

УДК 582.542.11:57.086.83

КАЛЮСОГЕНЕЗ ТА РЕГЕНЕРАЦІЯ РОСЛИН *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) У КУЛЬТУРІ *in vitro*

О. М. Загрічук¹
А. І. Герці¹
Н. М. Дробик¹
В. А. Кунах²

¹Тернопільський національний педагогічний університет
ім. Володимира Гнатюка, Україна

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

E-mail: zagrichuk_oks@mail.ru, kunakh@imbg.org.ua

Отримано 24.04.2013

Розроблено умови індукції калюсоутворення з корневих і стеблових експлантів та тривалого вирощування культури тканин *Deschampsia antarctica* Desv. Здатність до калюсогенезу залежала від мінерального складу живильного середовища, комбінації концентрацій регуляторів росту, місця зростання рослини-донора і типу експланта. Оптимальним для отримання калюсної тканини було живильне середовище Гамборга, Евелейг — В₅, доповнене 0,9–1 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти та 0,09–0,1 мг/л цитокініну 6-бензиламінопурину. Калюсогенна активність із корневих експлантів значно (в 1,5–2 рази) перевищувала активність зі стеблових. Одержано пагони спонтанним непрямим органогенезом. Виявлено вплив складу живильного середовища та походження калюсу на ефективність регенерації. Вкорінено регенеровані пагони й підібрано умови для росту рослин-регенерантів *in vitro*.

Ключові слова: *Deschampsia antarctica* Desv., калюсогенез, калюсна культура, спонтанна непряма регенерація *in vitro*, рослини-регенеранти.

Щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* Desv. — Poaceae) — один із двох видів судинних рослин, які ростуть в екстремальному кліматі Антарктики й здатні як до вегетативного, так і до генеративного розмноження у цих суворох умовах [1–3].

Ареал *D. antarctica* — північно-західна частина Антарктичного півострова, Південні Шотландські, Фолклендські (Мальвінські) та деякі інші острови Антарктиди, а також Аргентини й Чілі. Рослини цього виду здебільшого трапляються на схилах (20–40 °С), де часто утворюють одну суцільну, неперервну дернину, яка може займати площу до декількох сотень м². Зрідка рослини розвиваються відособлено, формуючи куртину до 1 м завширшки і 25 см заввишки, на рельєфному, кам'янистому морському березі. Загальне проективне покриття рослин *D. antarctica* у ценозах коливається від 10 до 20% [4].

D. antarctica, як й інший вид судинних рослин Антарктики *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl., останнім часом перебувають в епіцентрі наукового інтересу, зумовленого не лише можливостями їх використання, пов'язаними з потеплінням у регіоні, але

й своєю унікальністю як видів, виключне розповсюдження яких у регіоні викликає багато питань [5–10]. Зокрема, вивчали цитогенетичні характеристики, генетичні та молекулярно-біологічні аспекти цього виду в Антарктиці [3, 11–13], вплив на *D. antarctica* ультрафіолетового випромінювання і низьких температур [14, 15], адаптаційні реакції на дію оксидного стресу за екстремальних умов [16], вплив різних компонентів тундрових ценозів на стан та поширення *D. antarctica* [17, 18], виявлення оптимальних місць і умов для існування цього виду [19], мікророзмноження в культурі *in vitro* [20] тощо.

Зважаючи на складність збору достатньої кількості рослинного матеріалу та несприятливість природних умов для проведення експериментальних досліджень, раніше нами введено *D. antarctica* в культуру *in vitro* [21]. Перспективним є поглиблення досліджень у напрямі культивування *D. antarctica in vitro*. Тому метою роботи було розроблення умов для калюсогенезу та аналіз особливостей спонтанного органогенезу з культури тканин.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом були асептичні рослини, одержані нами раніше шляхом пророщування *in vitro* насіння *D. antarctica*, зібраного в 2005–2011 рр. на Аргентинських островах Антарктики (о-ви Галіндез, Скуа, Берселот, Дарбо, Ялур) та мисі Расмуссен. Насіння було зібрано під час експедицій, організованих Національним науковим антарктичним центром України, і надано зимівником І. В. Диким. Пророщування насіння та культивування рослин *in vitro* докладно описано в роботі [21].

Для індукції калюсоутворення використовували експланти завдовжки 5–8 мм з усіх ділянок коренів та стебел *D. antarctica*, висаджуючи їх на живильні середовища: Мурасіге–Скуга (МС) [22], Шенка–Хільдебрандта (ШХ) [23], Гамборга, Евелейг (B_5) [24] та МС і B_5 з половинним вмістом макро- та мікросолей — МС/2 і $B_5/2$, доповнені різними концентраціями цитокініну 6-бензиламінопурину (БАП) і ауксинів 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д) або 1-нафтилоцтової кислоти (НОК). У кожному варіанті досліду застосовували експланти 4–5 рослин.

Відсоток калюсогенезу (ВК) визначали за формулою: $ВК = N_k/N \cdot 100\%$, де ВК — відсоток калюсогенезу, N_k — кількість експлантів, на яких утворився калюс; N — кількість висаджених експлантів.

Підбираючи оптимальні умови для проліферації калюсу, тестували живильні середовища B_5 та МС з різними комбінаціями ауксину БАП і цитокініну 2,4-Д.

Для оцінювання ефективності спонтанної непрямой регенерації пагонів *D. antarctica* визначали такі показники: $ВР = N_r/N \cdot 100\%$, де ВР — відсоток регенерації N_r — кількість калюсних інокулюмів, на яких утворилися регенеранти; N — кількість культивованих калюсних інокулюмів; $СКР = R/N_r$, де СКР — середня кількість регенерантів на один калюсний інокулюм з регенерантами; R — кількість регенерантів; N_r — кількість калюсних інокулюмів, на яких утворилися регенеранти; $ЕР = R/N$, де ЕР — ефективність регенерації; R — кількість регенерантів; N — кількість культивованих калюсних інокулюмів.

Експланти рослин, які використовували для індукції калюсоутворення, й отримані калюсні культури інкубували в темряві за $+22...+22,5$ °С, субкультивування проводили через кожні 3–4 тижні. З появою ознак регенерації калюсні інокулюми з утворени-

ми органогенними структурами переносили в умови освітлення (2–2,5 клк).

Результати досліджень обробляли статистично [25].

Результати та обговорення

Під час культивування *D. antarctica in vitro* встановлено, що стеблові та кореневі експланти рослин *D. antarctica* здатні формувати калюс на середовищах B_5 , $B_5/2$, МС, МС/2 і ШХ, доповнених комбінаціями різних концентрацій 2,4-Д (0,5–1 мг/л) і БАП (0,09–2 мг/л). Перші ознаки індукції калюсоутворення спостерігали через 7–25 дів із часу закладання експериментів. Підбираючи умови калюсогенезу, виявили залежність ефективності утворення та проліферації калюсу від мінерального складу живильного середовища, співвідношення і концентрації регуляторів росту, місця зростання рослини-донора експланта й типу експланта (рис. 1–4).

Залежність калюсогенезу від місця зростання рослини-донора експланта. Серед усіх протестованих зразків процес формування калюсу відбувався на експлантах рослин з островів Галіндез, Ялур, Скуа і Дарбо. Спроби індукувати калюс із рослин

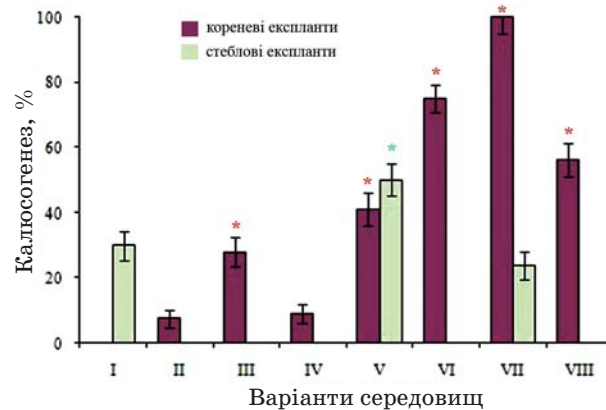


Рис. 1. Частота калюсоутворення (%) з корневих і стеблових експлантів рослин *D. antarctica* з о. Галіндез на різних варіантах живильних середовищ:

- I — МС з 1 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП;
- II — B_5 з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП;
- III — $B_5/2$ з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП;
- IV — B_5 з 1 мг/л 2,4-Д і 0,2 мг/л БАП;
- V — B_5 з 0,9 мг/л 2,4-Д і 0,09 мг/л БАП;
- VI — $B_5/2$ з 0,9 мг/л 2,4-Д і 0,09 мг/л БАП;
- VII — B_5 з 1 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП,
- VIII — B_5 з 2 мг/л НОК і 0,1 мг/л БАП

Примітка. Тут і далі: * — різниця достовірна за $P \leq 0,05$ (кореневі експланти); * — різниця достовірна за $P \leq 0,05$ (стеблові експланти).

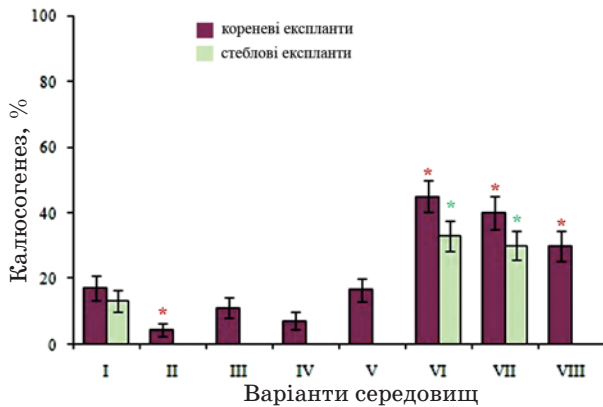


Рис. 2. Частота калусоутворення (%) з корневих і стеблових експлантів рослин *D. antarctica* з о. Дарбо на різних варіантах живильних середовищ:

I — МС з 1 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП;
 II — В₅ з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП;
 III — В₅/2 з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП;
 IV — В₅ з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,2 мг/л БАП;
 V — В₅/2 з 0,9 мг/л 2,4-Д і 0,09 мг/л БАП;
 VI — В₅ з 1 мг/л 2,4-Д і 0,2 мг/л БАП;
 VII — ШХ з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП,
 VIII — В₅ з 1 мг/л НОК і 0,1 мг/л БАП

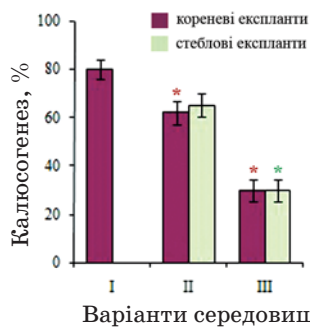


Рис. 4. Частота калусоутворення (%) з корневих і стеблових експлантів рослин *D. antarctica* з о. Ялур на різних варіантах живильних середовищ:

I — МС/2 з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП;
 II — В₅ з 1 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП;
 III — В₅ з 1 мг/л 2,4-Д і 0,2 мг/л БАП

з о. Барселот та мису Расмуссен були невдалими. Найбільшу частоту калусоутворення виявлено у разі тестування корневих і стеблових експлантів рослин з о. Галіндез (32,3%). Деяко нижчою калусогенною активністю (29,7%) характеризувалися експланти від рослин з о. Ялур; ще меншою — з островів Скуа і Дарбо (22,3% і 19% відповідно).

Вплив мінерального складу живильного середовища на калусогенез. Використані живильні середовища ШХ, МС і В₅ характеризувалися різною здатністю індукувати калусоутворення *D. antarctica*. Зокрема, на середовищі ШХ формування калюсу було

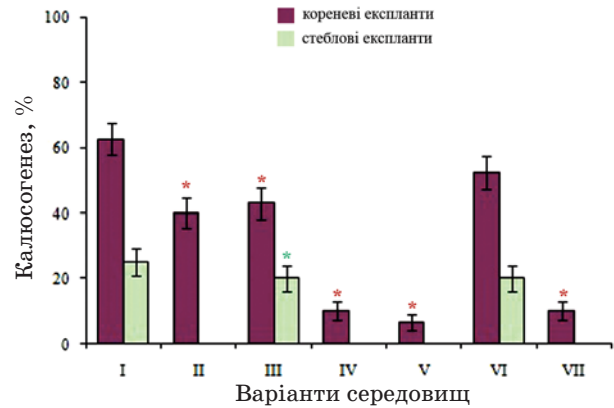


Рис. 3. Частота калусоутворення (%) з корневих і стеблових експлантів рослин *D. antarctica* з о. Скуа на різних варіантах живильних середовищ:

I — В₅ з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП;
 II — В₅ з 0,9 мг/л 2,4-Д і 0,09 мг/л БАП;
 III — В₅ з 1 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП;
 IV — В₅ з 1 мг/л 2,4-Д і 0,2 мг/л БАП;
 V — ШХ з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП;
 VI — ШХ з 0,9 мг/л 2,4-Д і 0,09 мг/л БАП,
 VII — В₅ з 2 мг/л НОК і 0,1 мг/л БАП

результативним лише на корневих і стеблових експлантах рослин з островів Скуа та Дарбо і відбувалося через 10–12 дб. При цьому процес наростання калюсу повільний; відсоток калусоутворення коливався у межах 6,5–52%. Сформований калюс компактний, темно-жовтого кольору; його ріст сповільнений.

Як і в попередньому разі, середовище МС забезпечувало індукцію калусогенезу лише з деяких протестованих зразків — зі стеблових та корневих експлантів рослин з о. Дарбо (13% і 17%) і стеблових — з о. Галіндез (30%). Формування калюсу відбувалося повільно (упродовж 5–6 тижнів); утворена калюсна тканина характеризувалася блідо-жовтим забарвленням та пухкою консистенцією. За подальшого пасажування калюс набував буро-жовтого забарвлення, його структура ущільнювалася, ріст суттєво сповільнювався.

Використання середовища В₅, порівняно з іншими протестованими варіантами, виявилось найефективнішим. На ньому формування калюсу відбувалося з корневих та зі стеблових експлантів через 7–10 дб: відсоток калусогенезу в деяких випадках досягав 100, калюс характеризувався пухкою консистенцією і світло-жовтим забарвленням (рис. 5). Більша ефективність середовища В₅ для калусогенезу *D. antarctica*, ймовірно, зумовлена меншим, порівняно з іншими варіантами протестованих середовищ, вмістом

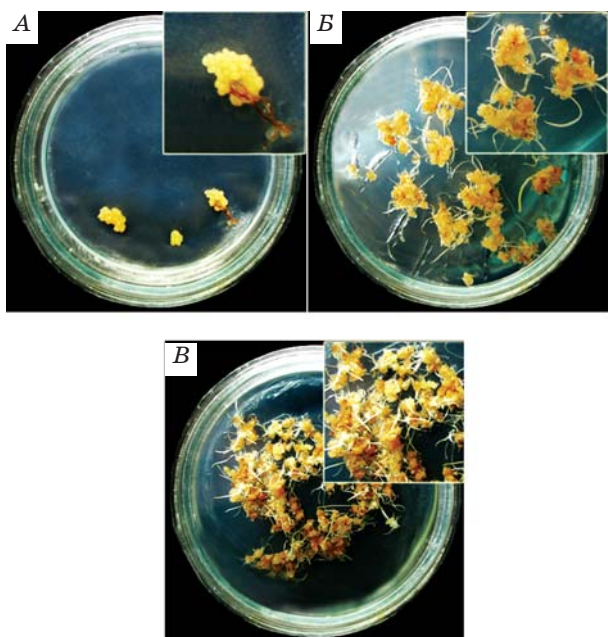


Рис. 5. Утворення та ріст калюсу з корневих експлантів рослин *D. antarctica* (о. Галіндез):
 А — калюсогенез через 7–10 днів (середовище B_5 з 1 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП); ріст калюсу на 13–14-й (Б) та 24–25-й (В) дні (B_5 з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП)

компонентів, що входять до його складу. У природі цей вид росте в умовах нестачі елементів живлення [26], тому серед протестованих середовищ B_5 , очевидно, найбільшою мірою відповідає його трофічним потребам.

Зменшення удвічі концентрації макро- та мікросолей у живильних середовищах забезпечувало формування калюсу лише з корневих експлантів рослин островів Дарбо і Галіндез (середовище $B_5/2$) та Ялур (МС/2). Утворення калюсу відбувалося через 15–18 днів; частота калюсогенезу варіювала у межах 11–80%. Сформований калюс був світло-жовтого забарвлення та пухкої консистенції. За подальшого культивування проліферативна активність калюсу сповільнювалася.

Суттєвий вплив на калюсогенез мало співвідношення і концентрації регуляторів росту 2,4-Д, НОК та БАП у живильному середовищі. Серед усіх протестованих варіантів оптимальною виявилася комбінація 0,9–1,0 мл/л 2,4-Д та 0,09–0,1 мл/л БАП. За таких умов відбувалося формування калюсу як на корневих, так і на стеблових експлантах. При цьому відсоток калюсогенезу усіх досліджених зразків *D. antarctica* коливався від 13% (експланти рослин з о. Дарбо) до 100% (з о. Галіндез) (рис. 1; 2).

Доповнення живильних середовищ 0,5 мг/л 2,4-Д та 0,1 мл/л БАП забезпечува-

ло калюсоутворення з корневих експлантів рослин з островів Дарбо, Галіндез, Скуа та Ялур. За такої комбінації регуляторів росту частота формування калюсу була найменшою з корневих експлантів рослин з о. Дарбо (ВК — 4,3%) і найбільшою (ВК — 80%) — із корневих експлантів рослин з о. Ялур. Збільшення концентрації ауксину вдвічі без змін цитокініну сприяло дедиференціації з корневих (ВК 17–100%) та стеблових (ВК 13–65%) експлантів рослин з островів Галіндез, Дарбо, Ялур та Скуа. З підвищенням концентрації обох регуляторів росту (1 мг/л 2,4-Д та 0,2 мл/л БАП) калюсогенез відбувався з корневих експлантів рослин з островів Скуа, Ялур і Дарбо та із стеблових — островів Дарбо і Ялур (рис. 2–4).

За умови внесення в живильне середовище ауксину НОК у поєднанні з цитокініном БАП формування калюсу відбувалося лише з корневих експлантів рослин з островів Галіндез, Дарбо та Скуа. Через 18–25 діб із часу закладання на ранових поверхнях експлантів формувалася калюс світло-жовтого забарвлення компактною структурою з опущенням. За подальшого культивування калюс набував буро-коричневого забарвлення щільної структури. У разі пересаджування на аналогічне за складом живильне середовище чи середовища, доповнені іншими комбінаціями регуляторів росту, ріст калюсу сповільнювався, він темнів і поступово відмирав.

Залежність калюсогенезу від типу експланта. Здатність до калюсогенезу та його інтенсивність залежали й від типу експланта. З асептичних рослин *D. antarctica*, вирощених із зібраного на островах Дарбо, Галіндез, Скуа та Ялур насіння, нами отримано калюс кореневого і стеблового походження. При цьому відсоток калюсогенезу з корневих експлантів варіював від 4,3% (о. Дарбо) до 100% (о. Галіндез). Формування калюсу стеблового походження було менш інтенсивним: ВК коливався в межах 13–65%. Найбільшою здатністю до калюсоутворення характеризувалися стеблові експланти від рослин з о. Ялур і найменшою — з о. Дарбо.

Отже, на основі отриманих результатів встановлено здатність *D. antarctica* до калюсогенезу. Частота утворення калюсу була найвищою на середовищі B_5 з додаванням 0,9–1 мг/л 2,4-Д і 0,09–0,1 мг/л БАП. Калюсогенна активність із корневих експлантів перевищувала стеблову: середнє значення ВК з корневих експлантів становило 60,4%, із стеблових — 30,9%.

Оптимальним із протестованих середовищ для проліферації калюсу як кореневого, так і стеблового походження було B_5 з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП.

На відміну від одержаних нами результатів, іншими авторами встановлено, що ефективним для індукції калюсоутворення з корневих і стеблових експлантів *D. antarctica* було живильне середовище МС. Водночас, як і в наших дослідженнях, калюсогенез інтенсивно відбувався за умов присутності регуляторів росту 2,4-Д і БАП [20]. Авторами показано, що відсоток калюсогенезу зі збільшенням концентрації 2,4-Д від 2,2 до 9 мкМ та БАП — від 0,2 до 4 мкМ зменшувався від 100% до 58%.

Під час проведення досліджень, спрямованих на індукцію калюсоутворення з експлантів стеблового і кореневого походження рослин з островів Дарбо, Галіндез, Скуа та Ялур, із утвореного калюсу відбувалася спонтанна регенерація пагонів. При цьому органогенез відбувався не лише відразу після індукції калюсної тканини, але й за дальшого її культивування (рис. 5, Б, В).

На різних за складом живильних середовищах перші ознаки регенерації з калюсних тканин від рослин з різних місць зростання спостерігали через 7–10 діб із часу індукції калюсоутворення (рис. 6, А). Через 1–2 тижні з калюсу формувалися пагони завдовжки 4–8 мм. За умов освітлення (2–2,5 клк) упродовж 6–8 діб вони набували зеленого забарвлення (рис. 6, Б); через наступні 15–25 днів пагони доростали до 2–2,5 см і відбувалося формування коренів (завдовжки 3–5 мм) (рис. 6, В). На цьому етапі отримані рослини-регенеранти можна пересаджувати на свіжоприготовлені середовища. Якщо ж рослини-регенеранти не відсаджувати, то вже через 2–3 тижні відбувається суцільне заростання чашки Петрі рослинною біомасою (рис. 6, Г). Це свідчить про підвищену здатність *D. antarctica* до вегетативного розмноження *in vitro*.

Ефективність спонтанної регенерації пагонів залежала від мінерального складу живильного середовища та концентрацій регуляторів росту в ньому, а також від місця зростання рослин-донорів калюсних інокулюмів.

Вплив складу живильного середовища на ефективність регенерації. Спонтанна регенерація відбувалася на живильних середовищах B_5 , МС, МС/2 та ШХ. Органогенез з калюсу як кореневого, так і стеблового походження найчастіше спостерігали на середовищі B_5 з регуляторами росту різних концентрацій — 2,4-Д (0,5–1 мг/л) і БАП (0,09–1 мг/л). Найменш ефективним для

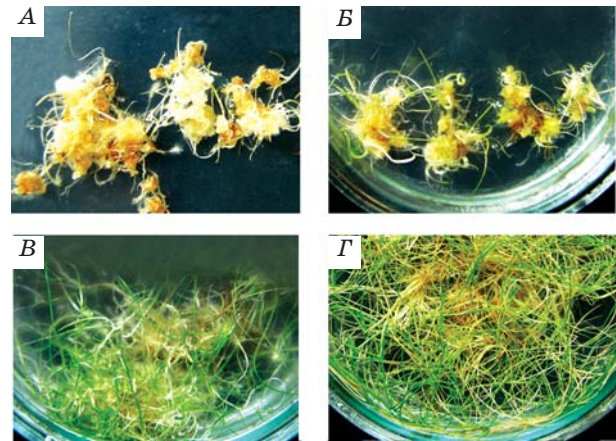


Рис. 6. Спонтанна регенерація пагонів із калюсу кореневого походження від рослин *D. antarctica* (о. Дарбо) на середовищі B_5 , доповненому 0,1 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л БАП:

- А — початок регенерації пагонів із калюсу (через 7–8 днів із часу індукції калюсоутворення);
 Б — ріст регенерантів в умовах освітлення (4–5 тижнів);
 В — формування рослин-регенерантів (6–8 тижнів);
 Г — розростання рослин-регенерантів

регенерації було середовище з комбінацією регуляторів росту 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП. ВР у цьому разі варіював від 37,5% (о. Скуа) до 66,6% (о. Дарбо), середня кількість регенерантів на один інокулюм з регенерантами становила 4,2, а ефективність регенерації — 2,1 регенеранта на інокулюм (рег./інок.). Зі збільшенням у цьому середовищі концентрації ауксину до 0,9 мг/л і за незначного зменшення цитокініну (до 0,09 мг/л) ВР зріс від 38,5% (із калюсу стеблового походження від рослин з о. Дарбо) до 83,3% (зі стеблового калюсу від рослин з о. Галіндез). СКР за такого поєднання регуляторів росту на обох типах калюсних інокулюмів становила 5 рег./інок., а ЕР була найвищою — 3,1 рег./інок. Зі збільшенням концентрації 2,4-Д до 1,0 мг/л без змін концентрації БАП (0,1 мг/л) органогенез проходив лише у двох випадках (із калюсу кореневого і стеблового походження від рослин з о. Скуа) і був достатньо ефективним (таблиця).

Непряма регенерація відбувалася на живильному середовищі МС з 1,0 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП лише з калюсу стеблового походження рослин з о. Скуа (ВР — 54,5%). На середовищі МС/2 за умов зниження концентрації ауксину вдвічі (0,5 мг/л 2,4-Д) без змін концентрації цитокініну (0,1 мг/л БАП) отримано регенеровані пагони з калюсу кореневого походження від рослин з о. Ялур. При цьому ВР становив 55,5%, СКР — 3,4 рег./інок., а ЕР — 1,9 рег./інок. (таблиця).

За культивування калюсу на різних варіантах середовища ШХ спонтанна регенерація відбувалася лише в разі доповнення його 0,9 мг/л 2,4-Д і 0,09 мг/л БАП. Відсоток регенерації коливався від 10% до 50%; показник СКР, порівняно з іншими типами живильних середовищ, був досить високим і в середньому становив 4 рег./інок.

Залежність ефективності регенерації від місця зростання рослин-донорів калюсних інокулюмів. Порівняно високі показники регенераційної здатності виявлено для калюсу від рослин з о. Галіндез (83,3% — з інокулюмів стеблового походження та 60,8% — кореневого походження). СКР для калюсу від рослин цієї популяції на різних

Регенерація пагонів з калюсу кореневого і стеблового походження від рослин *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) на різних живильних середовищах

Місце зростання рослин, живильне середовище	Кількість культивованих інокулюмів, N	Кількість інокулюмів з регенерантами, Nr	Кількість регенерантів, R	Відсоток регенерації ВР, %	СКР, рег./інок. з рег.	ЕР, рег./інок.
Калюс кореневого походження						
о. Галіндез						
В ₅ , 0,9 мг/л 2,4-Д + 0,09 мг/л БАП	23	14	73	60,8±4,9	5,2	3,1
В ₅ , 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП	11	5	17	45,5±5,0*	3,4	1,5
о. Скуа						
В ₅ , 0,9 мг/л 2,4-Д + 0,09 мг/л БАП	13	10	61	76,9±4,2	6,1	4,7
В ₅ , 1,0 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП	12	8	45	66,6±4,7*	5,6	3,8
В ₅ , 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП	8	3	13	37,5±4,8*	4,3	1,6
ШХ, 0,9 мг/л 2,4-Д + 0,09 мг/л БАП	10	1	4	10±3,0*	4	0,4
о. Дарбо						
В ₅ , 0,9 мг/л 2,4-Д + 0,09 мг/л БАП	16	7	36	43,7±3,7	5,1	2,2
В ₅ , 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП	12	8	38	66,6±4,7*	4,8	3,2
о. Ялур						
МС/2, 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП	9	5	17	55,5±5,0	3,4	1,9
Загалом на всіх протестованих середовищах	114	61	304	51,5±5,0	4,7	2,5
Калюс стеблового походження						
о. Галіндез						
ШХ, 0,9 мг/л 2,4-Д + 0,09 мг/л БАП	6	3	9	50±5,0	3	1,5
В ₅ , 0,9 мг/л 2,4-Д + 0,09 мг/л БАП	18	15	61	83,3±3,7**	4,1	3,4
В ₅ , 1,0 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП	14	8	39	57,1±5,0	4,9	2,8
о. Скуа						
В ₅ , 0,9 мг/л 2,4-Д + 0,09 мг/л БАП	10	7	32	70±4,6	4,6	3,2
МС, 1,0 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП	11	6	14	54,5±5,0**	2,3	1,3
о. Дарбо						
В ₅ , 0,9 мг/л 2,4-Д + 0,09 мг/л БАП	13	5	24	38,5±4,9	4,8	1,8
ШХ, 0,9 мг/л 2,4-Д + 0,09 мг/л БАП	10	3	15	30±4,6	5	1,5
Загалом на всіх протестованих середовищах	82	47	194	54,8±5,0	4,1	2,2

Примітки: ВР = Nr/N·100, де ВР — відсоток регенерації; Nr — кількість калюсних інокулюмів, на яких утворилися регенеранти; N — кількість культивованих калюсних інокулюмів;

СКР = R/Nr, де СКР — середня кількість регенерантів на один калюсний інокулюм; R — кількість калюсних інокулюмів; Nr — кількість калюсних інокулюмів, на яких утворилися регенеранти;

ЕР = R/N, де ЕР — ефективність регенерації; R — кількість регенерантів; N — кількість культивованих калюсних інокулюмів.

* — Різниця достовірна за $P \leq 0,05$ (калюс кореневого походження); ** — різниця достовірна за $P \leq 0,05$ (калюс стеблового походження).

варіантах середовищ становила 3–5,2 рег./інок.; ЕР — 1,5–3,4 рег./інок.

Формування регенованих пагонів з калюсу від рослин з о. Скуа також відбувалося доволі інтенсивно, середній ВР для стеблових інокулюмів становив 62,3%, а для корневих — 47,8%. У разі, коли донорами виступали рослини з о. Дарбо, середній ВР з калюсу був нижчим, порівняно з двома наведеними вище варіантами (таблиця). З культури тканин від рослин з о. Ялур спонтанна регенерація відбувалася лише в одному випадку з калюсу кореневого походження.

Регенерація пагонів з калюсу стеблового і кореневого походження. Відсоток регенерації для кореневого калюсу варіював від 10% до 76,9%, а для стеблового — від 30% до 83,3%. Показники СКР з обох типів інокулюмів суттєво не відрізнялися. Діапазон ЕР з калюсу кореневого походження становив 0,4–4,7 рег./інок., а стеблового походження — від 1,5 рег./інок. до 3,4 рег./інок. (таблиця).

Формування регенованих пагонів з культури тканин в усіх наведених вище випадках відбувалося протягом 6–8 тижнів, після чого їх висаджували на живильні середовища відповідного складу, доповнені 0,1–0,2 мг/л кінетину (Кін) або 0,1 мг/л НОК (рис. 7).

Для подальшого росту і розмноження одержаних рослин, що їх культивували на

живильному середовищі з 0,2 мг/л Кін, концентрацію цитокініну зменшували вдвічі.

Порівнюючи морфометричні параметри, одержані з насіння [21] та регеновані з калюсу рослин *D. antarctica*, встановили більшу інтенсивність росту останніх. Розростання та заповнення вегетативною масою рослини усїєї культивативної посудини (висота посудини 12 см, діаметр 10–12 см) у першому разі відбувалося через 5–6 міс, у другому — на 2–2,5 міс швидше. Біомаса рослини, одержаної шляхом пророщування насіння, через 3–3,5 міс культивування може досягати 0,1–0,2 г, а рослини-регенеранта — 1–1,5 г. Крім цього, для рослини-регенеранта коефіцієнт розмноження більший, оскільки сформовану «дернину» (утворену вегетативним розмноженням сукупності особин) через 3–3,5 міс можна поділити на 5–6 частин. Вирощені з насіння рослини через більший проміжок часу — 5–6 міс, можна розділити лише на 2–3 частини.

Отже, на різних за складом живильних середовищах (В₅, МС, МС/2 та ШХ) шляхом спонтанного непрямого органогенезу з калюсу стеблового і кореневого походження (від рослин з островів Дарбо, Галіндез, Скуа та Ялур) нами одержано пагони *D. antarctica*, вкорінено їх і підібрано умови для росту рослин-регенерантів.

Іншими дослідниками за індукції калюсоутворення з надземної частини і коренів *D. antarctica* також виявлено, що на середовищі МС, доповненому регуляторами росту 2,4-Д і БАП, відбувалася регенерація пагонів зі сформованого калюсу. Низькі концентрації регуляторів росту найбільшою мірою сприяли регенерації (відсоток регенерації досягав 99%, середня кількість пагонів у розрахунку на калюсний інокулюм становила 25,4) [20].

Розроблено умови індукції та проліферації калюсу з різних типів експлантів рослин-донорів *D. antarctica* в умовах *in vitro*. Встановлено, що частота калюсогенезу залежала від мінерального і фітогормонального складу живильного середовища, типу експланта та місця зростання рослини-донора. Підібрано ефективний варіант середовища для калюсогенезу — середовище В₅ з додаванням 0,9–1 мг/л 2,4-Д і 0,09–0,1 мг/л БАП. При цьому значення калюсогенної активності з корневих експлантів перевищували такі зі стеблових в 1,5–2 рази. Серед протестованих рослин з різних місць зростання на Аргентинських островах Антарктики (Галіндез, Скуа, Берселот, Дарбо, Ялур) та мисі Расмуссен калюсоутворення най-

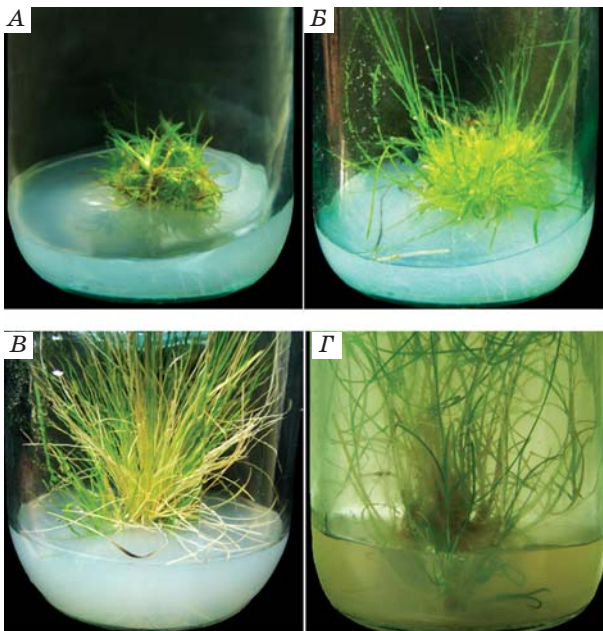


Рис. 7. Ріст та вкорінення регенованих пагонів *D. antarctica* (о. Дарбо): отриманих з калюсу кореневого походження (А); на середовищі В₅, доповненому 0,1 мг/л НОК, через 3–4 (Б), 6–7 (В) та 8–10 (Г) тижнів

більш ефективно відбувалося на експлантах рослин-донорів з о. Галіндез та о. Ялур.

Виявлено здатність *D. antarctica* до спонтанної регенерації пагонів з калюсу під час вирощування в умовах освітлення (2–2,5 клк) на живильних середовищах В₅, МС і ШХ, доповнених регуляторами росту 2,4-Д та БАП. Встановлено залежність ефективності органо-генезу від мінерального складу живильного середовища та концентрацій регуляторів росту в ньому, а також місця зростання рослин-донорів калюсних інокулюмів. Показники ефективності регенерації варіювали від 0,4 до 4,7 регенеранта на інокулюм і були найвищими за культивування калюсу на середовищі В₅, доповненому 0,9 мг/л 2,4-Д та 0,09 мг/л БАП. Ефективність регенерації пагонів з калюсу від рослин з о. Галіндез була вищою (на 30–40%), ніж у інших зразків. Виявлено на

порядок більшу інтенсивність росту регено-рованих з калюсу рослин *D. antarctica* порівняно з рослинами, одержаними шляхом проростання насіння в умовах *in vitro*.

Дослідження виконано за підтримки Національного антарктичного наукового центру Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації України в рамках проекту № Н/3-2011 «Розробка системи біоіндикації кліматичних змін в Прибережній Антарктиці за параметрами динаміки наземних рослинних ценозів» (2011–2012 рр.) та в рамках договору про співпрацю між Інститутом молекулярної біології та генетики НАН України і Тернопільським національним педагогічним університетом ім. Володимира Гнатюка. Висловлюємо подяку зимівникові І. В. Дикому за збір насіння.

ЛІТЕРАТУРА

1. Convey P. Reproduction of Antarctic flowering plants // *Antarctic Sci.* — 1996. — V. 8. — P. 127–134.
2. Alberdi M., Bravo L.A., Gutierrez A., Corcuera L.J. Ecophysiology of Antarctic vascular plants // *Physiol. Plant.* — 2002. — V. 115, N 5. — P. 479–486.
3. Кир'яченко С. С., Козерецька І. А., Ракуса-Суцєвські С. *Deschampsia antarctica*: генетичні та молекулярно-біологічні аспекти поширення в Антарктиці // *Цитологія і генетика.* — 2005. — Т. 39, № 4. — С. 75–80.
4. Zuloaga F. O., Nicora E. G., Rugolo de Agrasar Z. E. et al. Catalogo de la familia Poaceae en la Republica Argentina. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* — 1994. — V. 47. — P. 1–178.
5. Fowbert J. A., Smith R. I. L. Rapid population increases in native vascular plants in the Argentine Islands Antarctic Peninsula // *Arctic Alpine Res.* — 1994. — V. 26, N3. — P. 290–296.
6. Smith R. I. L. Vascular plant as bioindicators of regional warming in Antarctica // *Oecologia.* — 1994. — V. 88. — P. 322–328.
7. Convey P. Maritime Antarctic climate Change Signals from terrestrial biology // *Antarctic Res. Ser.* — 2003. — V. 79. — P. 145–158.
8. Convey P., Smith R. I. L. Responses of terrestrial Antarctic ecosystems to climate change // *Plants and Climate Change. Series: Tasks for vegetation science.* — 2006. — V. 41. — P. 1–12.
9. Day T. A., Ruhland C. T., Xiong F. S. Warming increases aboveground plant biomass and C stocks in vascular-plant-dominated Antarctic tundra // *Global Change Biol.* — 2008. — V. 14. — P. 1827–1843.
10. Torres-Mellado G. A., Jaña R., Casanova-Katny M. A. Antarctic hairgrass expansion in the South Shetland archipelago and Antarctic Peninsula revisited // *Polar Biol.* — 2011. — V. 34. — P. 1679–1688.
11. Андреев И. О., Спиридонова Е. В., Кирьяченко С. С. и др. Популяционно-генетический анализ *Deschampsia antarctica* из двух регионов приморской Антарктики // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16.* — 2010. — № 4. — С. 88–91.
12. Андреев И. О., Волков Р. А., Козерецька І. А. та ін. Географічний градієнт генетичного поліформізму *Deschampsia antarctica* Desv. із прибережної Антарктики // *Укр. антаркт. журн.* — 2011/2012. — № 10–11. — С. 282–288.
13. Parnikoza I., Kozeretska I., Kunakh V. Vascular Plants of the Maritime Antarctic: Origin and Adaptation // *American J. Plant Sci.* — 2011. — N 2. — P. 381–395.
14. Day T. A., Ruhland C. T., Grobe C. W., Xiong F. Growth and reproduction of Antarctic vascular plants in response to warming and UV radiation reductions in the field // *Oecologia.* — 1999. — V. 119. — P. 24–35.
15. Bravo L. A., Griffith M. Characterization of antifreeze activity in Antarctic plants // *J. Exp. Bot.* — 2005. — V. 56. — P. 1189–1196.
16. Таран Н. Ю., Бацманова Л. М., Оканенко О. А. Адаптаційні реакції *Deschampsia antarctica* Desv. за умов Антарктики на дію оксидного стресу // *Укр. ботан. журн.* — 2007. — Т. 64, № 2. — С. 279–289.
17. Дикий І. В., Царик Й. В., Шидловський І. В. та ін. Ценотичні зв'язки біоти суходолу островів західної Антарктики // *Укр. антаркт. журн.* — 2011/2012 — № 10–11. — С. 239–256.
18. Парнікоза І. Ю., Дикий І. В., Іванець В. Ю. та ін. Перенесення складових Антарктичної трав'янистої тундрової формації домініканським мартином в регіоні Аргентинсь-

- ких островів (Прибережна Антарктида) // Тамсамо. — 2011/2012. — № 10–11. — С. 272–281.
19. Parnikoza I., Kozeretska O., Kozeretska I. Is a Translocation of Indigenous Plant Material Successful in the Maritime Antarctic? // Polarforschung. — 2008. — V. 78, N 1–2. — P. 25–27.
 20. Cuba M., Gutierrez-Moraga A., Butendieck B. et al. Micropropagation of *Deschampsia antarctica* — a frost resistant Antarctic plant // Antarctic Sci. — 2005. — V. 17, N 1. — P. 69–70.
 21. Загричук О. М., Дробик Н. М., Козерецька І. А. та ін. Введення в культуру *in vitro* *Deschampsia antarctica* з двох районів прибережної Антарктики // Укр. антаркт. журн. — 2011/2012. — № 10–11. — С. 289–295.
 22. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — V. 15, N 13. — P. 473–497.
 23. Schenk R. U., Hildebrandt A. C. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures // Can. J. Bot. — 1972. — V. 50. — P. 199–204.
 24. Gamborg O. L., Eveleigh D. E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. — 1968. — V. 46, N 5. — P. 417–421.
 25. Лакін Г. Ф. Биометрия: Уч. пособие для биологических специальностей вузов. — М.: Высш. шк., 1980. — 293 с.
 26. Абакумов Е. В., Луначев А. В. Почвенное разнообразие наземных экосистем Антарктики (в районах расположения российских станций) // Укр. антаркт. журн. — 2011/2012. — № 10–11. — С. 222–228.

КАЛЛУСОГЕНЕЗ И РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) В КУЛЬТУРЕ *in vitro*

О. М. Загричук¹, А. И. Герц¹,
Н. М. Дробык¹, В. А. Кунах²

¹Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка, Украина
E-mail: zagrichuk_oks@mail.ru

²Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев
E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Разработаны условия индукции каллусообразования с корневых и стеблевых эксплантов и длительного выращивания культуры тканей *Deschampsia antarctica* Desv. Способность к каллусогенезу зависела от минерального состава питательной среды, комбинации концентраций регуляторов роста, места произрастания растения-донора и типа экспланта. Оптимальной для получения каллусной ткани была питательная среда Гамборга, Эвелейга — В₅, дополненная 0,9–1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 0,09–0,1 мг/л цитокинина 6-бензиламинопурина. Каллусогенная активность с корневых эксплантов значительно (в 1,5–2 раза) превышала активность со стеблевых. Получены побеги путем спонтанного непрямого органогенеза. Выявлено влияние состава питательной среды и происхождения каллуса на эффективность регенерации. Укоренены регенерированные побеги и подобраны условия для роста растений-регенерантов *in vitro*.

Ключевые слова: *Deschampsia antarctica* Desv., каллусогенез, каллусная культура, спонтанная непрякая регенерация *in vitro*, растения-регенеранты.

CALLUS FORMATION AND REGENERATION OF *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) IN CULTURE *in vitro*

О. М. Загричук¹, А. И. Герц¹,
Н. М. Дробык¹, В. А. Кунах²

¹Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine
E-mail: zagrichuk_oks@mail.ru

²Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Conditions for induction of callus formation from root and stem explants and long-term maintenance of *Deschampsia antarctica* Desv. tissue culture have been specified. Ability to callus formation depended on mineral composition of nutrient medium, combination of growth regulator concentrations, place of donor-plant vegetation and type of explant. The optimal for callus tissue generation was Gamborg, Eveleigh — В₅ nutrient medium, supplemented with 0.9–1.0 mg/l 2,4-dichlorophenyl acetic acid and 0.09–0.1 mg/l of cytokinin benzylaminopurine. Callus formation potency from the root explants considerably exceeded (1.5–2 times) that of from stem ones. The shoots were derived through spontaneous indirect organogenesis. Regeneration efficiency was found to be affected by nutrient medium composition and callus origin. Regenerated shoots were rooted and conditions for growth of regenerated plants *in vitro* were specified.

Key words: *Deschampsia antarctica* Desv., callus formation, callus culture, spontaneous indirect regeneration *in vitro*, regenerated plants.