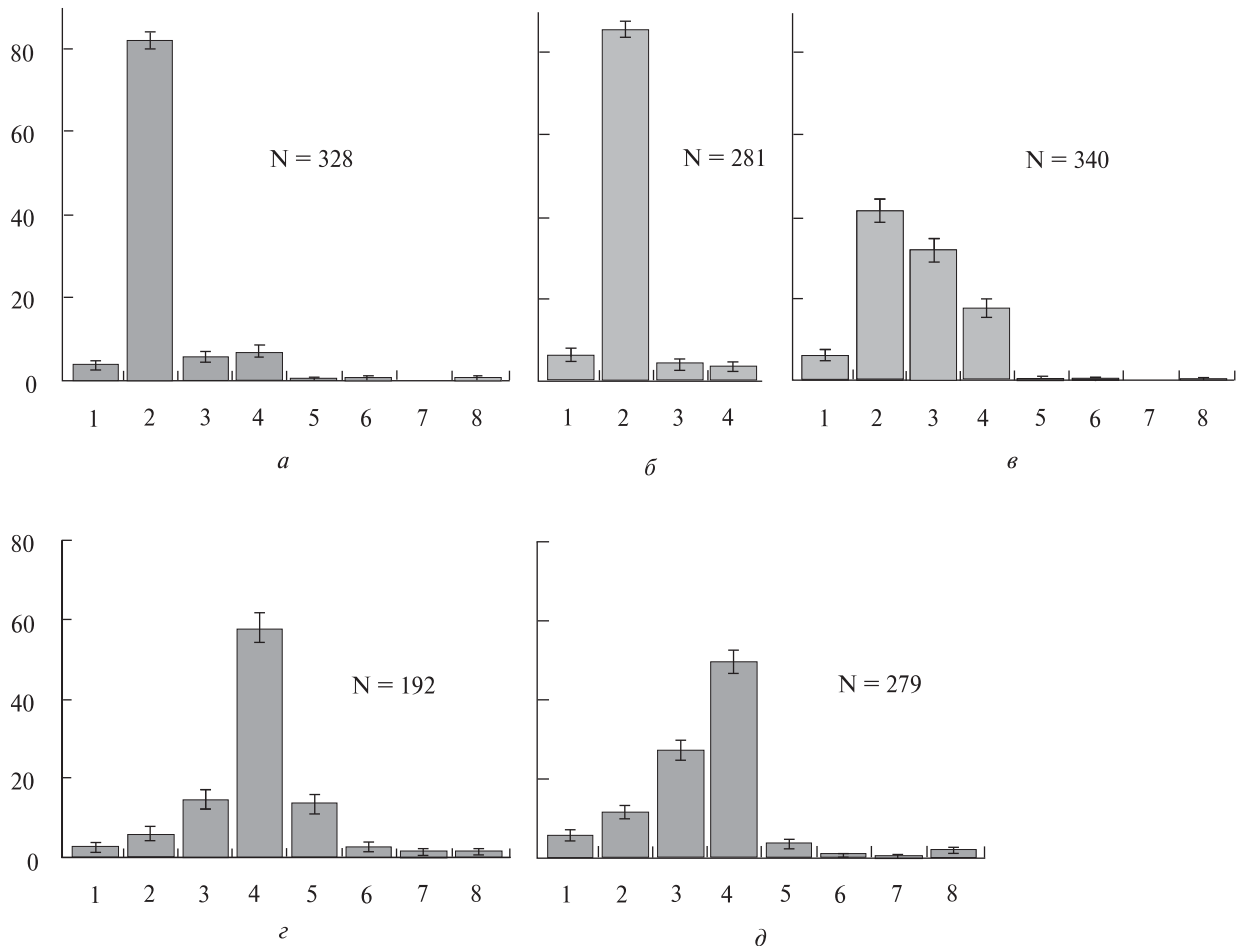


Рис. 3. Распределение по количеству наборов хромосом каллусных линий *U. victoris* при поверхностном выращивании на агаризованных средах: а — линия № 1; б — линия № 9а; в — линия № 3; г — линия № 6; д — линия № 7; по вертикали — метафазы, %; по горизонтали — количество наборов хромосом *n*; N — количество изученных метафаз

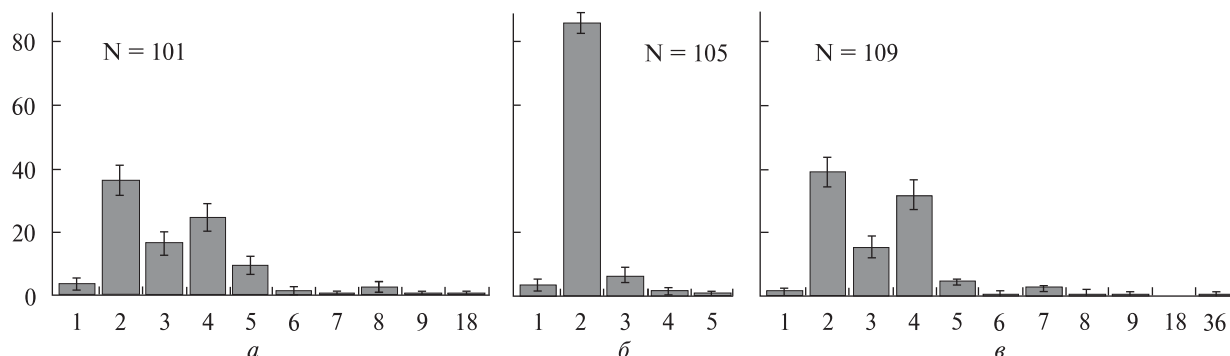


Рис. 4. Распределение по количеству наборов хромосом суспензионных линий *U. victoris*: а – линия № 10; б – линия № 11; в – линия № 12; по вертикали – метафазы, %; по горизонтали – количество наборов хромосом *n*; N – количество изученных метафаз

ном уровне значимости. Несущественно упала и доля модального околотетраплоидного класса. За их счет возросли доли околодиплоидных и околотриплоидных метафаз (на 5- и 0,1%-ном уровнях значимости соответственно).

Несмотря на то, что клеточные линии № 3 и 7 имели подобную историю культивирования, они характеризовались разными модальными классами, но при этом имели и общую черту – одинаковое, достаточно высокое содержание околотриплоидных метафаз.

Гормоннезависимая линия № 9а достоверно не отличалась от линии № 2, доля околодиплоидных митозов у нее составила  $85,8 \pm 2,1$  %. Характерной чертой этой линии был более узкий, чем у остальных линий, размах хромосомных чисел – от гаплоидного до гипертетраплоидного набора.

Еще одна пара, характеризующаяся подобной структурой клеточной популяции – линии № 6 и 7. Модальный класс этих линий составляли тетраплоидные и околотетраплоидные клетки, у обеих линий встречались одиночные гектаплоидные клетки, которые не были характерны для остальных линий. Эта пара линий лишь несколько отличалась по количеству диплоидных, триплоидных и пентаплоидных митозов.

Для изучения влияния условий культивирования (поверхностное выращивание на агаризованных средах или глубинное выращивание в жидких средах того же состава) на плоидность клеточных популяций *U. victoris* были проанализированы хромосомные числа трех суспензионных линий – аналогов каллусных

линий, растущих на агаризованных средах (рис. 4). Проведено сравнение трех пар линий: № 3 и 11, № 6 и 12, № 7 и 10.

Размах хромосомных чисел для линии № 11 составил от гаплоидного до гиперпентаплоидного набора хромосом с диплоидным модальным классом ( $86,7 \pm 3,3$  %). По сравнению с линией-аналогом № 3 в суспензионной линии № 11 значительно повысилась доля околодиплоидных метафаз. Это произошло в основном за счет снижения частот околотри- и околотетраплоидных клеток. В результате соотношение метафаз с разным числом хромосом линии № 11 стало таким же, как у линий № 2 и 9а.

Суспензионные линии № 10 и 12 сформировали практически идентичные по частоте клеток разной плоидности популяции, в которых преобладали околоди-, околотри- и околотетраплоидные метафазы (рис. 4).

У линии № 12 по сравнению с исходной линией № 6 установлено почти семикратное повышение доли диплоидных метафаз. Это произошло за счет уменьшения частоты делений околотетраплоидных, а также околопентаплоидных клеток, однако при этом в митоз вступали клетки и более высокого уровня плоидности (рис. 3 и 4). Подобные изменения зафиксировали и для линии № 10. Частота диплоидных метафаз увеличилась по сравнению с каллусным аналогом – линией № 7 – в 3,2 раза, втрое уменьшилась доля околотетраплоидных митозов, снизились частоты околотри-, околотетра- и околопентаплоидных классов, возрос размах по числу хромосом (рис. 3 и 4).

Наблюдали также наличие в метафазах от 1 до 6 микрохромосом. По доле метафаз с микрохромосомами линии разделились на две группы, достоверно отличающиеся между собой (табл. 2). В первую группу, характеризующуюся более высоким процентом метафаз с микрохромосомами, вошли линии № 6, 10 и 12, а во вторую — пять остальных линий.

У линий № 9а и 11 микрохромосомы были обнаружены в метафазах класса  $2n$ , у линии № 2 —  $2n$  и  $3n$ , у линии № 3 — от  $2n$  до  $4n$ , у линии № 10 — от  $n$  до  $4n$ , у линии № 12 — от  $2n$  до  $5n$  и  $7n$ , у линии № 6 — от  $2n$  до  $6n$  и  $8n$ , т.е. их наблюдали во всех классах пloidности, которые были в достаточной мере представлены в популяции. Исключение составила лишь линия № 7, микрохромосомы которой были присущи исключительно околотетраплоидному классу митозов. Среди всех метафаз, содержащих микрохромосомы, метафазы с одной микрохромосомой составляли наибольшую долю (66,7 %), с двумя — 21,0 %, с тремя — 6,2 %, с четырьмя — 3,7 %, с пятью и шестью — по 1,2 %. Околодиплоидные клетки содержали одну, реже две микрохромосомы, при увеличении пloidности клеток не было выявлено четкой зависимости по увеличению числа микрохромосом на клетку.

Таким образом, при подсчете хромосом были обнаружены значительные отличия структуры клеточных популяций разных каллусных

линий *U. victoris*, полученных от одной луковички. Некоторые из линий обладали сходными соотношениями метафаз разной пloidности, по этому показателю можно выделить четыре группы:

- линии № 2, 9а и 11 с ярко выраженным диплоидным модальным классом;
- линии № 6 и 7 с тетраплоидным модальным классом;
- линии № 10 и 12 с преобладанием диплоидных и тетраплоидных метафаз;
- линия № 3 с преобладанием диплоидного и триплоидного классов.

Несоответствие группирования линий по распределению хромосомных чисел и группирования по питательным средам, на которых они выращиваются, или их истории культивирования свидетельствует о случайном характере установления определенной структуры клеточных популяций линий *U. victoris* и отсутствии заметного влияния на этот процесс состава питательной среды и условий культивирования.

Варьирование числа хромосом в культуре *in vitro* частично может быть привнесено соматическими мутациями и миксопloidией исходных эксплантов [8–11]. Поэтому подобие генетических структур некоторых исследованных линий может быть обусловлено тем, что эти линии были получены из соседних участков луковички, ткани которых могли отличаться по пloidности, подобно тому, как это наблюдали у спаржи аптечной [12]. Однако маловероятно, что исходная генетическая структура могла остаться неизменной в течение столь длительного времени культивирования.

При введении и в процессе культивирования *in vitro* могут возникать изменения числа хромосом, вызванные повреждением веретена деления, ведущим к нерасхождению и отставанию хромосом в анафазе, слиянием веретен деления в двухъядерных клетках, фрагментацией ядер и эндоредупликацией. Изменчивость хромосомных чисел при формировании каллусных штаммов может соответствовать разным типам эволюции: дивергенции, конвергенции и параллельной изменчивости [2, разд. 7, 8], т.е. из одного исходного материала даже в одинаковых условиях могут формироваться цитогенетически отличающиеся штаммы, как это наблюдали, например, у ели евро-

Таблица 2

Относительное количество метафаз с микрохромосомами, количество микрохромосом на метафазу и среднее число хромосом у клеточных линий *U. victoris* ( $2n = 22$ )

№ линии	Метафазы с микрохромосомами, %	Микрохромосом на метафазу, шт.	Среднее число хромосом
I группа			
12	13,8 ± 3,3	1–3	34,7
10	11,9 ± 3,2	1–2	37,2
6	8,3 ± 2,0	1–6	42,8
II группа			
3	3,5 ± 1,0	1–2	28,8
7	2,5 ± 0,9	1–4	37,6
2	2,1 ± 0,8	1–3	24,3
11	1,9 ± 1,3	1–2	22,4
9а	1,4 ± 0,7	1–2	22,3

пейской *Picea abies* (L.) Karst. [13] и лиственницы *Larix decidua* [14]. В то же время при различном исходном уровне ploидности у сахарной свеклы [15] в процессе пассирования начали преобладать клетки одинаковой ploидности. В каждом конкретном случае изменение числа хромосом происходит по специфическому сценарию, вероятно, подверженному влиянию генотипа, физиологического состояния исходного материала, а также состава питательной среды и условий культивирования, прежде всего — наличия в среде фитогормонов, их типа, концентрации и соотношения [2, разд. 7–9].

То, что в нашем исследовании не было выявлено заметного влияния компонентов среды на направленность изменчивости хромосомных чисел, может быть связано с относительно низкими концентрациями использованных в опытах регуляторов роста (кинетин — 0,02–1 мг/л;  $\alpha$ -НУК — 0,5–2 мг/л) или даже их полным отсутствием (среды 5С и 2С). По литературным данным, эти регуляторы роста у других видов растений вызывали существенные геномные изменения лишь в концентрациях, превышающих максимальные концентрации НУК в настоящей работе в 5 раз [16] и кинетина — в 8 раз [17].

Сравнение трех пар каллусных и суспензионных линий позволило проследить влияние способа выращивания на структуру клеточных популяций линий *U. victoris*. Каждая из суспензионных линий отличалась от каллусного аналога более высокой частотой околодиплоидных метафаз, доля же полиплоидных клеток была ниже.

Как правило, подобный тип изменчивости характерен для смены условий культивирования у сформированных миксоплоидных штаммов [2, разд. 8]. При этом на начальных пассажах происходит увеличение доли диплоидных клеток, однако в дальнейшем зачастую восстанавливается исходное соотношение между клетками с разным числом хромосом. В нашем же случае такого восстановления не произошло, хотя линии выращивали в жидкой среде в течение 43 пассажей.

В каллусных и суспензионных линиях *U. victoris* наряду с клетками, содержащими лишь хромосомы обычных размеров, встречались и клетки с микрохромосомами. Возможно, наб-

людаемые микрохромосомы или часть из них можно отнести к так называемым В-хромосомам — добавочным к основному хромосомному набору эгоистичным генетическим элементам с автономным способом наследования, обычно имеющим меньший размер по сравнению с А-хромосомами (хромосомами основного набора) и состоящим из гетерохроматина [18]. Однако без проведения кариотипирования мы не можем с уверенностью говорить о природе обнаруженных микрохромосом.

Количество микрохромосом на метафазу колебалось от одной до шести. Значительно (примерно в десять раз) отличались линии и по доле метафаз с микрохромосомами. Так, линия № 12 содержала  $13,8 \pm 3,3$  % таких метафаз, а линия № 9а — лишь  $1,4 \pm 0,7$  %. Для растений в природе описан подобный характер варьирования количества В-хромосом: клетки отдельной особи могут содержать от 1 до более 30 В-хромосом, количество их может отличаться в клетках и тканях одной особи [18].

Зависимости частоты метафаз с микрохромосомами или количества микрохромосом на метафазу от состава питательной среды или способа культивирования обнаружено не было. Не наблюдали и четкой зависимости указанных параметров от уровня ploидности клеточной линии. Однако обращает на себя внимание тот факт, что линии с диплоидным модальным классом (№ 2, 9а и 11) обладали наименьшей долей метафаз с микрохромосомами. У линий, содержащих значительное количество полиплоидных клеток, частота метафаз с микрохромосомами выше (табл. 2).

**Выводы.** На примере восьми клеточных линий *U. victoris*, полученных от одной луковицы, более девяти лет выращиваемых на питательных средах с различным содержанием органических добавок (регуляторов роста, витаминов и других стимуляторов роста), не установлено влияния компонентов среды на особенности хромосомного полиморфизма клеточных популяций. Отсутствие зависимости уровня ploидности культивируемых клеток от состава питательной среды и условий выращивания (поверхностное или глубинное) можно объяснить дивергентной эволюцией генетической структуры клеточных линий на основе стохастических процессов изменчивости *in vitro*.

Установлено увеличение доли метафаз с диплоидным набором хромосом при переходе с поверхностного на глубинное выращивание.

Авторы выражают признательность канд. биол. наук И.О. Андрееву и канд. биол. наук Е.В. Спиридоновой за критические замечания при подготовке статьи, а также Л.П. Можилевской за предоставление для исследования коллекционных клеточных линий *U. victoris*.

**SUMMARY.** Chromosome numbers of *U. victoris* cell lines obtained from the same bulb and cultured for a long time on different agar-solidified and liquid nutrient media differed significantly. The components of the nutrient media including phytohormones did not influence the ratio of cells with different ploidy levels in various lines while transfer of the calluses to the liquid media resulted in the increase of diploid metaphase frequencies.

**РЕЗЮМЕ.** Отримані від однієї цибулини клітинні лінії *U. victoris*, які тривалий час вирощували на різних за складом агаризованих і рідких середовищах, значно відрізнялися за числом хромосом. Не виявлено впливу компонентів живильних середовищ, у тому числі регуляторів росту, на формування певних співвідношень клітин різної плідності, проте встановлено збільшення частки метафаз із диплоїдним набором хромосом при переведенні калюсу в рідке середовище.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ходжиматов М.* Дикорастущие лекарственные растения Таджикистана. — Душанбе : Гл. науч. ред. Тадж. Сов. Энциклопедии, 1989. — 368 с.
2. *Кунах В.А.* Биотехнология лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 724 с.
3. *Воллосович А.Г., Пучинина Г.М., Николаева Л.А.* Оптимизация состава макроэлементов для культуры тканей *Raiuolfia serpentina* Benth. // Растит. ресурсы. — 1979. — 15, № 4. — С. 516–526.
4. *Кунах В.А., Алпатова Л.К., Можилевська Л.П.* Живильне середовище для одержання і вирощування калюсних тканин рослин : Патент України № 10338А. Опубл. 25.12.96. Бюл. № 4.
5. *Кунах В.А., Можилевская В.А., Потанчук Е.А., Мухоморова В.И., Колонина И.В.* Получение культуры тканей *Ungernia victoris* и ее особенности при выращивании на питательных средах различного состава // Биотехнология. — 2007. — № 1. — С. 14–21.
6. *Кунах В.А., Левенко Б.А.* Модификация метода давлений препаратов для изучения хромосом в клетках культуры тканей растений // Цитология и генетика. — 1975. — 9, № 1. — С. 56–58.
7. *Агапова Н.Д., Архарова К.Б., Вахтина Л.И., Земскова Е.А., Тарвис Л.В.* Числа хромосом цветковых растений флоры СССР: семейства *Aceraceae–Menyanthaceae*. — Ленинград : Наука, 1990. — С. 48.
8. *Menendez-Yuffa A., Da Silva R., Rios L., de Enrech N.* Mitotic aberrations in coffee (*Coffea arabica* cv. 'Catimor') leaf explants and their derived embryogenic calli // Electronic J. Biotechnol. — 2000. — 3, № 2.
9. *Radič S., Proli M., Pavlica M., Pevalek-Kozlina B.* Cytogenetic stability of *Centaurea ragusina* long-term culture // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. — 2005. — 82, № 3. — P. 343–348.
10. *Козыренко Л.М., Артюкова Е.В., Лауве Л.С., Журавлев Ю.Н., Реунова Г.Д.* Генетическая изменчивость каллусных линий женьшеня *Panax ginseng* // Биотехнология. — 2001. — № 1. — С. 19–26.
11. *Козыренко Г.Д., Артюкова Е.В., Лауве Л.С., Болтенков Е.В.* Анализ генетической изменчивости каллусных культур некоторых видов рода *Iris* L. // Биотехнология. — 2002. — № 4. — С. 38–48.
12. *Mishiba K., Tawada K., Mii M.* Ploidy distribution in the explant tissue and the calluses induced during the initial stage of internode segment culture of *Asparagus officinalis* L. // In Vitro Cell. and Dev. Biol. — 2006. — 42, № 1. — P. 83–88.
13. *Fouret J.L., Berger P., Niquet L., Andre P.* Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches // Theor. Appl. Genet. — 1997. — 94. — P. 159–169.
14. *Aderkas P., Pattanavibool R., Hristoforoglu K., Ma Y.* Embryogenesis and genetic stability in long term megagametophytederived cultures of larch // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. — 2003. — 75. — P. 27–34.
15. *Чугункова Т.В., Дубровная О.В.* Цитогенетический анализ каллусных культур и растений-регенерантов, полученных из эксплантов сахарной свеклы различной плідності // Цитология и генетика. — 1998. — 32, № 4. — С. 9–15.
16. *Mishiba K., Okamoto T., Mii M.* Increasing ploidy level in cell suspension cultures of *Doritaenopsis* by exogenous application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid // Physiol. Plant. — 2001. — 112. — P. 142–148.
17. *Mangolin C., Ottoboni L., Machado M.* RAPD markers to evaluate callus tissue of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) maintained in different growth regulator combinations // Biochem. Genet. — 2002. — 40, № 9/10. — P. 351–358.
18. *Camacho J.P.M., Sharbel T.F., Beukeboom L.W.* B-chromosome evolution // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. — 2000. — 355. — P. 163–178.

Поступила 25.10.06