

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ВОЛОДИМИРА ГНАТЮКА
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЗАГРИЧУК ОКСАНА МИХАЙЛІВНА

УДК 575.17:574.1:582.923.1+57.088.7

ДИСЕРТАЦІЯ

**ОТРИМАННЯ КУЛЬТУРИ *IN VITRO* *DESCHAMPSIA*
ANTARCTICA DESV. ТА ЇЇ ФІЗІОЛОГО-ГЕНЕТИЧНЕ ВИВЧЕННЯ**

03.00.20 – біотехнологія (091 Біологія)
09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
(доктора філософії)

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О.М. Загричук

Науковий керівник: Дробик Надія Михайлівна доктор біологічних наук,
професор

Тернопіль, Київ – 2017

АНОТАЦІЯ

Загричук О.М. Отримання культури *in vitro* *Deschampsia antarctica* Desv. та її фізіолого-генетичне вивчення. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія (091 – Біологія). Роботу виконано в Тернопільському національному педагогічному університеті імені Володимира Гнатюка та Інституті молекулярної біології і генетики НАН України.

Захист відбудеться на засіданні спеціалізованої вченої ради К 26.202.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

Тернопіль, Київ, 2017.

Зміст анотації

У роботі узагальнено інформацію про біоекологічні особливості антарктичного екстремофіла щучника антарктичного (*Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae)), ареал та фактори поширення цього виду. Розглянуто особливості адаптації рослин до існування в екстремальних умовах Антарктики, у тому числі за присутності високих концентрацій важких металів, а також особливості впливу кадмію на ріст і розвиток рослин. Проведено аналіз літературних джерел, що стосуються цито- та молекулярно-генетичних досліджень *D. antarctica* та культивування цього виду *in vitro*.

З'ясовано особливості і підібрано умови проростання насіння *D. antarctica in vitro*. Досліджено періодичність проростання насіння, його схожість, залежність цих процесів від різних чинників. Незважаючи на виявлені відмінності, для проростання насіння рослин *D. antarctica* з різних місць зростання встановлено спільні ознаки: доцільність використання для стерилізації пероксиду гідрогену, відсоток асептичного насіння у всіх випадках складав 98–100 %; ефективність порушення спокою насіння дією

низьких позитивних температур (2–4 °C) та обробкою гіберелової кислоти; проростання насіння в умовах освітлення. Розроблено спосіб отримання вихідного асептичного матеріалу для біотехнологічних досліджень *D. antarctica*, що полягав у стерилізації і пророщуванні *in vitro* стратифікованого насіння. Спосіб дозволяє одержувати впродовж усього року життєздатні морфологічно нормальні проростки цього виду.

Встановлено, що для мікроклонального розмноження *D. antarctica* оптимальним серед протестованих було агаризоване живильне середовище Гамборга, Евелейг (B5), доповнене 0,2 мг/л кінетину. Ефективним способом мікроклонування є відокремлення утворених на дернині пагонів.

Розроблено умови індукції калюсоутворення з корневих і пагонових експлантів та тривалого вирощування культури тканин *D. antarctica*. Здатність до калюсогенезу залежала від мінерального складу живильного середовища, комбінації концентрацій регуляторів росту, місця зростання рослини-донора та типу експланта. Оптимальним для отримання калюсної тканини було живильне середовище B5, доповнене 0,9–1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) і 0,09–0,1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП). Калюсогенна активність із корневих експлантів значно перевищувала (в 1,5–2 рази) таку з пагонових. Отримано пагони шляхом спонтанного непрямого органогенезу. Виявлено вплив складу живильного середовища та походження калюсу на ефективність регенерації. Вкорінено регенеровані пагони та підібрано умови для росту рослин-регенерантів *in vitro*.

З метою встановлення придатності розробленої методики мікроклонального розмноження досліджено клональне потомство рослин, які відрізнялися за молекулярно-генетичними маркерами та цитогенетичними характеристиками. Порівняльний аналіз рослин на початкових етапах розмноження (1–6-й пасажі) та за тривалого культивування *in vitro* (24–26-й пасаж та більше) не виявив генетичних відмінностей між клонами спільного походження та вихідним генотипом за ISSR-маркерами (inter simple sequence

repeats-маркерами). Аналіз тривало культивованих рослин (49–79-й пасажі) показав також збереження їх цитогенетичних характеристик.

У цілому, отримані результати свідчать, що розроблена методика забезпечує збереження генетичних характеристик *D. antarctica* в процесі тривалого культивування *in vitro* і може бути використана для отримання генетично однорідного рослинного матеріалу.

Досліджено вплив різних концентрацій йонів Кадмію на фізіологічні та молекулярно-генетичні характеристики *D. antarctica*. З цією метою використано генетично однорідні, отримані мікроклональним розмноженням рослини.

При вивченні впливу широкого діапазону концентрацій йонів Кадмію (0,1–20 мМ) на культивовані *in vitro* рослини *D. antarctica* з'ясовано, що граничною концентрацією, за якої ще відбувається ріст і розвиток рослин, є 1 мМ. На живильних середовищах з вмістом Cd^{2+} 0,1–1 мМ упродовж 3–4 тижнів відбувається поступова адаптація рослин до існування в присутності токсиканта. За вищих концентрацій Cd^{2+} рослини гинули через 3 тижні (5–20 мМ Cd^{2+}) або 4 тижні (1,5–5 мМ Cd^{2+}).

Встановлено, що типовими наслідками впливу йонів Кадмію на культивовані *in vitro* рослини *D. antarctica* були: пригнічення росту коренів і надземної частини, зменшення приросту біомаси, хлороз пагонів, згортання пагонів у трубочки, ослизнення коренів, їх почорніння та відмирання, утворення непрозорої рідини у місцях контакту пагонів із середовищем з високим вмістом йонів Кадмію.

Проаналізовано поглинання йонів Cd^{2+} рослинами *D. antarctica* з островів Галіндез та Великий Ялур упродовж 7, 14, 21, 28 та 35 діб культивування *in vitro* у живильному середовищі з різними концентраціями йонів Cd^{2+} . Суттєвих відмінностей щодо його акумулювання культивованими *in vitro* рослинами з цих локалітетів не виявлено. В обох випадках за впливу різних концентрацій йонів Кадмію основна його кількість накопичується впродовж перших семи діб культивування на середовищі з металом.

При дослідженні впливу йонів Кадмію на генетичні параметри культивованих *in vitro* рослин *D. antarctica* встановлено, що концентрації 0,1 та 0,2 мМ не викликають змін спектрів ПЛР-продуктів. За культивування рослин упродовж 17 діб з концентрацією 0,2–1 мМ Cd^{2+} зміни в спектрах ПЛР-продуктів спостерігали при концентраціях токсиканта вище 0,4 мМ; кількість змін зростала залежно від його вмісту. Після довготривалої (140–265 діб) дії йонів Кадмію в порівняно невисоких концентраціях 0,1 мМ та 0,4 мМ змін геному не виявлено.

Отримані нами результати свідчать про стійкість *D. antarctica* до йонів Кадмію, порівняно із іншими судинними рослинами, дані відносно яких представлені в науковій літературі. Можна припустити дві причини стійкості *D. antarctica* до кадмію: 1) у цієї рослини внаслідок адаптації до існування в жорстоких умовах Антарктики сформувались комплексні механізми стійкості до різних екстремальних впливів, таких як холод, посуха, засолення, УФ-опромінення, які можуть забезпечувати також і неспецифічну толерантність до шкідливого впливу важких металів (ВМ); 2) формування стійкості до важких металів можна розглядати як результат адаптації *D. antarctica* до підвищеного вмісту важких металів у ґрунтах окремих ділянок островів Західної Антарктики.

Таким чином, у результаті проведених досліджень нами розроблено ефективні технології культивування *D. antarctica in vitro*. Зокрема, розроблено умови проростання насіння, мікроклонального розмноження, а також індукції калюсоутворення з різних типів експлантів та тривалого вирощування культури тканин *D. antarctica*; шляхом спонтанного непрямого органогенезу *in vitro* отримано пагони, підібрано умови для їх вкорінення і росту рослин-регенерантів. На основі проведених молекулярно-генетичних та цитогенетичних досліджень мікроклонально розмножених рослин *D. antarctica* встановлено збереження ними генетичної стабільності у процесі тривалого культивування *in vitro*. Ці результати свідчать про можливість та доцільність використання розробленого нами способу отримання рослин

D. antarctica мікроклональним розмноженням *in vitro*. За відсутності достатньої кількості рослинного матеріалу через віддаленість Антарктики цей спосіб надає можливість клонування рослин з стабільними генетичними характеристиками для подальшого їх використання в модельних експериментах.

На прикладі дослідження впливу йонів Кадмію на фізіологічні та генетичні параметри рослин *D. antarctica in vitro* зроблено висновок про придатність розробленої експериментальної модельної системи культивування *in vitro* для різнопланових досліджень цієї антарктичної вищої судинної рослини.

Ключові слова: *Deschampsia antarctica* Desv., культивування *in vitro*, мікроклональне розмноження, калюсні культури, регенерація *in vitro*, цитогенетичний аналіз, ПЛР-аналіз, геномна мінливість, йони Кадмію, накопичення, мутагенний ефект.

ANNOTATION

Zahrychuk O.M. Production and Physiogenetic Study of *in vitro Deschampsia antarctica* Desv. Culture – Qualification scientific work (Manuscript)

Dissertation for a degree of the Candidate of Biological Sciences (Ph.D) in specialty 03.00.20 – Biotechnology (091 – Biology). The study has been performed at V. Hnatyuk Ternopil National Teachers' Training University and the Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences, Ukraine.

Defence of the thesis is to be held at the meeting of specialized academic council K 26.202.01 at the Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences, Ukraine.

Ternopil, Kyiv, 2017.

Annotation

The study contains generalized information on bioecological specifics of antarctic extremophile lime grass (*Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae)), as

well as on its natural habitat and distribution factors. Peculiarities of adaptation to antarctic extreme conditions, including high heavy metal concentrations and specifics of cadmium effect on the plants' growth, have been considered. Sources of information about cytological, molecular and genetic research of *D. antarctica* and its *in vitro* cultivation have been analyzed.

Specifics and conditions of *D. antarctica* seeds *in vitro* germination have been found out, and germination periodicity, as well as dependence on various factors have been researched. Despite certain differences, common characteristics for the germination of *D. antarctica* from different vegetation areas have been found, such as reasonability for the use of hydrogen peroxide as a sterilizer, 98–100 % of aseptic seeds; efficacy of disturbing seeds by low temperatures (2–4°C) and by gibberellic acid; germination under lighting. A method of producing original aseptic material for *D. antarctica* biotechnologic research, specifically sterilization and germination of stratified seeds *in vitro*, has been developed. The method makes possible to produce morphologically normal and viable plantlets throughout the year.

Agaric nutrient medium B5, supplemented by 0.2 mg/l kinetine has been found optimal for *D. antarctica* microclonal reproduction. Sod fragmentation proved to be an effective way of microcloning.

Preconditions for callus formation of root and caulescent explants and lasting growth of *D. antarctica* tissue culture have been developed. Capacity for callus genesis depends on the mineral composition of the nutrient medium, as well as on the growth regulator concentrations' combination, site of donor plant growth and explant type. Nutrient medium B5, supplemented by 0.9–1 mg/l 2.4-D and 0.09–0.1 mg/l BAP have been found optimal for producing callus tissue. Callus genesis activity of root explants was found to be 1.5–2 times as much as the one of caulescent explants. Sprouts have been produced through spontaneous indirect organogenesis. The relation between the composition of nutrient medium and callus origin on the regeneration efficiency has been established. Regenerated

sprouts have been implanted and conditions for the growth of regenerant plants *in vitro* have been selected.

To establish the aptitude of the new methods of microclonal reproduction, a clonal breed of plants, differing in molecular-genetic markers and cytogenetic characteristics has been studied. Comparative analysis of plants at the initial stages of reproduction (passages 1–6) and under lasting cultivation *in vitro* (passages 24–26 and more) found no genetic differences in ISSR-markers between the clones of common origin and original genotype. Besides, analysis of long-cultivated plants (passages 49–79) revealed preservation of their cytogenetic characteristics.

On the whole, our findings indicate that newly-developed methods provide maintenance of *D. antarctica* genetic characteristics in the process of lasting cultivation *in vitro* and can be used for the production of genetically homogenous vegetable material.

The effect of various cadmium ion concentrations on physiologic and molecular-genetic characteristics of *D. antarctica* was studied with the use of genetically homogenous plants which had been grown through microclonal reproduction.

The study of the effect of various concentrations of Cd ions (0.1–20 mM) on *in vitro* – cultivated *D. antarctica* plants established 1 mM as an ultimate possible concentration for the plants' growth and development. In the nutrient medium with Cd^{2+} 0.1–1 mM, gradual adaptation to a toxicant occurs within 3–4 weeks, whereas higher Cd^{2+} concentrations lead to the death of vegetation in 3 (5–20 mM Cd^{2+}) or 4 weeks (1.5–5 mM Cd^{2+}).

Inhibition of root and stem growth, decreased biomass increment, body chlorosis, rolling up, as well as slimy roots along with their blackening and fading away, formation of nontransparent liquid at the sites of plantlets bordering on the medium of high Cd ions content have been found to be the typical aftermath of Cd ions effect on *in vitro* – cultivated *D. antarctica* vegetation.

Cd^{2+} ions absorption by *D. antarctica* plants from Galindez and Great Yalour islands throughout 7, 14, 21, 28 and 35 days of cultivation *in vitro* in the nutrient

medium with different Cd^{2+} ions concentration has been studied. No significant difference as to cadmium accumulation by *in vitro* cultivated plants from these localities has been found. In either case, under effect of various cadmium ions concentrations the most of it is accumulated within first 7 days of cultivation on the metal medium.

Research of cadmium ions effect on genetic parameters of *in vitro* cultivated *D. antarctica* vegetation has shown that 0.1 and 0.2 mM concentrations would not cause changes in PCR-products' specters. When cultivated throughout 17 days at 0.2–1 mM Cd^{2+} concentration, changes in PCR-products' specters were observed at the toxicant concentration above 0.4 mM, the number of changes being concentration-dependent. Long-lasting (140–265 days) effect of cadmium ions at comparatively low concentrations (0.1 mM and 0.4 mM) would not cause appreciable genome changes.

Our findings are indicative of *D. antarctica* resistance to cadmium ions as compared to the other vascular plants, cited in scientific sources. Two major reasons of this resistance may be assumed: 1) owing to adaptation to severe Antarctic conditions the plant eventually formed complex resistance mechanisms to extreme factors, such as cold, drought, salinization, UV irradiation. The mechanisms can also provide non-specific tolerance to the adverse effect of heavy metals; 2) formed resistance to heavy metals may be regarded as a result of *D. antarctica* adaptation to the increased content of heavy metals in the soil of some West Antarctic island areas.

Thus, on the basis of our research we have developed efficient techniques of *D. antarctica* cultivation *in vitro*. In particular, conditions of germination, microclonal reproduction, as well as of induced callus formation from different explant types and long-lasting growth of *D. antarctica* tissue culture have been established; through spontaneous indirect organogenesis *in vitro* sprouts have been obtained and conditions for their radication and growth of regenerant plants have been established. Basing on molecular-genetic and cytogenetic research of microclonally reproduced *D. antarctica* plants, their maintained genetic stability in

long-lasting *in vitro* cultivation has been established. Our findings are indicative of the possible production of *D. antarctica* plants through microclonal reproduction *in vitro*. Considering remoteness of the Antarctic and, therefore, scarce of the vegetation material, this method makes possible cloning plants with stable genetic characteristics for their further use in model tests.

Researched effect of cadmium ions on physiologic and genetic parameters of *D. antarctica* plants *in vitro* taken as an example, applicability of the suggested experimental system of cultivation *in vitro* for diverse research of this higher Antarctic vascular plant is concluded.

Key words: *Deschampsia antarctica* Desv., *in vitro* cultivation, microclonal propagation, callus cultures, *in vitro* regeneration, cytogenetic analysis, PCR analysis, genome variability, cadmium ions, accumulation, mutagenic effect.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. Введення в культуру *in vitro* *Deschampsia antarctica* з двох районів Прибережної Антарктики / **О.М. Загричук**, Н. М. Дробик, І. А. Козерецька, І.Ю. Панікоза, В. А. Кунах // Український антарктичний журнал – 2011/2012. – № 10–11. – С. 289–295.
2. Калюсогенез та регенерація рослин *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) в культурі *in vitro* / **О.М. Загричук**, А.І. Герц, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // Biotechnologia Acta. – 2013. – Vol. 6. – Р. 77–85.
3. Цитогенетичний аналіз рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з Прибережної Антарктики / Д.О. Навроцька, М.О. Твардовська, І.О. Андреев, **О.М. Загричук**, І.Ю. Парнікоза, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 184–190.
4. New forms of chromosome polymorphism in *Deschampsia antarctica* Desv. from the argentine islands of the maritime antarctic region / D.O. Navrotska, M.O. Twardovska, I.O. Andreev, I.Yu. Parnikoza, A.A. Betekhtin, **О.М. Zahrychuk**, N.M. Drobyk, R. Hasterok, V.A. Kunakh // Український

антарктичний журнал – 2014. – № 13. – С. 185–191.

5. Генетична стабільність отриманих мікроклональним розмноженням рослин *Deschampsia antarctica* Desv. за тривалого культивування *in vitro* / К.В. Спірідонова, І.О. Андреев, **О.М. Загричук**, Д.О. Навроцька, М.О. Твардовська, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // Фізіологія рослин і генетика. – 2016. – Т.48, №6. – С. 498–507.

6. Підвищена стійкість *Deschampsia antarctica* Desv. до мутагенної дії іонів кадмію / К.В. Спірідонова, І.О. Андреев, **О.М. Загричук**, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2016. – Т. 14, № 1. – С. 63–71.

7. **Загричук О.М.** *Deschampsia antarctica* Desv.: характеристика виду, його поширення та особливості адаптації до існування в умовах Антарктики / **О.М. Загричук**, Н.М. Дробик // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. – 2016. – № 1 (65). – С. 135–145.

8. Особливості накопичення кадмію в культивованих *in vitro* рослинах *Deschampsia antarctica* Desv. / **О.М. Загричук**, В.О. Хоменчук, Г.Б. Гуменюк, Н.М. Дробик // XXVIII Всеукраїнська наукова інтернет-конференція «Вітчизняна наука на зламі епох: проблеми та перспективи розвитку». – Переяслав-Хмельницький. – 2016. – С. 9–11.

9. Введення в культуру *in vitro* *Deschampsia antarctica* з двох районів Прибережної Антарктики / **О.М. Загричук**, Н.М. Дробик, І.А. Козерецька, І.Ю. Панікоза, В.А. Кунах // Матеріали V Міжнародної Антарктичної конференції Антарктика і глобальні системи Землі: нові виклики та перспективи, 17–19 травня 2011. – Київ, 2011. – С. 209–211.

10. Дослідження впливу іонів кадмію на ріст рослин *Deschampsia antarctica* Desv. *in vitro* / **О.М. Загричук**, Т.В. Гарбуз, В.Б. Чеховська, Н.М. Дробик // Сучасні досягнення екології та їх імплементація у природничу освіту: матеріали науково-методичного семінару, 24 квітня 2014 року. – Тернопіль, 2014. – С. 18.

11. Особенности культивирования *in vitro* *Deschampsia antarctica* Desv. с разных мест произрастания в прибрежной Антарктике / **О.М. Загричук**, Н.М. Дробык, И.Ю. Парникоза, И.А. Козерецкая, В.А. Кунах // Материалы VI Международной научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)», 12 – 17 октября 2014 г.: тезисы докл. – Ялта, 2014. – С. 26–27.

12. Особливості введення в культуру *in vitro* рослин *Deschampsia antarctica* Desv. та вплив різних концентрацій йонів кадмію на їх ріст // **О.М. Загричук**, Г.Б. Гуменюк, Т.В. Гарбуз, В.Б. Чеховська, Н.М. Дробик // Концепція сталого розвитку та її реалізація в освіті: матеріали науково-практичної конференції, присвяченої 75-річчю ТНПУ імені Володимира Гнатюка та хіміко-біологічного факультету, 16–18 квітня 2015 р. – Тернопіль, 2015. – С. 36–37.

13. **Загричук О.М.** Оценка влияния ионов Кадмия на рост и развитие растений *Deschampsia antarctica* Desv. *in vitro* / **О.М. Загричук**, И.Ю. Парникоза, Н.М. Дробик // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: VIII съезд общества физиологов растений России (Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых), 21–26 сентября 2015 г.: тезисы докл. – Петрозаводск, 2015. – С. 199.

14. **Загричук О.М.** Особливості прямого та непрямого органогенезу *Deschampsia antarctica* Desv. *in vitro* / **О.М. Загричук**, Д.М. Семенюк, Н.М. Дробик // Тернопільські біологічні читання – Ternopil bioscience – 2017: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 20-річчю заснування наукового фахового видання України «Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія Біологія», 20–22 квітня 2017 р. – Тернопіль, 2017. – С. 250–254.

15. Цито- та молекулярно-генетичні дослідження отриманих мікроклональним розмноженням рослин *Deschampsia antarctica* Desv. за тривалого культивування *in vitro* / К.В. Спірідонова, І.О. Андрєєв, Д.О. Навроцька, **О.М. Загричук**, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // VIII Міжнародна Антарктична Конференція, присвячена 25-ій річниці приєднання України до Договору про Антарктику (17 вересня 1992 р.), 16–18 травня 2017 р. – Київ, 2017. – С. 98–99.

16. Генотоксичні концентрації кадмію для антарктичного екстремофіла *Deschampsia antarctica* Ё. Desv. / **О.М. Загричук**, К.В. Спірідонова, І.О. Андрєєв, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // VIII Міжнародна Антарктична Конференція, присвячена 25-ій річниці приєднання України до Договору про Антарктику (17 вересня 1992 р.), 16–18 травня 2017 р. – Київ, 2017. – С. 56–58.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	16
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1.....	26
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	26
1.1. Біоекологічні особливості та адаптація виду <i>D. antarctica</i> до існування в екстремальних умовах Антарктики.....	26
1.1.1. Анатомо-морфологічна та ботанічна характеристика виду.	26
1.1.2. Ареал та фактори поширення <i>D. antarctica</i>	30
1.1.3. Ріст і розвиток за низьких температур.....	36
1.1.4. Стійкість до світлового стресу та ультрафіолетового випромінювання.	39
1.2. Важкі метали як забруднюючий чинник в умовах Антарктики	42
1.2.1. Важкі метали в умовах Антарктики.	43
1.2.2. Вплив кадмію на ріст і розвиток рослин.	44
1.3. Цито- та молекулярно-генетичні дослідження <i>D. antarctica</i>	46
1.4. Отримання та дослідження культури <i>in vitro D. antarctica</i>	51
РОЗДІЛ 2.....	56
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	56
2.1. Рослинний матеріал	56
2.2. Характеристика використаних у роботі реактивів	57
2.3. Культивування <i>in vitro</i>	58
2.3.1. Отримання асептичних проростків.	58
2.3.2. Умови вегетативного розмноження.	58
2.3.3. Отримання калюсних культур та підбір умов для їхньої проліферації	59
2.4. Дослідження впливу йонів Кадмію на рослини <i>D. antarctica in vitro</i>	60
2.4.1. Влив кадмію на ріст рослин.	60
2.4.2. Накопичення йонів Кадмію у рослинах.....	61
2.5. Цито- та молекулярно-генетичні дослідження <i>D. antarctica</i>	62

2.5.1. Виділення ДНК із рослинного матеріалу.....	62
2.5.2. Ампліфікація ДНК методом ПЛР з використанням ISSR- та IRAP-маркерів.....	63
2.5.3. Електрофорез ДНК в агарозному гелі.....	65
2.5.4. Цитогенетичний аналіз.....	66
2.6. Статистичні методи обробки результатів досліджень.....	67
РОЗДІЛ 3.....	68
КУЛЬТИВУВАННЯ <i>D. ANTARCTICA IN VITRO</i>	68
3.1. Індукція проростання насіння.....	68
3.1.1. Річна (сезонна) динаміка проростання насіння.....	68
3.1.2. Особливості проростання насіння рослин з різних локалітетів.....	71
3.2. Мікроклональне розмноження.....	73
3.3. Індукція та проліферація калюсу.....	76
3.4. Регенерація рослин.....	84
РОЗДІЛ 4.....	93
ГЕНЕТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ОТРИМАНИХ МІКРОКЛОНАЛЬНИМ РОЗМНОЖЕННЯМ РОСЛИН <i>D. ANTARCTICA</i>.....	93
РОЗДІЛ 5.....	102
ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЙОНІВ КАДМІЮ НА РОСЛИНИ <i>D. ANTARCTICA IN VITRO</i>	102
5.1. Вплив йонів Кадмію на ріст рослин.....	103
5.2. Накопичення кадмію у рослинах з різних локалітетів.....	107
5.3. Мутагенна дія йонів Кадмію на отримані мікроклональним розмноженням рослини	115
РОЗДІЛ 6.....	125
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	125
ВИСНОВКИ	132
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	134
ДОДАТКИ.....	168

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

2,4-Д	–	2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота
БАП	–	6-бензиламінопурин
ВМ	–	важкі (-ий) метали
ВР	–	відсоток регенерації
ГК ₃	–	гіберелова кислота
ДНК	–	дезоксирибонуклеїнова кислота
ЕР	–	ефективність регенерації
ІОК	–	індолілоцтова кислота
ІР	–	індекс росту
ІМБіГ НАН України – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України		
Кін	–	6-фурфуриламінопурин (кінетин)
МС	–	живильне середовище Мурасіге–Скуга
МС/2	–	живильне середовище Мурасіге–Скуга з половинним вмістом макро- та мікроелементів
H ₂ O ₂	–	пероксид гідрогену
НОК	–	1-нафтилоцтова кислота
о.	–	острів
СКР	–	середня кількість регенерантів на один калюсний інокулюм
ТНПУ	–	Тернопільський національний педагогічний університет
УФ	–	ультрафіолетове випромінювання
ШХ	–	живильне середовище Шенка–Хільдебрандта
ПЛР	–	полімеразна ланцюгова реакція
об/хв	–	оберти за хвилину
В5	–	живильне середовище Гамборга, Евелейг
В5/2	–	живильне середовище В5 з половинним вмістом макро- та мікросолей

- СТАБ – (cetyl trimethyl ammonium bromide) цетил-триметил-амоніум-бромід
- DAPI – (4,6-динамідино-2-феніліндол дигідрохлорид)
- IRAP – (inter-retransposon amplified polymorphism) поліморфізм ампліфікованих послідовностей між ретротранспозонами
- ISSR – (inter simple sequence repeats) поліморфізм фланкованих інвертованими повторами мікросателітних локусів ДНК
- NADH – (nicotinamide adenine dinucleotide) нікотинамідаденіндинуклеотид – кофермент
- RAPD – (random amplification of polymorphic DNA) поліморфізм довільно ампліфікованої ДНК

ВСТУП

Актуальність теми. Антарктида – найхолодніша і важко доступна полярна область Землі. Близько 98 % материка знаходиться під товстим шаром льоду [120, 150, 184, 271]. Прибережні антарктичні екосистеми функціонують за домінування сильно обмежуючих факторів навколишнього середовища (шквальні вітри, низька температура та вологість повітря, високий рівень сонячної радіації) [59, 122, 168, 184].

Щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae)) – один з двох видів судинних рослин, що ростуть на західному узбережжі Антарктичного півострова та прилеглих до нього островах [4, 155, 211, 239]. Генетична й біохімічна обумовленість таких ознак, як морозостійкість, стійкість до світлового стресу, високий рівень фотосинтезу за низьких температур та можливість існування в умовах підвищеної ультрафіолетової радіації робить цей вид надзвичайно цікавим об'єктом для дослідження, особливо зважаючи на його здатність не лише вегетувати, а й вільно розмножуватись у цих суворих умовах Антарктики [38, 168, 184, 222, 232]. До цього часу дискусійним залишається питання походження *D. antarctica* та іншої поширеної в Антарктиді вищої судинної рослини колобантуса кіто (*Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl.), оскільки остаточно не встановлено, чи ці види є реліктами, чи занесені в Антарктиду [155, 234, 239, 267].

Вид *D. antarctica* цікавий і тим, що є природним джерелом антиоксидантів [126], що можуть використовуватися у фармацевтичній промисловості, косметології – у сонцезахисних кремах, у харчовій промисловості – як харчові добавки тощо [125, 221, 286]. Вченими встановлено здатність вторинних метаболітів *D. antarctica*, зокрема сполук фенольної природи, інгібувати проліферацію клітин меланоми [40, 242].

Зважаючи на складність збору достатньої кількості рослинного матеріалу, несприятливість умов для проведення експериментальних досліджень у природі, доцільним є введення цієї рослини в культуру *in vitro*. Наявність рослин *D. antarctica* в колекції *in vitro* дозволить зменшити вплив на

антарктичні природні популяції виду та дасть можливість круглорічно, у контрольованих лабораторних умовах моделювати дію різних абіотичних стресових факторів і визначати їх вплив на фізіологічні, біохімічні та генетичні параметри, що практично неможливо в умовах Антарктики [59]. Важливим є застосування рослин *D. antarctica*, які вирощують в асептичних умовах, під час проведення цитогенетичних і молекулярно-біологічних досліджень. В умовах *in vitro* можливим є отримання та контроль за генетично однорідними рослинами, що є ключовою умовою їх використання як моделі для дослідження адаптивних реакцій за дії стресогенних чинників [59].

D. antarctica не лише виживає у жорстких кліматичних умовах Антарктики, але й у деяких регіонах розширює свій ареал [4, 172]. Зважаючи на унікальні властивості цього виду, вивчення його механізмів стійкості до комплексу екстремальних факторів можна розглядати як основу для розуміння процесів пристосування живих організмів до абіотичних стресів.

Знання особливостей стійкості цього виду рослин до стресогенних чинників та використання сучасних біотехнологій дозволять у майбутньому створювати нові сорти цінних господарських культур, здатних витримувати дію несприятливих умов навколишнього середовища.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами, планами. Дисертаційну роботу виконано у лабораторії екології та біотехнології Тернопільського національного педагогічного університету (ТНПУ) імені Володимира Гнатюка у співпраці з відділом генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики (ІМБіГ) НАН України у рамках проекту Національного антарктичного наукового центру, Держкомінформнауки: 2010–2012 N Н12/2012 «Розробка системи біоіндикації кліматичних змін в Прибережній Антарктиці за параметрами динаміки наземних рослинних ценозів» та наукової бюджетної теми ІМБіГ НАНУ «Мінливість геному рослин в екстремальних умовах зростання» (№ держреєстрації 0115U003743, 2016-2020 рр).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було отримання та вивчення культури тканин, органів і мікроклонально розмножених рослин *D. antarctica* та створення в умовах *in vitro* експериментальної модельної системи для фізіологічних та генетичних досліджень.

Для вирішення мети були поставлені такі завдання:

- 1) підібрати умови для індукції проростання насіння *D. antarctica* та отримати асептичні життєздатні рослини з різних локалітетів;
- 2) розробити умови для мікроклонального розмноження та росту отриманих рослин;
- 3) підібрати склад живильного середовища для індукції та проліферації калюсу з різних типів експлантів; з'ясувати особливості спонтанної регенерації рослин та їх росту *in vitro*;
- 4) дослідити із використанням ПЛР- і цитогенетичного аналізу генетичну стабільність/мінливість отриманих мікроклональним розмноженням рослин *D. antarctica* та з'ясувати можливість використання розробленої методики культивування *in vitro* для одержання генетично однорідного рослинного матеріалу цього виду;
- 5) в умовах *in vitro* порівняти вплив різних концентрацій йонів Кадмію на ріст рослин *D. antarctica* з різних місць зростання у Прибережній Антарктиці;
- 6) вивчити особливості накопичення йонів Кадмію у рослинах *D. antarctica* за умови різного вмісту цього токсиканта у живильному середовищі та за різної тривалості його дії на рослини;
- 7) з'ясувати молекулярно-генетичні зміни, що відбуваються у культивованих *in vitro* рослинах з різних природних локалітетів (о. Галіндез і о. Великий Ялур) за впливу різних концентрацій і різної тривалості дії йонів Кадмію;
- 8) зробити висновок про придатність/непридатність розробленої модельної системи для вивчення впливу різних факторів на прикладі вивчення впливу йонів Кадмію.

Об'єкт дослідження – створення експериментальної модельної системи для вивчення механізмів стійкості *D. antarctica* до екстремальних факторів.

Предмет дослідження – отримання і дослідження культури тканин та органів *D. antarctica* як моделі для проведення фізіологічних та генетичних досліджень цього виду *in vitro*.

Методи дослідження: метод культивування рослинних об'єктів *in vitro* застосовували для отримання та вирощування асептичних рослин, індукції та проліферації калюсу; метод мікроклонального розмноження використовували для одержання великої кількості ідентичних рослин. Для визначення генетичної стабільності/мінливості мікроклонально розмножених рослин *D. antarctica* за різної тривалості культивування *in vitro* застосували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із використанням 10 ISSR-праймерів (inter simple sequence repeats-праймерів; поліморфізм фланкованих інвертованими повторами мікросателітних локусів ДНК), а також цитогенетичний метод. Для дослідження впливу йонів Кадмію на ріст рослин *D. antarctica* їх культивували у живильному середовищі Гамборга, Евелейг (B5) [178], у яке вносили Cd^{2+} у концентраціях від 0,1 мМ до 20 мМ. Реакцію рослин на дію йонів Кадмію оцінювали за їхньою життєздатністю, зміною висоти пагонів та довжини коренів, приростом сирої та сухої біомаси, а також здатністю формувати корені. Метод атомно-абсорбційної спектроскопії використовували для визначення вмісту йонів Кадмію у рослинах на різних етапах експериментальних досліджень. Для вивчення мутагенного впливу йонів Кадмію на *D. antarctica* використовували рослини, які культивували на агаризованому живильному середовищі B5 з вмістом Cd^{2+} у межах 0,1–10 мМ, а також контрольні рослини, які вирощували на середовищі без металу. Генетичні зміни досліджували з використанням ПЛР-аналізу з ISSR- та IRAP-праймерами. Для аналізу експериментальних даних було використано методи статистичної обробки.

Наукова новизна одержаних результатів. За матеріалами наукових досліджень *вперше*:

шляхом пророщування асептичного насіння введено в культуру *in vitro* рослини *D. antarctica* із західного узбережжя Антарктичного півострова (о-ви Галіндез, Скуа, Барселот, Дарбо, Великий Ялур, Лехіл та мис Расмуссен); застосовано комплексний підхід до отримання культури тканин і органів, мікроклонального розмноження рослин цього виду, формування та вкорінення отриманих рослин; досліджено особливості культивування *in vitro* різних вихідних генотипів;

із використанням ISSR-аналізу та цитогенетичного аналізу показано збереження генетичних характеристик у клонального потомства *D. antarctica* в процесі тривалого культивування *in vitro* та зроблено висновок про можливість і доцільність використання розробленого способу для отримання генетично однорідних рослин *D. antarctica*;

в умовах *in vitro* оцінено вплив різних концентрацій йонів Кадмію у живильному середовищі на ріст і розвиток рослин *D. antarctica* та вивчено особливості накопичення цього токсиканта у рослинах за його різного вмісту у живильному середовищі та різної тривалості дії на рослини; встановлено, що *D. antarctica* характеризується стійкістю до йонів Кадмію порівняно із іншими видами вищих судинних рослин;

на прикладі дослідження впливу йонів Кадмію на фізіологічні та генетичні параметри рослин *D. antarctica in vitro* зроблено висновок про придатність розробленої експериментальної модельної системи для різнопланових досліджень впливу різних чинників на рослини цього виду.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено спосіб отримання вихідного асептичного матеріалу для біотехнологічних досліджень *D. antarctica*, що полягав у стерилізації і пророщуванні *in vitro* стратифікованого насіння. Спосіб дозволяє одержувати впродовж усього року життєздатні морфологічно нормальні проростки цього виду. Наявність цих рослин важлива, зважаючи на особливий статус Антарктики (Договір про Антарктику, 1959 р.) та несприятливість кліматичних умов регіону для проведення регулярних досліджень.

Встановлено здатність експлантів *D. antarctica* до спонтанної регенерації *in vitro* та розроблено спосіб мікроклонального розмноження рослин цього виду. За відсутності достатньої кількості рослинного матеріалу через віддаленість Антарктики цей спосіб дає можливість клонувати рослини з стабільними генетичними характеристиками для подальшого їх використання у дослідженнях, спрямованих на вивчення фізіолого-біохімічних параметрів рослини *D. antarctica* за дії різних стресових чинників.

Отримані дані використовуються в курсі «Біотехнологія та генна інженерія», «Загальна екологія» та «Молекулярна генетика» для студентів хіміко-біологічного факультету ТНПУ імені Володимира Гнатюка; також можуть бути використані у навчальному процесі під час читання лекційних курсів, проведення лабораторних занять з подібних дисциплін для студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів та для підготовки навчальних посібників з цих дисциплін.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням Загречук О.М. Наведені в рукописі результати отримано здобувачем особисто або за безпосередньої участі при виконанні експериментів.

Концепцію роботи, програму і методологію експериментальних досліджень, основні положення і висновки роботи сформульовані та обговорені дисертантом разом із науковим керівником д.б.н., проф. Дробик Н.М., завідувачем відділу генетики клітинних популяцій ІМБіГ НАН України, член-кореспондентом НАН України д.б.н., професором Кунахом В.А., к.б.н. Спірідоною К.В., к.б.н. Андрєєвим І.О. та к.б.н. Парнікосою І.Ю.

Автором особисто підібрано умови для введення в культуру *in vitro* *D. antarctica*, отримано та досліджено культури тканин і органів рослин; вивчено вплив різних концентрацій йонів Кадмію на ріст та розвиток рослин, з'ясовано особливості накопичення йонів Кадмію в культивованих *in vitro* рослинах, підготовлено зразки для проведення цитогенетичного і молекулярно-генетичного

аналізів та взято участь у проведенні експериментів; оброблено та інтерпретовано представлені у роботі результати; здійснено їх порівняння з літературними даними. Також автором відібрано і критично проаналізовано великий обсяг сучасної вітчизняної та зарубіжної літератури за темою проведеного наукового дослідження.

Аналіз і обговорення результатів дослідження дисертаційної роботи проведено спільно із науковим керівником – д.б.н., проф. Дробик Н.М., чл.-кор. НАН України, д.б.н., проф. Кунахом В.А., к.б.н. Спірідоною К.В. та іншими співробітниками відділу генетики клітинних популяцій ІМБіГ НАН України і лабораторії екології та біотехнології ТНПУ. Отримані результати опубліковано у спільних наукових працях.

Апробація роботи. Результати роботи були представлені на: V Міжнародній Антарктичній конференції «Антарктика і глобальні системи Землі: нові виклики та перспективи» (м. Київ, 17–19 травня 2011 р.), на науково-методичному семінарі «Сучасні досягнення екології та їх імплементація у природничу освіту» (Тернопіль, 2014), VI Міжнародній науково-практичній конференції «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)» (Ялта 12–17 октября 2014 г.), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Концепція сталого розвитку та її реалізація в освіті» (Тернопіль, 2015), Всеросійській науковій конференції з міжнародною участю і школи для молодих вчених «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, Республика Карелия, 21–26 сентября 2015 г.), XXVIII Всеукраїнській науковій інтернет-конференції «Вітчизняна наука на зламі епох: проблеми та перспективи розвитку (Переяслав-Хмельницький, 2016 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 20-річчю заснування наукового фахового видання України «Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія

Біологія» (Тернопіль, 20–22 квітня 2017 р.), VIII Міжнародній Антарктичній конференції, присвяченій 25-ій річниці приєднання України до Договору про Антарктику (17 вересня 1992 р.) (Київ, 16–18 травня 2017 р.), а також на наукових семінарах лабораторії екології та біотехнології ТНПУ та відділу генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 16 друкованих праць, у тому числі 8 статей, з них 7 – у фахових виданнях, перелік яких затверджений ДАК МОН України, 1 – у інших виданнях, та тези 8 доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій.

Автор висловлює щирю вдячність за допомогу та моральну підтримку під час виконання роботи всім співробітникам лабораторії екології та біотехнології ТНПУ ім. В. Гнатюка та співробітникам відділу генетики клітинних популяцій ІМБіГ НАН України; с.н.с. НДЛ екотоксикології і біоіндикації ТНПУ ім. В. Гнатюка Войтюку В.Б.; учасникам Українських антарктичних експедицій за наданий рослинний матеріал, а також за моральну підтримку і розуміння батькам, рідним, друзям та колегам.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біоекологічні особливості та адаптація виду *D. antarctica* до існування в екстремальних умовах Антарктики

1.1.1. Анатомо-морфологічна та ботанічна характеристика виду.

D. antarctica – трав'яниста квіткова рослина класу Однодольні родини Злакові. Довжина пагонів від 3 до 25 см, молоді пагони розташовуються в піхві листка, листки сидячі, лінійні. Щучник антарктичний – багаторічна рослина, дорослі особини якої досягають майже 35–40 річного віку. Відмирання рослин часто спостерігається із середини клону, а повторний цикл розвитку починається, коли рослина розвивається на новому місці (рис. 1.2) [204, 232].

D. antarctica здебільшого формує дернисті угруповання або зустрічається поодинокі (рис. 1.1). Вегетативне розмноження *D. antarctica* відбувається шляхом розростання щільної куртини від одного метра до десятків кілометрів [38, 187]. Зрідка рослини розвиваються відособлено, формуючи куртину до 1 м шириною і 25 см заввишки. Часто окремі рослини, у випадку виривання птахами для формування гнізд чи вітрами та океанічними хвилями під час штормів, заносяться в інші сприятливі місця і там приживаються [17, 71, 75, 152, 155, 219, 220]. Найшвидший розвиток рослин відбувається на морському узбережжі [71, 78, 151, 231].

D. antarctica володіє анатомо-морфологічними пристосуваннями, характерними для більшості рослин високогірних районів, що підвищують їхню морозостійкість і фотосинтетичну активність, а саме: невеликими розмірами і подушковидною формою куртини; висота рослин залежить від умов зростання, з двома-трьома або багаточисельними листками, що рано жовтіють, або насичено зеленим листками. Анатомічна будова

D. antarctica характерна для рослин посушливих місцезростань. Продихи і щільний шар воску є лише на верхньому боці листків, що є однією з ознак посухостійких рослин [4, 239].

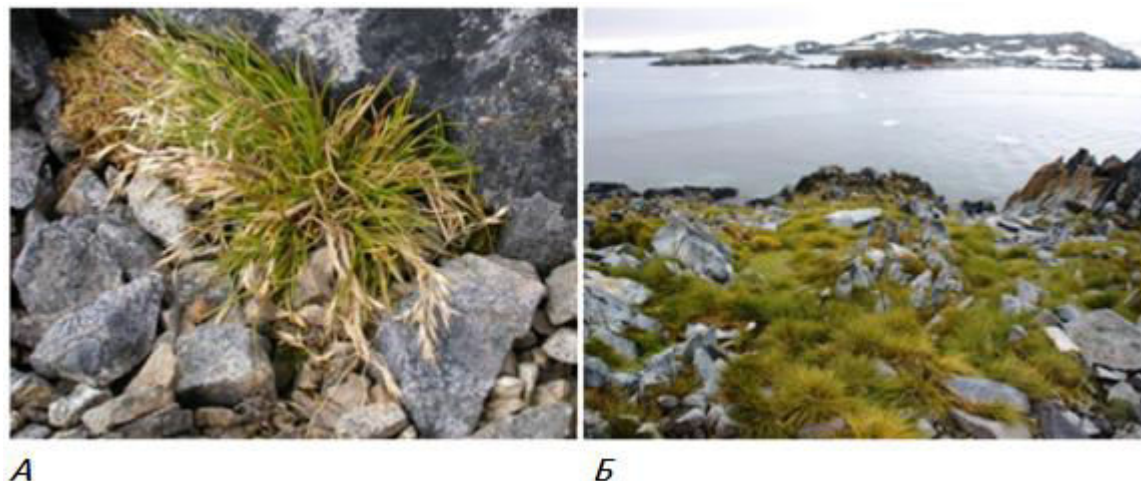


Рис. 1.1. Особливості зростання *D. antarctica* Desv. в природі: *A* – поодинокі, відособлені рослини [217]; *B* – дернисті угруповання [65]

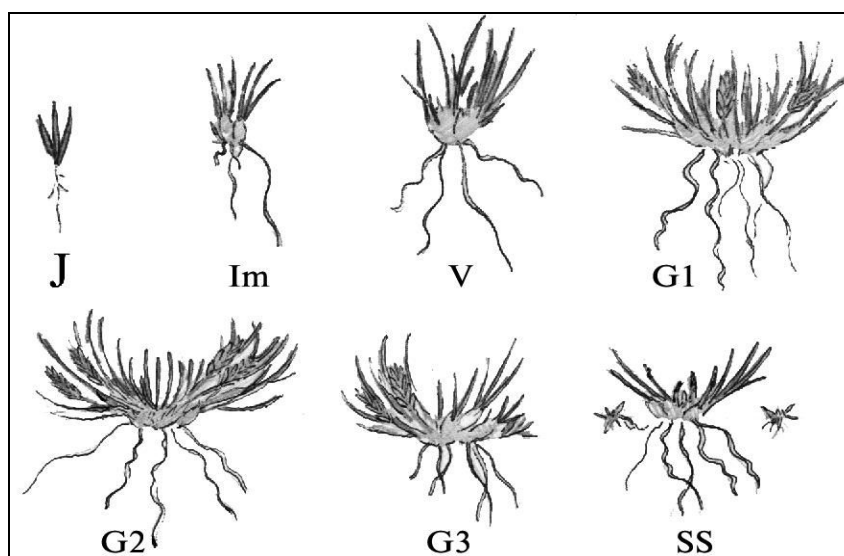


Рис. 1.2. Вікова структура *D. antarctica*: *j* – ювенільні, *im* – іматурні, *v* – віргінільні, *g1* – молоді генеративні, *g2* – середньовікові генеративні, *g3* – старі генеративні, *ss* – субсинільні рослини [119]

Цитоембріологічними дослідженнями якості пилку і структури мікрогаметофітів кількох популяцій *D. antarctica* встановлено, що, незважаючи на суворі умови зростання, процеси мікрогаметофітогенезу у рослинах виду протікають без порушень. Однак, у зрілих пиляках великий відсоток складають пилкові зерна з різним ступенем плазмозу цитоплазми або ті, що повністю дегенерували. Виявлено екземпляри, у пиляках яких формувалося менше 10 % повноцінного пилку. Висока частота дегенерації зрілих пилкових зерен може спричинювати зниження насінневої продуктивності [37].

У *D. antarctica* відзначений широкий діапазон форм, які відрізняються морфологічними ознаками і розвитком тих чи інших анатомічних структур. Зокрема, в умовах підвищених місць з дефіцитом вологи, далеко від берега моря, розвиваються невеликі куртини висотою 0,5–1,5 см, утворюючи впродовж вегетаційного періоду 2–3 невеликих листки, які незабаром жовтіють і сохнуть. На вологіших і багатих органікою субстратах рослини ростуть активніше і під час вегетаційного періоду утворюють 4–6 інтенсивно зелених, розташованих радіально листки. Куртини досягають висоти 10–12 см. Ці особливості повністю відповідають двом морфологічно відмінним в умовах Аргентинських островів формам *D. antarctica*: так званій «ксерофітній» (із сухіших локалітетів) і «мезофітній» (із вологіших) [186].

Учені порівнювали анатомічні та ультраструктурні особливості листків *D. antarctica*, що росли у трьох різних місцях: у сухій Антарктичній тундрі, у вологій зоні впливу морських бризів і в умовах теплиці. Вивчено відмінності біометричних показників та формування специфічних форм залежно від конкретних умов зростання [217, 266]. Показано, що морфологічна будова рослин *D. antarctica*, які ростуть у двох різних антарктичних мікросередовищах, значно відрізняється. Рослини з сухих та гірських місцевостей відмінні за розміром, формою та кольором листків від тих, що ростуть на вологому узбережжі. Листові

пластинки рослин з сухих, відкритих місць зростання стиснуті і V-подібні у зв'язку з невеликим розміром клітин. Автори стверджують, що ця особливість частково пов'язана з впливом надзвичайно суворих умов середовища існування [117, 184, 185, 215].

При дослідженні рослин *D. antarctica* з двох різних місць зростання в Антарктиці – з сухої місцевості та морського узбережжя, виявлено морфологічні відмінності розташування, форми та кольору листків. Листки рослин з посушливої місцевості характеризувалися сильнішими ксерофітними властивостями порівняно з рослинами морського узбережжя [194]. Суттєві відмінності також виявлено в анатомічній будові коренів досліджуваних рослин. На поперечному перерізі коренів рослин *D. antarctica*, що росли у сухих місцях, виявлено щільніше і впорядкованіше розташування клітин порівняно з рослинами, що ростуть на вологому узбережжі. У той же час, кореневі волоски рослин з узбережжя довші і характеризуються наявністю більшої кількості осмофільного матеріалу, порівняно з рослинами з континентальних місць зростання. Автори стверджують, що в умовах надмірного зволоження анатомічні особливості кореня рослин є відображенням їх реакції на стресові фактори морського узбережжя [145, 194].

Молекулярно-генетичні дослідження рослин *D. antarctica* показали низький рівень мінливості у досліджених популяціях. Це дозволяє зробити висновок, що зміни, виявлені на анатомічному рівні, відображають лише фенотипову пластичність виду, а досліджувані особини є екотипами [194].

При дослідженні зразків з шести місць зростання у Прибережній Антарктиці: о-ви Петерман, Барселот, Галіндез, Великий Ялур (у двох точках) та мис Расмуссен встановлено, що рослини *D. antarctica* ростуть на ґрунтах з різним вмістом мікроелементів, значенням рН та інших характеристик. Рослини сприйнятливі до існування ряду вірусів;

характеризуються відмінностями вмісту ДНК і розмірів ядра [25, 89, 190].

1.1.2. Ареал та фактори поширення *D. antarctica*. Ареал виду *D. antarctica* охоплює північно-західне узбережжя Антарктичного півострова, Південні Шетландські і Південні Фолклендські (Мальвінські) острови, Вогняну Землю з прилеглими островами, один із Південних Сандвічієвих островів, а також значну частину Південно-Американських країн – Аргентину та Чилі; найпівденніша точка поширення виду знаходиться між 64° і 45° південної широти (рис. 1.3) [4, 155, 187, 211, 212, 239].

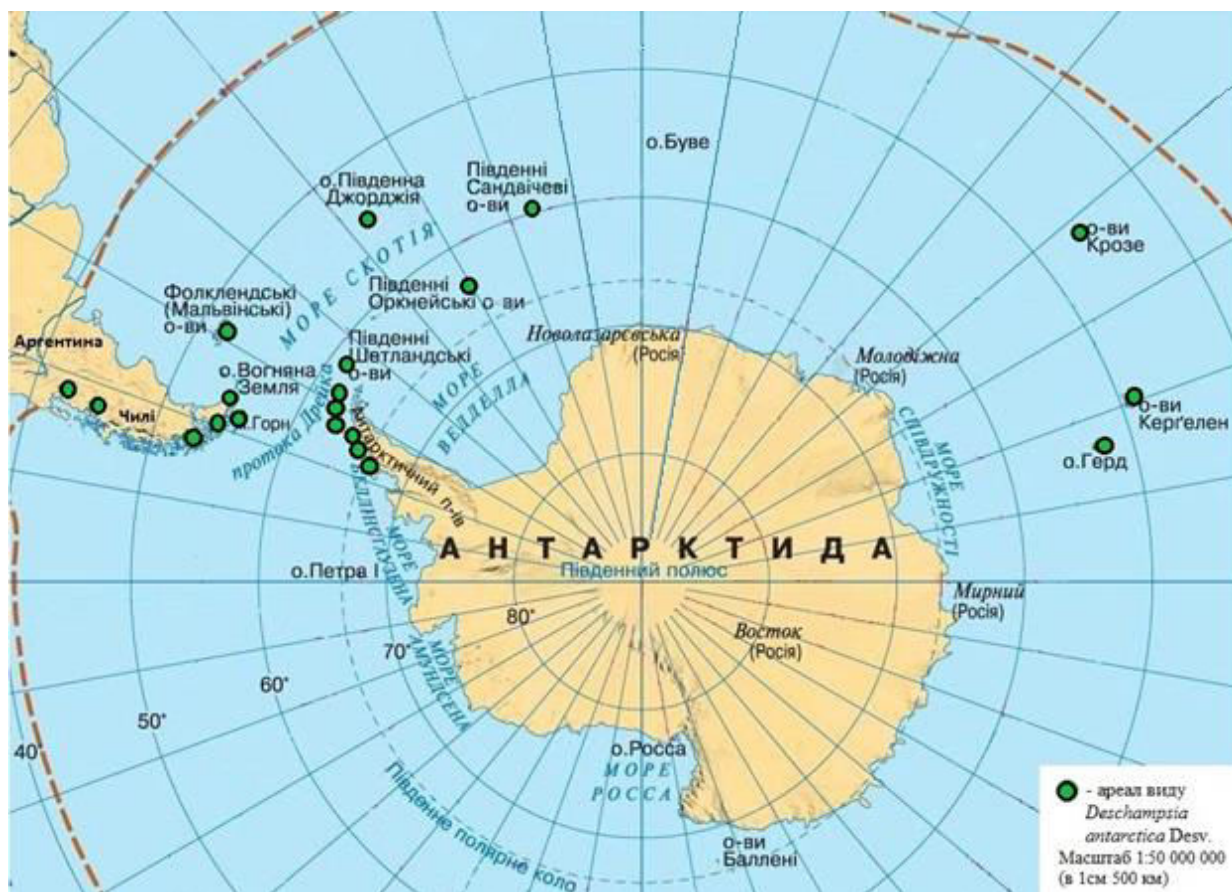


Рис. 1.3. Карта-схема поширення *D. antarctica* [4, 155, 187, 211, 282, 289].

На основі вивчення колонізаційних зон малої тундри Антарктики дослідниками встановлено, що рівновіддалена від льодовика і океану зона є оптимальною для існування рослин, і *D. antarctica* зокрема [119, 285]. *D. antarctica* та *C. quitensis* разом з мохоподібними та макроводоростями утворюють формацію трав'янистої антарктичної тундри [149].

У зв'язку з глобальним потеплінням, особливо поблизу морського узбережжя Антарктики, з'являються нові території, що придатні для росту рослин *D. antarctica* [4, 184, 187]. Моніторинг *D. antarctica* підтверджує, що північна популяція цього виду розширюється, але це розширення не є безперервним уздовж Антарктичного півострова і несумісне з градієнтом відносного збільшення температури в напрямку північ-південь [118, 277].

У результаті проведених лабораторних досліджень ризосферного ґрунту *D. antarctica* встановлено, що вміст алелопатичних речовин, при підвищенні температури з 5 до 10 °C, в ньому значно підвищується. На думку авторів, це свідчить про здатність конкурувати *D. antarctica* з алохтонними видами рослин, які заселятимуться в Антарктиці, у зв'язку з глобальним потеплінням клімату [31].

Кліматичні умови Антарктики. Антарктида, незважаючи на очевидні зміни, залишається найбільш холодним і важко доступним полярним регіоном Землі, у який поступає величезна кількість сонячної радіації, однак, у зв'язку з високим альбедо снігу і льоду тільки незначна її частина поглинається землею [23, 59, 93, 184, 259]. У літні місяці кількість сонячної радіації становить приблизно 20–30 ккал/см² в місяць. Над Антарктикою, де панує циклональний режим погоди і небо майже постійно вкрите хмарами, значення сонячної радіації в 2–3 рази менше, ніж над континентом. А взимку, коли впродовж декількох місяців триває полярна ніч, радіаційне навантаження на цю територію наближається до мінімуму [64, 93]. На Антарктичному узбережжі температура улітку піднімається до +5°C, а взимку опускається до –10 – –25°C. [55, 64, 93].

Річні суми опадів на деяких шельфових льодовиках і на північно-західному узбережжі Антарктичного півострова становлять до 700–800 і навіть 1000 мм. У зв'язку з сильними вітрами і випаданням рясних снігів на цій території дуже частими є хуртовини [54, 57, 93]. Інтенсивні вітри, навіть при відносно високій температурі повітря, призводять до сильного охолодження і висихання підстилаючої поверхні. Перенесення насту, кристалів льоду і дрібних частинок піску завдає механічних пошкоджень рослинам [184].

Регулярні метеорологічні спостереження, які проводилися в Антарктиці впродовж останніх десятиліть, доказують просторові неоднорідні зміни температурного режиму. Це пов'язують із змінами в циркуляції атмосфери над південною полярною областю. Антарктичні метеостанції фіксують помітне стійке підвищення середніх температур упродовж останніх 50 років [3, 4, 238, 249].

Найсуттєвіших змін температурного режиму зазнає Західна Антарктика, а саме Антарктичний півострів, що характеризується надзвичайно високими темпами потепління [4, 210, 255, 277]. За узагальненими даними метеоспостережень, що велися в цьому регіоні з 40-х років XX століття антарктичними станціями різних країн, спостерігається підвищення середньорічних температур на 2,4–2,6 °C [4]. На західному узбережжі півострова темпи зростання весняно-літніх температур значно повільніші, ніж осінньо-зимових, але цього виявилось достатньо для істотного збільшення кількості днів з позитивною температурою – на 74 %. Посилення танення снігів і криги призвело до масштабних наслідків для довкілля та екосистем Антарктичного півострова [210, 255, 256]. Поряд із загальним потеплінням вчені відзначають, що в певні сезони на наукових станціях, що розташовані на Антарктичному півострові, з'явилися від'ємні аномалії середньомісячних температур повітря [58].

Грунтовий покрив Антарктиди недостатньо вивчений. За загальними підрахунками вчених, що досліджували Антарктиду, окремі вільні від

крижаного покриву ділянки суші (оазиси) займають 1–5 % території материка. І лише 5–10 % від цієї площі зайнято ґрунтами. Віддалені та ізольовані один від одного оазиси залежать від регіональних географічних факторів і створюють свій мікроклімат [1].

Через географічну ізольованість та суворість кліматичних умов Антарктики сформувались відносно бідні за видовим складом та продуктивністю наземні екосистеми. Їх бідність та невисока продуктивність, переважання нижчих рослин (мохів та лишайників) і водоростей у рослинних угрупованнях не сприяє формуванню великого розмаїття ґрунтів та інтенсивності процесу їх формування. Однак, саме ці рослини відіграють основну роль у процесі ґрунтоутворення [1, 127, 129].

Дослідження Абакумова Є. В. та Криленкова В. А. (2011) показали, що переважаючим типом організації ґрунтових профілів в Антарктиді є петроземно-літоземний, що сформувався під лишайниковою та моховою рослинністю. Вченими виділено так звані “земноводні ґрунти” – ґрунти тимчасових водойм, в яких упродовж певного відрізка часу відбувається накопичення та трансформація органічної речовини на дні (формуються водоростеві, бактеріальні та змішані мати), а потім при осушенні водойми ці органо-мінеральні шари зазнають суберального перетворення і набувають рис органогенних глеєвих ґрунтів [2]. Окремим типом ґрунтів чи ґрунтоподібних тіл є реголіти, або безгумусні ґрунти, які не мають на поверхні рослинного покриву. Вони поширені в зашельфових оазисах і в сухих долинах Антарктики [128]. В останні роки науковцями розробляється концепція “ендолітного” ґрунтоутворення. Це результат трансформації гірських порід і мінералів у результаті життєдіяльності криптоендолітних мікроорганізмів безпосередньо усередині каміння [110].

Орнітогенні ґрунти найчастіше поширені в прибережних оазисах, у місцях гніздування пінгвінів. Це або мінеральні ґрунти, на поверхні яких залягає шар органічної речовини гуано різної стадії розкладання, або потужні органогенні

шаруваті відклади, мінералізація та гуміфікація яких відбувається лише у верхній частині ґрунтового профілю [2, 53, 81, 216, 269].

Корінне структурування ґрунтової маси характерне в основному для ґрунтів, що формуються під *D. antarctica* та *C. quitensis* [1, 184]. Ґрунти, або ґрунтові субстрати, на яких росте *D. antarctica*, відрізняються своїм видовим складом та реакцією середовища (рН 3,6–7,4) [18, 158].

Біотичні та антропогенні фактори. Одним з основних чинників впливу на *D. antarctica* є розміщення колоній пінгвінів, які привносять у наземні екосистеми Прибережної Антарктики органічну речовину – гуано [209, 265, 269, 284].

Просторовий розподіл *D. antarctica* у значній мірі залежить від місць гніздування, місць живлення птахів та місць випадкової втрати птахами життєздатного матеріалу рослини під час його транспортування [17, 68]. Виокремлюють три види птахів, які найчастіше використовують рослини для побудови своїх гнізд. Це домініканський мартин (*Larus dominicanus* Licht.), південний полярний поморник (*Catharacta maccormicki* Saunders) та бурий поморник (*Catharacta lonnbergi* Mathews) (рис 1.4) [17, 75, 177, 280].

D. antarctica та деякі види мохоподібних є основним складником гнізд мартина домініканського *L. dominicanus*. Матеріал *D. antarctica* у гніздах представлений головним чином зрілими суцвіттями, які утворили насіння. Зважаючи на це, існує можливість генеративного поширення у випадку переносу генеративних куртин *D. antarctica* мартинами. Висока частота зустрічальності у гніздовому матеріалі мартинів цього виду визначається не тільки значним поширенням вказаної формації, але й може бути результатом звички, сформованої на основі емпіричної придатності саме *D. antarctica* та деяких мохоподібних для будівництва гнізда мартинами [17, 68, 75]. Щучник антарктичний може приживатися в гнізді мартина шляхом повторного вкорінення, про що свідчить наявність у цієї рослини додаткових коренів, які вчені виявили у зразках гніздового матеріалу. Можливість повторного вкорінення була також підтверджена моделюванням перенесення цих рослин

птахами в умовах оази Пойнт-Томас [17, 68]. Південний велетенський буревісник (*Macronectes giganteus* Gmelin) також додає до гніздового матеріалу траву *D. antarctica* [17, 68, 245].

При дослідженні впливу *Colobanthus quitensis* та мохів на вегетативне розмноження рослин молодих та старих популяцій *D. antarctica* на Антарктичному п-ві, встановлено негативний вплив такого сусідства [213]. Продуктивність рослин *D. antarctica* (кількість заново сформованих листків, панонів, біомаса), що зростали окремо, була вищою порівняно з тими, що знаходилися у безпосередній близькості до рослин-сусідів. При цьому продуктивнішими були старі популяції [213]. У той же час, іншими дослідниками було виявлено позитивний вплив мохів на поширення та ріст *D. antarctica* [139].

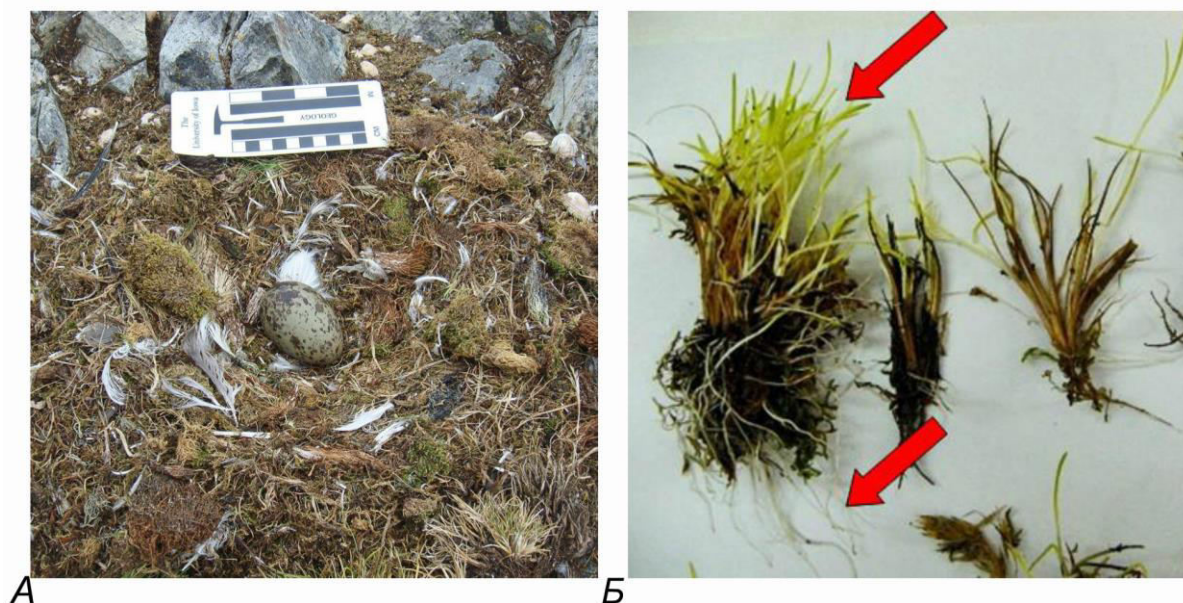


Рис 1.4. *D. antarctica* у гніздах *Larus dominicanus* Licht. у регіоні Аргентинських островів: гніздо вистелене пагонами (А), та проростки пагонів з лотка гнізда (Б) (стрілки вказують на молоді пагони та корені, що сформувались в гнізді) [68, 100]

Провівши комплексне флористичне дослідження на Південних Шетландських островах (півострів Фрайлдс, острів Кінг-Джордж), російські

вчені відзначили дві тенденції щодо зміни та розвитку рослинності цього регіону. У зв'язку із значним антропогенним впливом – великою кількістю туристів, вчених та інших відвідувачів, проведенням будівельних і дорожніх робіт, використанням важкої та гусеничної техніки і розвитком супутньої ерозії – відбувається руйнування рослинного покриву. Відмічено появу заносних (привнесених) видів рослин. У цей час, помітне потепління клімату призводить до відступу льодовика і збільшення площі проєктивного покриття та розміру куртин, аж до формування обширних луговин *D. antarctica* [5].

Вчені вважають, що через потепління клімату на планеті, Антарктика може в найближчому майбутньому перетворитися на справжню квітучу галявину, оскільки *D. antarctica* стала активно заселяти нові території цього регіону. Причому цей вид заселяє території набагато швидше, ніж більш звичні для Антарктики мохи та лишайники. Це відбувається тому, що найважливішим джерелом для росту рослин антарктичної флори є неорганічні сполуки Нітрогену і органіка у формі амінокислот. Відомо, що *D. antarctica* здатна засвоювати Нітроген у складі пептидів через кореневу систему. Дослідження, в ході якого вчені вимірювали вміст азотистих сполук у рослинах з десяти різних ділянок Антарктики, показало, що корені *D. antarctica* засвоюють Нітроген у вигляді коротких пептидів у три рази швидше, ніж амінокислоти, нітрати і амоній та у 160 разів швидше, ніж арктичні мохи і лишайники [279, 283].

1.1.3. Ріст і розвиток за низьких температур. У *D. antarctica* виявлено деякі біохімічні ознаки, які мають адаптивний характер до холодного антарктичного клімату. При вивченні особливостей фотосинтетичного апарату *D. antarctica* встановлено, що в цілому у судинних рослин він добре адаптований до функціонування в умовах низьких температур, проте коли температура повітря нижча -2°C , у цього виду, як і у всіх судинних рослин, фотосинтетичний апарат стає неактивним [111]. Учені зазначають, що за стресових температурних умов у відповідь на гіпотермію при адаптації до

холоду у рослин синтезуються білки, які характеризуються шапероновою активністю. Шаперони з молекулярними масами 60, 70 та 90 кДа є стресовими білками, які синтезуються під дією високих температур і, відповідно, їх називають білками теплового шоку (БТШ). Виявлено, що у *D. antarctica* за холодового та теплового стресів відбувається накопичення БТШ 70 [155, 168, 257, 264]. У зв'язку з цим, можливо, що саме цей білок у *D. antarctica* забезпечує низькотемпературний оптимум фотосинтезу (+13°C). У лабораторних експериментах встановлено, що навіть за температури 0 °C ефективність фотосинтезу досягає 30 % [130, 154, 246].

Білками, інтенсивність синтезу яких змінюється за дії холодового стресу в *D. antarctica*, є дегідрини, що характеризуються високою гідрофільністю білкової молекули [44, 113, 157]. Під час зневоднення клітини під дією водного стресу ці білки завдяки своїй високій гідрофільності запобігають втраті клітиною води й стабілізують інші клітинні білки. Оскільки холодний стрес тісно пов'язаний із зневодненням клітин, то під час холодової акліматизації рослин спостерігається посилений синтез дегідринів. Ймовірно, дегідрини запобігають утворенню льоду в клітинах [8, 44, 113, 157, 197].

У геномі *D. antarctica* виявлено декілька генів дегідринів [113]. Частина транскриптів накопичувалась при екзогенному впливі абсцизової кислоти (АБК), а частина – під дією осмотичного і сольового стресу, що показує наявність АБК-залежного і АБК-незалежного шляхів регуляції експресії дегідринів. Вестерн-блот аналіз показав наявність семи білків дегідринів (58, 57, 55, 53, 48, 30 і 27 кДа), синтез яких індукувався за дії різних стресових факторів. У відповідь на холодний стрес ці білки накопичуються у васкулярній та епідермальній тканинах, де зазвичай розташовуються первинні зони утворення льоду [113, 157].

У *D. antarctica* серед загального пулу білків виявлено високий вміст антифризних білків. Ці білки інгібують вторинну кристалізацію льоду (збільшення кристалів льоду в клітинах тканин) і, можливо, вони необхідні для виживання впродовж тривалого періоду дії від'ємних, близьких до нуля

температур [8]. Хоча в цілому антифризні білки і можуть бути одним з факторів, що дозволяє рослинам переносити низькі температури навколишнього середовища, кореляції між рівнем їхньої активності і ареалом зростання рослин не встановлено [159].

Послідовність, гомологічну до послідовностей генів, що кодують і беруть участь в убіквітин-залежному протеолізі, виявлено у геномі *D. antarctica* [198]. Такий результат є очікуваним, оскільки убіквітени є еволюційно консервативними та відіграють важливу роль у процесах регуляції активності ферментів у рослинних організмах [233].

Одним із елементів захисту рослин від негативних температур є накопичення в тканинах розчинних цукрів [230]. Під час антарктичного літа *D. antarctica* накопичує низькомолекулярні водорозчинні вуглеводи, особливо сахарозу і фруктани [138]. Так, уже за температури $-3,6^{\circ}\text{C}$ *D. antarctica* накопичує сахарозу і низькомолекулярні полімери фруктози у кількості, що на 17 % (від сухої маси), більша, ніж за температур вищих $+22^{\circ}\text{C}$. Крім того, максимум акумуляції сахарози, фруктози й глюкози у листках спостерігається перед початком антарктичної зими. У *D. antarctica* досліджено ген, який кодує фермент сахарозо-фосфатсинтетазу. Показано, що у відповідь на низькі температури зростає активність фермента, але його кількість та експресія гена залишаються незмінними [218]. Ліпідний склад біомембран також відіграє важливу роль у захисті рослин від низьких температур, регулюючи можливість току води [140]. Порівняння ліпідного складу *D. antarctica* з іншими видами рослин не виявило ніяких особливих ліпідів [218].

Для щучника антарктичного визначено гени, що кодують IRIPs-білки (ice recrystallization inhibition proteins); рівень транскрипції цих генів залежить від холодової акліматизації [59, 144, 196]. Дослідниками описано гени, зокрема *DaGrx*, *DaRub1*, *Dapyk1*, які беруть участь в адаптації *D. antarctica* до холодового стресу. Крім специфічних білків, у цій адаптації беруть участь й

інші сполуки [142, 198]. Визначено, що рослини *D. antarctica* накопичують у листках значну кількість сахарози – до 36 % від сухої маси [198].

При дослідженні впливу зміни кліматичних умов у Антарктиці (Антарктичний п-ів) на екофізіологічні особливості антарктичних судинних рослин, і зокрема *D. antarctica*, вченими встановлено, що незначне зростання температури повітря може сприяти підвищенню фотосинтетичних показників. У той же час, часті підняття температури до +20 °C і вище можуть шкідливо впливати на фотосинтез, здатність рослин переносити заморозки, а також можуть призвести до зниження фотозахисних властивостей рослин. Зміна клімату може мати значний вплив на непрямі процеси, що сприяють зростанню та відтворенню цих видів рослин, такі як доступність і поглинання поживних речовин, вуглецевий баланс та метаболізм тощо [167].

1.1.4. Стійкість до світлового стресу та ультрафіолетового випромінювання. Постійні низькі температури та епізодичні періоди високої освітленості є типовими у період вегетаційного сезону *D. antarctica*; ці фактори сприяють утворенню активних форм кисню і можуть бути причиною фотоінгібування [274]. Тому ефективний механізм розсіювання енергії, а також утилізація хімічно активних форм кисню сприяють виживанню у жорстких умовах. При вивченні дії низьких температур на неакліматизовані і акліматизовані до холоду особини *D. antarctica* встановлено, що нефотохімічна диссіпація суттєво залежить від енергії світла. При цьому, в ході розвитку стійкості до вимушеного, але регульованого фотоінгібування флуоресценції фотосистеми II, активувалися детоксикуючі ферменти. Загальний вміст розчинних антиоксидантів, пігментів залежав від вибіркової активності ферментів: супероксиддисмутази, аскорбатпероксидази і глутатіонредуктази [38, 274].

Стресовим чинником для *D. antarctica* є ультрафіолетове випромінювання (УФ) (λ 280–315 нм). Ця рослина має генетично обумовлені механізми протидії згубному впливу ультрафіолету, що є однією з ключових особливостей

адаптації виду до критичних умов виживання в Антарктиді. Підвищений рівень ультрафіолетової радіації як результат виснаження стратосферного озонowego прошарку (100–137 Добсонів) спричинює пошкодження рослин, хоча еволюційно сформовані у них механізми захисту від ультрафіолету можуть пом'якшувати або нівелювати цей ефект [94, 273, 290].

Встановлено, що екстракти *D. antarctica* проявляють фотозахисні властивості, які можуть бути пов'язані з речовинами, такими як флавоноїди і каротиноїди, що виступають як УФ-поглинаючі молекули і антиоксиданти [253].

Светлова Н.Б. у співавторстві (2010) порівнювала функціональний стан фотосинтетичного апарату інтродукованих рослин *D. antarctica* (природний ареал – прибрежна зона Антарктиди) та *Decshampsia caespitosa* (L.) Beauv. (природний ареал – помірні широти Європи, Сибіру, Кавказу). Ці рослини з однаковим генетичним походженням, але різним ареалом поширення по-різному реагують на стресові впливи жорсткого ультрафіолетового випромінювання. Вчені роблять висновок про меншу деструктивну дію УФ на фотосинтетичний апарат листків *D. caespitosa* порівняно з *D. antarctica*. Це пояснюють особливостями інтродукції *D. antarctica* в помірних широтах, а також генетично запрограмованою стійкістю *D. caespitosa* до ультрафіолетового випромінювання [85].

При дослідженні впливу ультрафіолетового випромінювання на фотосинтетичний апарат *D. antarctica* та *D. caespitosa* виявлено, що воно викликало деградацію хлорофілу *a* та β -каротину в листках рослин обох видів [15]. Вміст галактоліпідів у листках рослин в умовах УФ суттєво варіював, але спостерігався відносно стабільний вміст сульфохіновозилдіацилгліцеролу. УФ випромінювання викликало неістотне зниження рівня окиснення пулу *QA* у листках *D. antarctica* та підвищення цього показника в листках *D. caespitosa*. Хоча дія ультрафіолету викликала незначне зниження нефотохімічного гасіння в листках *D. caespitosa*, квантова ефективність *ФС II* залишалася незмінною. Співвідношення між мономерними та олігомерними формами *LHC II* (*LHCP1/LHCP3*) у

фотосинтетичному апараті опромінених рослин *D. antarctica* та *D. caespitosa* підвищувалося особливо суттєво для *D. caespitosa*. Обробка рослин H_2O_2 викликала несуттєве зниження активності супероксиддисмутази у рослинах обох видів. Пігментний склад характеризувався підвищенням вмісту каротиноїдів у листках рослин *D. antarctica* та вмісту хлорофілу *a* в обох видів. Вміст гліколідів у листках був стабільним, а вміст сульфохіновозилдіацилгліцеролу дещо підвищувався після обробки H_2O_2 рослин *D. antarctica* [15].

Н. Ю Таран та співавтори проаналізували результати молекулярного аналізу пігмент-білкових комплексів, а також дослідили особливості ліпідного складу фотосинтетичних мембран *D. antarctica*. Вченими були ідентифіковані такі речовини: моногалактозилдіацилгліцерол (МГДГ), дигалактозилдіацилгліцерол (ДГДГ), сульфохіновозилдіацилгліцерол (СХДГ), фосфатидилгліцерол (ФГ), фосфатидилетаноламін (ФЕ), фосфатидилхолін (ФХ), фосфатидилінозитол (ФІ). Дослідниками встановлено, що для складу ліпідів фотосинтетичних мембран *D. antarctica* характерним є дещо зменшене співвідношення галактоліпідів МГДГ/ДГДГ та досить високий вміст СХДГ. Доведено, що незвичним, порівняно з іншими рослинами, є низький вміст ФГ. Здійснено біоінформаційний пошук у доступних базах даних продуктів геному *D. antarctica*, які структурно та функціонально пов'язані з пластидами. Також проведено пошук їх гомологів у протеомах *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. та *Oryza sativa* L. japonica. Виявлено кількісні відмінності в загальному вмісті світлозбиральних комплексів (СЗК II) (олігомерній та мономерній формах), вмісті хлорофілу в зоні СР_a (найближчий до реакційного центру (РЦ) фотосистеми II світлозбиральний пігмент-білковий комплекс), що відповідає пігмент-білковим комплексам ближньої антени [70]. Виявлені особливості структурно-функціональних компонентів ліпід-білково-пігментного комплексу фотосинтетичних мембран *D. antarctica* є проявом активних

адаптивних стратегій цього виду рослин до лімітуючих факторів Антарктики [45, 244, 270].

Для оцінки пристосовуваності *D. antarctica* до несприятливих умов існування дослідниками запропоновано використання латентного показника пристосовуваності для кожної популяції, який може бути оцінений за низкою параметрів, що відображають три рівні організації: популяційний (S – проективне покриття), організмовий (Ph – біометричні характеристики) та клітинний (rcDNA – відносний вміст ДНК в ядрі клітин паренхіми листків). Авторами проаналізовано шість популяцій та з’ясовано попарні відмінності між популяціями за трьома вищевказаними параметрами [33, 147]. У рослинах з різним числом хромосом, вирощених *in vitro*, розраховано комплексний показник адаптивності – зведений латентний показник пристосовуваності (ЗЛПП), що на думку авторів певною мірою відображує специфічну інформацію, закладену в процесі адаптації рослин до унікальних природних умов в динамічній спадковій пам’яті, яка зберігається у генотипах за умовах *in vitro* [32].

1.2. Важкі метали як забруднюючий чинник в умовах Антарктики

Ключовою екологічною проблемою сьогодення є забруднення природного середовища і, в першу чергу, ґрунтів і рослин. В останні десятиліття серед найбільш небезпечних забруднювачів все частіше вважають важкі метали (ВМ). Їх міграція і перерозподіл в компонентах екосистем залежать як від цілого комплексу природних факторів, так і від інтенсивності і характеру техногенезу [95, 98, 107]. У ході еволюції рослини виробили складну систему механізмів для гальмування надходження надлишкових кількостей ВМ металів у рослини, а також для зниження їх токсичної дії, що забезпечує виживання рослин у несприятливих умовах [95, 98].

Актуальним з екологічної точки зору є вивчення реакції рослин на дію йонів ВМ, які при підвищених концентраціях є токсичними і згубно

впливають на фізіологічні процеси і продуктивність рослин. У цьому контексті актуальним є дослідження механізмів металостійкості рослин на різних рівнях організації, особливо на клітинному і молекулярному, а також механізмів поглинання ВМ коренями рослин та їх транспорту по рослині [87, 95]. Ця проблема має не лише очевидне практичне значення, яке пов'язане з зростаючим забрудненням навколишнього середовища важкими металами, але і важливе фундаментальне значення – дослідження механізмів адаптації та стійкості рослин до ВМ [87].

1.2.1. Важкі метали в умовах Антарктики. В Антарктиді лише незначна частина (1–5 %) континенту не покрита льодом і тому більшість наземних біологічних поселень сконцентровані на цих територіях. Встановлено широкі межі варіювання вмісту біогенних елементів та ВМ у верхньому органогенному шарі педосфери островів, прилеглих до західного узбережжя Антарктичного півострова. Це пов'язано як з антропогенною діяльністю, так і, очевидно, із залежністю накопичення хімічних елементів від існуванням геохімічних бар'єрів фізико-хімічного характеру. Тому рослини, що ростуть на цій території, у процесі мінерального живлення поглинають воду, яка містить також і ВМ [46].

У результаті довготривалих досліджень у районі Української антарктичної станції «Академік Вернадський» було виявлено підвищений вміст важких металів у донних відкладеннях та ґрунтах островів Аргентинського архіпелагу і акумуляцію ВМ різної токсичності в організмах фітозообентосу, макропланктону та риб. Високі концентрації в середовищі та в гідробіонтах кадмію і цинку – індикаторів характеру забруднення – свідчать про його природне (тектонічне) походження і про змив ВМ з материка і островів Антарктики при таненні льоду в результаті потепління клімату в цьому регіоні [9, 30].

Вміст кадмію був виміряний в 30 шарах ґрунту на півострові Файлдс острова Кінг Джордж і становив 0,04–0,34 мг/кг [123]. Для визначення ступеня антропогенного забруднення був застосований факторний аналіз.

Встановлено, що вміст кадмію був значно підвищений в умовах антропогенного впливу. Аналіз основних компонентів був використаний для виявлення джерел металів у цих пробах ґрунту. Визначено, що в ґрунтових субстратах з о. Галіндез вміст йонів Кадмію коливався від 0,48 до 0,65 мг/кг, а на о. Великий Ялур становив приблизно 5,44 мг/кг [6].

У результаті проведених досліджень на островах Аргентинського архіпелагу і прилеглої до архіпелагу прибережної зони Антарктичного півострова встановлено, що ґрунтові мікроорганізми характеризуються високою стійкістю до токсичних металів Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Cr (IV) , Hg^{2+} , причому велика кількість металорезистентних мікроорганізмів ізольовані саме з ризосфери квіткових рослин і мохів [6, 80]. Також зроблено припущення, що антарктичні рослини є джерелом генів стійкості до низьких температур, ультрафіолетового випромінювання [91] та токсичних металів [6, 80, 91].

1.2.2. Вплив кадмію на ріст і розвиток рослин. Серед важких металів кадмій належить до елементів надзвичайно високої токсичності, йому притаманні мутагенні властивості. Під впливом йонів Кадмію відбувається гальмування росту як надземної, так і кореневої частин рослин. Затримка росту посилюється із збільшенням концентрації кадмію в ґрунті. Встановлено, що переважна кількість (близько 80 %) поглинутих рослинами йонів Кадмію акумулюється у коренях. При високих концентраціях базальна частина кореня накопичує значно більші концентрації йонів металу, ніж апікальна. Кадмій негативно впливає на метаболічні процеси рослин: пошкоджує мембрани, змінює активність ферментів. Це спричинює вторинні токсичні ефекти, такі як гормональний дисбаланс, дефіцит поживних речовин, інгібування фотосинтезу, порушення транспорту асимілятів, зміну водного режиму, які, у свою чергу, пригнічують ріст рослин. Під впливом кадмію у клітинах рослин активуються процеси вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), що призводить до утворення надлишкової

кількості активних форм кисню (АФК). Унаслідок високої реакційної здатності АФК взаємодіють із різними клітинними компонентами, у тому числі ліпідами, ініціюючи їх перекисне окиснення. Важливу роль у захисті від негативного впливу вільних радикалів виконують антиоксидантні ферменти, активність яких запобігає утворенню АФК, їхній нейтралізації та репарації пошкоджень [21, 83, 99, 108, 135, 205].

Молекулярні механізми генотоксичності кадмію в організмах не до кінця зрозумілі, однак було висловлено припущення, що вона може бути пов'язана з прямим зв'язуванням кадмію з нуклеотидами гуаніном, аденіном і тиміном [195, 281], прямим пригніченням репарації послідовності ДНК [132, 192, 193] або може бути обумовлена підвищеним вмістом АФК, які, в свою чергу, можуть пошкоджувати нуклеїнові кислоти [175, 248].

Ученими ідентифіковано багато транскрипційних факторів, що беруть участь у відповіді рослин на дію кадмію [173, 199, 278]. Ці транскрипційні фактори належать до різних сімейств, таких як WRKY, basic leucine zipper proteins (bZIP), ethylenesensitive factor (ERF), myeloblastosis protein (MYB), що відіграють важливу роль у контролі експресії генів [95]. Встановлено, що кадмій регулює накопичення білків під родини *ERF* [288].

Активну участь у захисті клітини від токсичної дії ВМ можуть брати білки теплового шоку, синтез яких індукується у деяких рослинах. Так, у культурі клітин *Lycopersicon peruvianum* під впливом солі кадмію відбувався синтез БТШ 70, який локалізувався у плазмалемі, ядрі, а також у мембранах мітохондрій та ендоплазматичної сітки. Синтез БТШ 17 індукували різні метали у коренях *Armeria maritima* і в культурі клітин *Lycopersicon peruvianum*. Експресія гена *Hvhsr17*, відповідального за синтез БТШ у рослин кукурудзи і ячменю, посилювалася в присутності кадмію. Кадмій також індукував синтез БТШ з молекулярними масами 70, 50–65, 22–24, 20 кДа у клітинах суспензії *Datura innoxia* і 70, 42, 40, 26,

23, 15 і 11 кДа в коренях рису. Висловлено припущення, що БТШ захищають білки плазмалеми від токсичної дії кадмію і сприяють процесам її репарації у випадку пошкодження цим металом [95]. У рослин *Arabidopsis thaliana* кадмій індукував експресію 31 гена, включаючи гени, що кодують протеїнкази, транскрипційні фактори, кальмодулінзв'язуючі білки, металзв'язуючі білки, ферменти синтезу глутатіону, шаперони, у тому числі БТШ [268].

Зважаючи на сказане вище, доцільним є з'ясування впливу йонів Кадмію на фізіологічні та генетичні особливості рослин *D. antarctica in vitro*.

1.3. Цито- та молекулярно-генетичні дослідження *D. antarctica*.

Здатність *D. antarctica* до виживання в жорстких умовах Антарктики дозволяє припускати існування у цього виду підвищеної стійкості до різноманітних стресових чинників, а також генетичну обумовленість такої адаптивності. Тому важливим є з'ясування молекулярних механізмів стійкості та наявності інформації про гени, що її забезпечують. Крім того, адаптовані до абіотичних стресів рослини є потенційним джерелом біологічно активних сполук, кріопротекторів, антибіотиків тощо [59].

Відомо, що стресові фактори середовища здатні підвищувати мінливість геному, що проявляється на цитогенетичному та молекулярно-генетичному рівнях у появі В-хромосом, анеу- та поліплоїдії, структурних перебудовах хромосом, а також у змінах послідовності ДНК [106, 141, 148, 208].

Провівши генетичні дослідження *D. antarctica* і *C. quitensis*, вчені роблять висновок про вторинну розселеність цих видів в антарктичному регіоні, що спостерігається і в останні десятиліття. Такому розселенню сприяють кліматичні зміни [4] та птахи як переносники [17, 68, 203]. З урахуванням цього висунута гіпотеза про те, що *D. antarctica* і *C. quitensis* є міграційними реліктами [190, 240].

У результаті цитогенетичного аналізу апікальної меристеми вторинних корінців *D. antarctica* з району Аргентинських островів (о-ви Галіндез, Пітерман, Берселот) виявлено міксоплоїдність з варіацією кількості хромосом від 10 до 68 [109, 226].

Міксоплоїдію у *D. antarctica* було знайдено й іншими дослідниками [208]. Так, при аналізі рослин, отриманих із зібраного на о. Кінг Джордж (Південні Шетландські острови) насіння, міксоплоїдними виявились п'ять із чотирнадцяти рослин. У них, поряд із клітинами з хромосомним набором $2n = 26$, знайдено клітини, які містили 28 хромосом. Автори припускають, що однією з причин цього явища могло бути вирощування рослин в умовах (зокрема, температурних), що суттєво відрізняються від природних місць зростання, а також не виключають той факт, що хромосомна нестабільність є характерною для роду *Deschampsia* [208].

Проаналізовано клітини апікальної меристеми корінців рослин *D. antarctica in vitro*, отриманих з насіння, зібраного з чотирьох острівних та одного материкового локалітету в районі Української антарктичної станції «Академік Вернадський» [14]. Встановлено, що для більшості рослин характерний диплоїдний набір – $2n = 26$ хромосом, розмір яких складав 3–10 мкм. Для рослин з о. Великий Ялур показано наявність міксоплоїдії: розмах мінливості за числом хромосом становив від 13 до 39 хромосом, були виявлені і клітини з 37 і 38 хромосомами [14]. Згодом у результаті аналізу 82 метафаз з шести корінців рослин *D. antarctica* з цього ж острова було виявлено міксоплоїдію з розмахом мінливості за числом хромосом від 27 до 54; у 67 метафазах кількість хромосом складала 38 (модальне число) [227].

Уперше у *D. antarctica* виявлено рослини (о. Дарбо), каріотип яких окрім 26 хромосом основного набору містив 1–3 додаткові В-хромосоми [14, 227]. Вважається, що наявність у каріотипі В-хромосом, а також збільшення у хромосомах кількості гетерохроматину та числа активних ядерцеутворювальних ділянок пов'язані із адаптивними особливостями виду. На

основі цього автори роблять припущення про інтенсивнішу дію екстремальних факторів середовища на рослини *D. antarctica* з о. Дарбо.

При проведенні молекулярно-цитогенетичних досліджень каріотипів рослин *D. antarctica* з чотирьох островів Прибережної Антарктики, виявлено дві пари хромосом, що несуть транскрипційно активні 45S рДНК локуси, і п'ять пар з сайтами 5S рДНК. Зроблено припущення про те, що злиття хромосом цього виду могло бути причиною незвичного для злакових числа хромосом. Ідентифіковано всі хромосоми каріотипу і побудовано хромосомні ідіограми [227].

Авторами проведено порівняльний молекулярно-цитогенетичний аналіз *D. antarctica* (Антарктичний півострів) та пов'язаних з ним видів з різних територій (*D. cespitosa*, *D. danthonioides*, *D. elongata*, *D. flexuosa* (= *Avenella flexuosa*), *D. parvula* та еволюція геному роду *Deschampsia* включала поліплоїди, а також різні хромосомні перебудови. Отримані результати допоможуть прояснити взаємозв'язки всередині роду і можуть бути основою для подальших генетичних та біотехнологічних досліджень, а також для вибору рослин, стійких до екстремальних середовищ існування [148].

За результатами каріологічного аналізу рослин, що були отримані з насіння зібраного на о. Кінг Джордж, гаплоїдний набір каріотипу *D. antarctica* складається із 5 метацентричних, 3 субметацентричних, 4 субтелоцентричних та 1 телоцентричної хромосоми. Ядерцевий організатор міститься на кінці 1-ої пари субметацентричних хромосом, яка була гетероморфною у кількох вивчених клітинах за рахунок невеликого перегруповання гетерохроматинових блоків [208].

При аналізі каріотипів рослин *D. antarctica* вченими виявлено поліморфізм за рисунками С- та DAPI-диференційного забарвлення хромосом і наявність двох транскрипційно активних ядерце-утворювальних ділянок хромосом. Молекулярно-генетичний аналіз із застосуванням поліморфних ISSR-маркерів (inter simple sequence repeats – поліморфізм фланкованих інвертованими повторами мікросателітних локусів ДНК) показав, що відмінності між дослідженими зразками не виходять за межі

внутрішньопопуляційного поліморфізму, властивого рослинам із досліджуваного регіону [14].

При аналізі культивованих тканин, отриманих від рослин *D. antarctica* з різним числом хромосом: диплоїдів (о-ви Галіндез, Скуа та мис Расмуссен – $2n=26$), міксоплоїда з диплоїдним модальним класом і наявністю В-хромосом (о. Дарбо – $2n=26+1-3B$), міксоплоїда з білятриплоїдним модальним класом (о. Великий Ялур – $2n=36, 38$), у калюсних тканинах всіх рослин 2–4-го пасажів виявлено міксоплоїдію, наявність поліплоїдних і анеуплоїдних клітин. Модальний клас в усіх досліджених калюсах формували диплоїдні клітини та анеуплоїдні клітини з білядиплоїдним набором хромосом. Було встановлено залежність цитогенетичної структури клітинних популяцій калюсних тканин від особливостей каріотипу рослини-донора. Найбільший розмах мінливості за числом хромосом (від 18 до 63) мали клітини калюсної культури, отриманої від диплоїдної рослини ($2n=26$) походженням з острова Галіндез, а найвищу частоту поліплоїдних (близько 47 %) та анеуплоїдних клітин – культура тканин міксоплоїдної рослини з білятриплоїдним модальним класом з острова Великий Ялур [74].

З метою вивчення генетичного поліморфізму *D. antarctica* та філогенетичних зв'язків між рослинами Антарктики та за її межами, було проведено RAPD-аналіз (random amplification of polymorphic DNA – поліморфізм довільно ампліфікованої ДНК) та порівняльний аналіз послідовностей ділянки ВТС1-2 рДНК зразків з двох Антарктичних регіонів – з острова Кінг-Джордж та островів району Аргентинського архіпелагу [20]. Результати аналізу засвідчили диференціацію досліджених популяцій на молекулярно-генетичному рівні та існування географічного градієнту генетичного поліморфізму *D. antarctica* в Прибережній Антарктиці зі зниженням цього показника в напрямі з півночі на південь. Аналіз послідовності ділянки ВТС1-2 рДНК показав присутність в антарктичних популяціях кількох варіантів, що відрізняються специфічними мутаціями від рослин, які зростають за межами Антарктики. Виявлений поліморфізм рДНК

вчені пояснюють як комбінацією різних генотипів, що потрапили в Антарктику у результаті кількох міграцій, так і пізнішою появою нових мутацій [20].

На основі молекулярно-генетичного аналізу рослин *D. antarctica* з двох локалітетів Прибережної Антарктики (о-ви Галіндез та Дарбо) з використанням двох типів праймерів 8 ISSR та 2 IRAP встановлено відмінності між дослідженими зразками за поліморфними ISSR-маркерами. При цьому відмінності між зразками не виходять за межі внутрішньопопуляційного поліморфізму, властивого рослинам із досліджуваного регіону [14]. Дослідженнями інших вчених популяцій *D. antarctica* з різних районів Прибережної Антарктики та Південної Америки також встановлено низький рівень генетичної гетерогенності виду [160, 228, 250, 282].

З метою уточнення ступеня спорідненості з іншими представниками родини злакових, та кращого розуміння механізмів пристосування *D. antarctica* до екстремальних умов довкілля Р. О. Макаренко та інші, клонували та провели порівняльний аналіз ділянок хлоропластного та мітохондріального геномів рослин. Послідовності мітохондріальної ДНК клоновано у вектор pUC19 і на його основі було створено бібліотеку рекомбінантних клонів pDac. Секвеновано і проведено аналіз нуклеотидних фрагментів мітохондріального геному *D. antarctica*. Встановлено наявність у мітохондріальній ДНК щучника антарктичного генів 1-ої та 5-ої субодиниць NADH дегідрогенази, 26S рибосомальної РНК. Проведено біоінформатичний аналіз послідовностей мітохондріальної ДНК *D. antarctica*. Доказана висока (понад 90 %) гомологія *D. antarctica* з мітохондріальними геномами представників родини *Poaceae* [41, 143].

Вивчаючи міжпопуляційну гетерогенність за показниками площ ядра та відносного вмісту ДНК у клітинах листка *D. antarctica* різних локалітетів, виявлено наявність полісоматії в тканинах епідерми та паренхіми листка *D. antarctica*. Про це свідчили показники середнього зваженого за кількістю ДНК у рослинах з усіх досліджених локалітетів. Виявлено також

міжпопуляційну гетерогенність розподілів середньої відносної кількості ДНК та середньої площі ядра для клітин епідерми та паренхіми листка *D. antarctica* [201].

Іншими вченими оптимізовано методику виділення сумарної ДНК культивованих *in vitro* антарктичних рослин, у тому числі *D. antarctica*; вивчено можливість застосування відповідних праймерів для ампліфікації ділянок хлоропластної і ядерної ДНК (*trnH-psbA*, *rbcL*, ITS2, ITS) досліджуваних рослин з метою подальшого використання цих ділянок для ДНК-штрихкодування. Показано, що зазначені праймери можуть бути використані для ампліфікації гена *rbcL* та міжгенного спейсера ITS2 як судинних рослин, так і мохоподібних Антарктики [86].

Лі із співавторами з'ясовано, що повний хлоропластний геном *D. antarctica* становить 135,362 п.о з типовою чотиристоронністю, включаючи великі (LSC: 79,881 п.о.) та малі (SSC: 12,519 п.о.) одиночні копії, розділені парою однакових інвертованих повторів (IR: 21,481 п.о.). Він містить 114 унікальних генів, включаючи 81 унікальний білок-кодуючий ген, 29 генів тРНК та 4 гени рРНК [146].

1.4. Отримання та дослідження культури in vitro D. antarctica

При дослідженні антарктичних рослин виникають труднощі, пов'язані зі складністю збору достатньої кількості рослинного матеріалу, несприятливістю природних умов для проведення експериментів і значними фінансовими затратами, необхідними для збору і транспортування рослин. У таких випадках використовують штучно змодельовану систему, зокрема культивування рослин *in vitro*. Перевагами культивованих *in vitro* рослин є: можливість уникнути надзвичайно затратного процесу щорічного транспортування живих рослин з Антарктики; зменшення навантаження на природні популяції, що відповідає вимогам міжнародних угод щодо антарктичного довкілля; можливість у контрольованих лабораторних

умовах моделювати дію певних абіотичних стресових факторів (температури, вологості ґрунту, освітлення, складу середовища тощо) і визначати їх вплив на фізіологічні, біохімічні параметри (приріст маси, синтез фотосинтетичних пігментів, синтез запасних речовин, активність ферментів тощо) та генетичні процеси, що практично неможливо в умовах Антарктики [59]; можливість отримувати генетично однорідний рослинний матеріал, що надзвичайно важливо для проведення молекулярно-біологічних та інших досліджень [48].

У літературі є небагато повідомлень, що стосуються культивування та дослідження *D. antarctica in vitro*. Зокрема, вченими відпрацьовано швидкий і зручний спосіб розмноження *D. antarctica* з використанням культури тканин [224]. Зразки рослин з Антарктики відмивали від природного субстрату й стерилізували, після чого кореневі і листові експланти (5 мм) висаджували у чашках Петрі й інкубували на живильному середовищі Мурасіге–Скуга (МС) [236]. Калюсогенез інтенсивно відбувався за умови присутності регуляторів росту 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) і 6-бензиламінопурину (БАП). Авторами показано, що відсоток калюсогенезу при збільшенні концентрації 2,4-Д від 2,2 до 9 мкМ та БАП – від 0,2 до 4 мкМ, зменшувався від 100 до 58. Калюсогенез розпочинався через два тижні культивування, а пізніше з експлантів розвивалися цілі рослини, ідентичні до вихідних зразків *D. antarctica*. Про успішність експерименту свідчить те, що через три місяці дослідникам вдалося збільшили вихідний матеріал *D. antarctica* у чотири-п'ять разів [224].

Вітчизняними науковцями створена *in vitro* колекція антарктичних рослин, котра налічує понад 40 зразків (серед них судинні рослини, мохоподібні та інші) [59].

Культивування *D. antarctica in vitro* можна використовувати для отримання рослинного матеріалу, що характеризується здатністю синтезувати біологічно активні речовини (БАР) [40, 239, 272]. Відомо, що однією із цікавих характеристик *D. antarctica* є її здатність у жорстких

кліматичних умов Антарктики продукувати високий вміст сполук, що отримуються фенілпропаноїдним шляхом, тобто фенольних кислот і флавоноїдів [40, 239, 272]. УФ випромінювання підвищує у рослинах *D. antarctica* концентрацію флавоноїдів, зокрема орієнтину, лютеніну та ізовертілапоніну 2"-о-бета-арабінопіранозиду [153, 174, 272, 275, 287]. Флавоноїди, у свою чергу, діють як фоторецептори, хелатори металів і антиоксиданти, захищають рослини від факторів, які спричиняють окислювальний стрес і пошкодження, викликані вільними радикалами; мають антимікробну дію тощо [126]. *D. antarctica* є дуже привабливим природним джерелом антиоксидантів [126], які можуть використовуватися у фармацевтичній промисловості – в сонцезахисних кремах; в харчовій промисловості – в якості харчових добавок [125, 221, 286]. Вченими встановлено здатність вторинних метаболітів *D. antarctica*, зокрема сполук фенольної природи, інгібувати проліферацію клітин меланоми [40, 242].

Культуру *in vitro* *D. antarctica* використовують для отримання рослинного матеріалу, що характеризується здатністю синтезувати БАР. Зокрема, вченими [242] запропоновано винахід, що стосується екстракту з протипухлинною дією, отриманого з рослин *D. antarctica*. Особливість цього винаходу полягає в тому, що рослини вирощують у пробірках у спеціально підібраних умовах, що забезпечують збільшення вмісту поліфенолів у рослинних тканинах. Крім того, запропоновано спосіб збільшення продуктивності активних інгредієнтів у культивованих *in vitro* рослинах шляхом спеціальної фізичної або хімічної обробки. Вченими отримано екстракт з протипухлинною активністю, а також таблетки і гранули для лікування онкологічних хворих та профілактики онкологічних захворювань [242].

Для оптимізації приросту біомаси і синтезу вторинних метаболітів у *D. antarctica* іншими дослідниками був запропонований фотобіореактор [252]. Авторами розроблено конструкцію і описано особливості використання фотобіореактора та ультрафіолетового випромінювання для

продукування та збільшення біомаси *D. antarctica* і накопичення в процесі культивування вторинних метаболітів. Вдвічі більшу від початкової біомасу отримано на 10–11 добу культивування, а максимальна фенольна і антиоксидантна активність спостерігалися після 14-ти діб культивування. Дія УФ упродовж 30-ти хв. з шестигодинним інтервалом приводила до збільшення вмісту фенольних сполук у 3 рази і антиоксидантної активності в 1,5 рази, порівняно з контрольною групою, що не піддавалась дії УФ. У проростках *D. antarctica* було виявлено значне накопичення скополетину, хлорогенової кислоти, галоїчної кислоти і рутину [252].

Чилійськими вченими у 2013 р. розроблено спосіб культивування та мікророзмноження *D. antarctica in vitro* [241]. З цією метою автори пропонують використовувати фото-термо-біореактор для мікроклонального розмноження і отримання біомаси рослин. Фото-термо-біореактор містить засоби для хімічного індукування (солі, метали, органічні компоненти та ін.), а також засоби освітлення або люмінесцентні засоби (УФ-радіація і температура), які можуть бути використані на будь-якій стадії росту рослинного матеріалу. Перевагою винаходу є можливість створювати умови як для збільшення приросту біомаси *D. antarctica*, так і для синтезу вторинних метаболітів, що характеризуються цінними лікувальними властивостями [241].

При вивченні клонованих *in vitro* рослин *D. antarctica*, отриманих з насіння, зібраного на однаковій фізіологічній стадії росту рослин з різних регіонів Антарктики у різні роки та вирощених в однакових умовах, встановлено, що вони реалізовували свою різну здатність синтезувати фенольні сполуки [40]. Встановлено, що протипухлинна активність екстрактів з рослин *in vitro* роду *Deschampsia* прямо пов'язана з загальною кількістю в них фенольних сполук. Автори роблять висновок, що культивовані *in vitro* клони рослин роду *Deschampsia* є перспективними для розробки біотехнології отримання протипухлинних препаратів [40].

Отже, *D. antarctica*, зважаючи на її здатність зростати в екстремальних умовах, є цікавим об'єктом для різнопланових досліджень механізмів адаптації до цих умов. Культура *in vitro* цієї рослини може виступати своєрідною моделлю для вивчення різних впливів (у тому числі, стресових факторів) на фізіолого-біохімічні, генетичні та інші характеристики цього виду [27].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Рослинний матеріал

Вихідним матеріалом для досліджень було насіння *D. antarctica* з семи локалітетів, зібране в 2005–2011 рр. під час експедицій, організованих Національним антарктичним науковим центром України на західному узбережжі Антарктичного півострова: о-ви Галіндез, Скуа, Барселот, Дарбо, Великий Ялур, Лехіл та мисі Расмуссен (Рис. 2.1.).

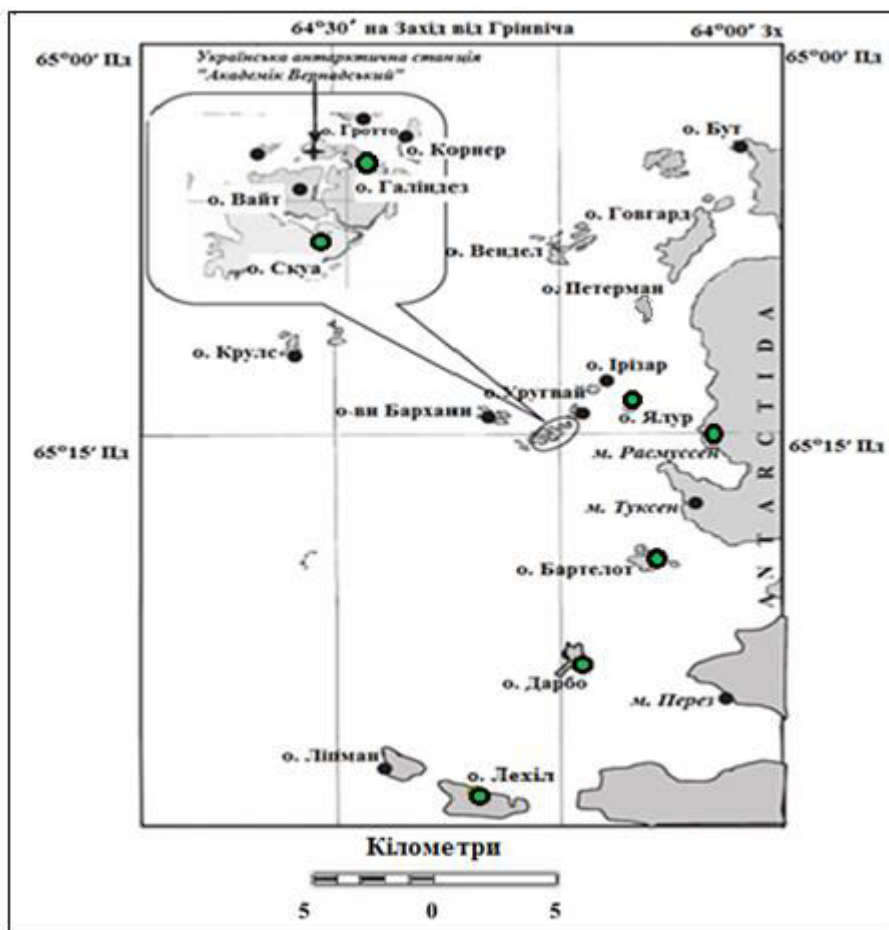


Рис. 2.1. Карта-схема західного узбережжя Антарктичного півострова.
(За основу взято карту-схему, наведену у роботі Таширев и др., 2008 [6])

●— місця збору використаного у роботі рослинного матеріалу

2.2. Характеристика використаних у роботі реактивів

У роботі використовували реактиви виробництва фірм:

1. «Хіммед» (Україна): Калій нітрат (KNO_3), Калій дигідрогенортофосфат (KH_2PO_4), Натрій молібдат дигідрат ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), ортоборатна кислота (H_3BO_3), Манган (II) сульфат пентагідрат ($\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$), Кобальт (II) хлорид гексагідрат ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$), Кальцій хлорид (CaCl_2), Цинк сульфат гептагідрат ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), Натрій гідроксид (NaOH), Натрій дигідрогенортофосфат дигідрат ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$);
2. «Макрохім» (Україна): Купрум (II) сульфат пентагідрат ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$), D-сахароза;
3. ООО «Реактив» (Україна): Ферум (II) сульфат гептагідрат ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$);
4. «Симбіас» (Україна): Калій йодид (KI);
5. «Біофарма» (Україна): Натрій хлорид (NaCl);
6. ЗАТ Фармацевтична фірма «Дарниця» (Україна): спирт етиловий 96 %.
7. BASF (Німеччина): амоній нітрат (NH_4NO_3);
8. «Sigma» (США): 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота (2,4-Д), тіамін- HCl (вітамін B1), 1-нафтилоцтова кислота (НОК), нікотинова кислота (вітамін PP), піридоксин- HCl (вітамін B₆), кінетин (Кін);
9. «Merck» (Німеччина): агар мікробіологічний (агар-агар);
10. «Dushefa» (Нідерланди): етилендіамінтетраацетат Натрію двозаміщений (EDTA-Na_2), 6-бензиламінопурин (БАП), глюкоза, біотин ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_2\text{S}$);
11. Shanghai Synnad Chemical Co., Ltd. (Китай): мезо-інозит ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), гіберелін (GA_3) ($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_6$), колхіцин;
12. AppliChem GmbH (Німеччина): Са-пантотенат (Вітамін B₅), цетилтриетиламоній бромід;
13. Fermentas (Литва): dNTP, MgCl_2 ;
14. Амплісенс (Росія): 1,25 U Taq-полімераза, Taq-буфер з сульфатом

амонію (10X), Бромфеноловий синій;

15. СибЭнзим (Росія): ДНК-маркер «100 bp + 1,5 Kb»;

16. Panreac (Іспанія): Tween-20, Фенол (C_6H_5OH), ТрисШтефан;

17. Русбиолінк (Росія): Бромистий етидій 10 мг/мл ($C_{21}H_{28}BrN_3$), водний розчин.

Усі інші реактиви, які були використані в дослідженнях, вироблені в країнах СНД і мали кваліфікацію ч.д.а. і о.с.ч.

2.3. *Культивування in vitro*

2.3.1. Отримання асептичних проростків. Для стимулювання проростання насіння до висаджування зберігали за низьких позитивних температур (у холодильній камері – $+2 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) та обробляли розчином гіберелової кислоти (ГК₃) (концентрації – 100, 300, 400 та 600 мг/л). Схема стерилізації насіння *D. antarctica* була такою: 1) оброблення розчином детергенту (господарським милом – 72 %) упродовж 30 хв; 2) промивання проточною водою впродовж 30 хв; 3) 2–3-кратне промивання дистильованою водою; 4) поверхнева стерилізація 96 %-им етанолом упродовж 10 секунд; 4) витримування у стерилізаційному розчині (3 %-ий H_2O_2) упродовж 15, 20 або 30 хв; 5) 3-кратне промивання стерильною дистильованою водою.

Кожен варіант досліду проводили у 3–5-ти повторностях (залежно від наявності насіння), висаджуючи по 15–20 насінин у кожну чашку Петрі. Простерилізоване насіння висаджували на агаризоване живильне середовище МС [236] без регуляторів росту. Насіння пророщували на світлі (2500–3000 лк) з 16-годинним світловим періодом, при температурі $+20 - +22\text{ }^{\circ}\text{C}$ та вологості повітря 80 %.

2.3.2. Умови вегетативного розмноження. При підборі умов для вегетативного розмноження використовували отримані з насіння асептичні 1,5–2 місячні рослини *D. antarctica* з досліджених локалітетів, які висаджували на живильні середовища Мурасіге–Скуга (МС) [236], та

Гамборга, Евелейг (В5) [178], доповнені різним концентраціями регуляторів росту: 1-нафтилоцтової кислоти (НОК) або кінетину (Кін). Мікроклонування проводили шляхом поділу отриманих дернин на фрагменти.

2.3.3. Отримання калюсних культур та підбір умов для їхньої проліферації. Для індукції калюсоутворення використовували пагонові та кореневі експланти. Пагони та корені *D. antarctica* довжиною 5–8 мм надрізали в декількох місцях і переносили на агаризовані живильні середовища: МС, Шенка–Хільдебрандта (ШХ) [262], В5, та МС і В5 з половинним вмістом макро- та мікросолей – МС/2 і В5/2, доповнені різними концентраціями цитокініну БАП і ауксинів 2,4-Д або НОК. У кожному варіанті досліду використовували експланти чотирьох–п’яти рослин.

При підборі оптимальних умов для проліферації калюсоутворення тестували живильні середовища МС, ШХ, В5, МС/2 і В5/2, доповнені різними концентраціями БАП, 2,4-Д або НОК.

Відсоток калюсогенезу (ВК) визначали за формулою:

$$BK = \frac{N_K}{N} \times 100\%, \quad (2.1)$$

де N_K – кількість експлантів, на яких утворився калюс;

N – кількість висаджених експлантів.

Для оцінки ефективності спонтанної непрямой регенерації пагонів *D. antarctica* визначали такі показники:

відсоток регенерації (ВР):

$$BP = \frac{N_r}{N} \times 100\%, \quad (2.2)$$

де N_r – кількість калюсних інокулюмів, на яких утворилися регенеранти; N – кількість культивованих калюсних інокулюмів;

середня кількість регенерантів на один калюсний інокулюм з регенерантами (СКР):

$$CKR = \frac{R}{N_r}, \quad (2.3)$$

де R – кількість регенерантів;

N_r – кількість калюсних інокулюмів, на яких утворилися регенеранти;
 ефективність регенерації (EP):

$$EP = \frac{R}{N}, \quad (2.4)$$

де R – кількість регенерантів;

N – кількість культивованих калюсних інокулюмів.

Експланти рослин, які використовували для індукції калюсоутворення, та отримані калюсні культури інкубували в темряві при +20—+22 °С, субкультивування проводили через кожні 3–4 тижні. При появі ознак регенерації калюсні інокулюми з утвореними органогенними структурами переносили в умови освітлення (2500–3000 лк).

2.4. Дослідження впливу йонів Кадмію на рослини *D. antarctica* *in vitro*

2.4.1. Влив йонів Кадмію на ріст рослин. Вихідним матеріалом для дослідження впливу йонів Кадмію, були культивовані *in vitro* рослини, одержані нами раніше шляхом пророщування насіння *D. antarctica*, зібраного на островах Галіндез, Великий Ялур. Для запобігання різної реакції генотипів на вміст йонів Кадмію у живильному середовищі, в експериментах використовували клоноване потомство одного генотипу – о. Галіндез (генотип G/D12-2a) та о. Великий Ялур (генотип Y66). Рослини культивували у живильному середовищі B5, доповненому 0,1 мг/л Кін, рН 5,5 за температури повітря +20—+22 С з 16-годинним світловим періодом при інтенсивності освітлення 2500–3000 лк, вологості повітря 70–80 %. Для дослідження впливу йонів Кадмію на ріст рослин *D. antarctica* у наведене вище живильне середовище вносили Cd^{2+} у концентраціях від 0,1 мМ до 20 мМ.

Культивування рослин за присутності йонів Кадмію проводили залежно від їхньої концентрації впродовж 1–8 тижнів. Реакцію рослин на дію йонів

Кадмію оцінювали за їхньою життєздатністю, зміною висоти пагонів та довжини коренів, приростом сирої та сухої біомаси, а також здатністю формувати корені. У кожному варіанті досліду тестували 5–7 рослин.

З'ясовували летальні дози Cd^{2+} , а також такі, за яких рослини здатні виживати та адаптовуватися до росту при наявності в живильному середовищі ВМ. Індекс росту (ІР) для сирої та сухої маси рослин визначали через 4–8 тижнів культивування залежно від концентрації Cd^{2+} :

$$IP = \frac{m - m_0}{m_0} \times 100\%, \quad (2.5)$$

де: m_0 – маса початкова, мг;

m – маса кінцева, мг.

2.4.2. Накопичення йонів Кадмію у рослинах. Для вивчення особливостей акумулювання кадмію рослинами *D. antarctica*, їх культивували впродовж 7, 14, 21, 28 та 35 діб у живильному середовищі, у яке вносили різні концентрації Cd^{2+} .

Вміст йонів Кадмію визначали методом атомно-абсорбційної спектроскопії на приладі ААС–115 М1 у пропан-бутановому полум'ї з використанням стандарту ГСОМ ПК–1 [61].

Вміст токсиканта у досліджуваних пробах рослин розраховували за формулою:

$$\chi = \frac{V \div (A_1 - A_0)}{m} \times K, \quad (2.6)$$

де χ – масова концентрація Cd^{2+} у рослинній пробі, мг/кг,

V – об'єм досліджуваного розчину золи, см^3 ,

A_1 – концентрація металу в розчині золи, мг/см^3 ,

A_0 – концентрація металу в контрольній пробі, мг/см^3 ,

m – маса повітряно-сухої проби рослин, г;

K – коефіцієнт, що враховує зменшення маси наважки рослинної проби.

(При використанні вказівок даної методики маси наважки $K=1$) [61].

2.5. Цито- та молекулярно-генетичні дослідження *D. antarctica*

2.5.1. Виділення ДНК із рослинного матеріалу. ДНК виділяли із листкової тканини рослин *D. antarctica*, висушеної за температури 37 °С, з використанням цетавлону (СТАВ) як описано [164], та дещо модифіковано Спірідоною К.В. [92]. Екстракцію проводили за СТАВ-методом. Рослинну тканину розтирали у ступці до утворення однорідної маси з 2 × СТАВ буфером (0,1 М трис-НСІ, рН 8,0; 20–40 мМ ЕДТА (етилендіамінотетраоцтова кислота), рН 8,0; 1,4 М NaCl, 2 % СТАВ (цетилтриметиламоній бромід)) у співвідношенні 1:1, 1:1,5 відповідно. Екстракцію проводили на водяній бані при температурі +65 °С упродовж 40–60 хв при періодичному обережному перемішуванні. Очищення грубого екстракту та депротеїнізацію проводили рівним об'ємом суміші хлороформ/ізоаміловий спирт (об'ємне співвідношення 24:1), перемішуючи 5–10 хвилин до утворення гомогенної суспензії. Під час депротеїнізації розчину з хлороформом білок утворює гель на поверхні поділу хлороформ-вода. Клітинний дебрис відділяли центрифугуванням при 3000–5000 обертів за хвилину (об/хв) упродовж 10–15 хвилин при використанні великих центрифужних пробірок. Під час використання пробірок типу «Епандорф» об'ємом 1,5 мл розділення неорганічної та органічної фаз відбувалося при 7000–9000 об/хв упродовж 7–8-хвилинного центрифугування. До водної фази додавали 1/10 від її об'єму 10 % цетавлону (комерційна назва бромід гексадецилтриметиламонію) (а) і 0,7 М NaCl ($V = a \times 0,175$), після чого повторювали обробку рівним об'ємом суміші хлороформ/ізоаміловий спирт у співвідношенні 24 : 1. Обробку сумішшю хлороформом/ізоаміловий спирт з додаванням до водної фази 10 % цетавлону і 0,7 М NaCl повторювали до повного зникнення інтерфази. ДНК з розчину осаджували 2 об'ємами холодного 96 %-ного етанолу або 1 об'ємом ізопропанолу. Інкубували суміш

при температурі $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ упродовж 30–60 хв. Інколи осадження проводили 1 об'ємом ізопропанолу при кімнатній температурі. Після 10-хвилинного центрифугування при 7000–9000 об/хв здійснювали обережну декантацію супернатанта. Утворений осад промивали 70 %-ним етанолом, підсушували на повітрі і розчиняли в $0,1 \times \text{TE}$ буфері (10 мМ трис- HCl , рН 8,0; 1 мМ ЕДТА, рН 8,0). Робочий розчин ДНК зберігали при температурі $-10 \div -20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Було підібрано оптимальні умови для отримання високомолекулярних, достатньо чистих препаратів ДНК із рослин *D. antarctica*, придатних для подальшого аналізу методами на основі полімеразної ланцюгової реакції. Їхню якість оцінювали за допомогою гель-електрофорезу шляхом порівняння з розчином ДНК фага λ відомої концентрації [96].

2.5.2. Ампліфікація ДНК методом ПЛР з використанням ISSR- та IRAP-маркерів. Для виявлення генетичних змін мікроклонально розмножених рослин *D. antarctica* в процесі тривалого культивування *in vitro* застосували метод ПЛР-аналізу із використанням 10 ISSR-праймерів, підібраних раніше при дослідженні популяційно-генетичного різноманіття *D. antarctica* в Прибережній Антарктиці (табл. 2.1).

Для вивчення мутагенного впливу йонів Кадмію на *D. antarctica* використовували рослини, які культивували на агаризованому живильному середовищі B5 з вмістом Cd^{2+} у межах 0,1–10 мМ, а також контрольні рослини, які вирощували на середовищі без металу. Для виявлення генетичних змін застосовували один IRAP-та 7 ISSR-праймерів, нуклеотидні послідовності яких наведено в табл. 2.2.

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції використовували суміш об'ємом 20 мкл, яка містила: 30 нг ДНК, 0,2 мМ дНТФ, 1,25 U Taq-полімерази, $1 \times$ ПЛР-буфер на $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ з 2,5 мМ MgCl_2 . На реакційну суміш нашаровували 15 мкл мінеральної олії для запобігання випаровуванню. На реакційну суміш нашаровували 15 мкл мінеральної олії

для запобігання випаровуванню. Як негативний контроль використовували стандартну реакційну суміш без ДНК.

Таблиця 2.1.

Нуклеотидні послідовності ISSR-праймерів

№ п/п	Назва праймера	Послідовність нуклеотидів, (5' – 3')
1	UBC#03	ACACACACACACACTT
2	UBC#04	ACACACACACACACACAG
3	UBC#05	ACACACACACACACTG
4	UBC#23	ACACACACACACACACTA
5	UBC#59	AGAGAGAGAGAGAGAGGC
6	UBC#807	AGAGAGAGAGAGAGAGT
7	UBC#810	GAGAGAGAGAGAGAGAT
8	UBC#811	GAGAGAGAGAGAGAGAC
9	UBC#836	AGAGAGAGAGAGAGAGYC
10	UBC#840	AGAGAGAGAGAGAGAGYA

Таблиця 2.2.

Характеристика праймерів для вивчення мутагенного впливу йонів Кадмію на *D. antarctica*

№ п/п	Тип праймера	Назва праймера	Нуклеотидна послідовність, (5' – 3')
1	ISSR	UBC#03	ACACACACACACACTT
2	– « –	UBC#04	ACACACACACACACACAG
3	– « –	UBC#807	AGAGAGAGAGAGAGAGT
4	– « –	UBC#811	GAGAGAGAGAGAGAGAC
5	– « –	UBC#836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA
6	– « –	UBC#840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT
7	– « –	UBC#844b	CTCTCTCTCTCTCTCTGC
8	IRAP	1681	ATACCTGGAGGCTGCACCTG

ПЛР проводили в термоциклері Терцик МС2 («Біотехнологія», Росія) за наступних температурних режимів: ПЛР проводили в термоциклері Терцик МС2 («Біотехнологія», Росія) за наступного температурного режиму: 94 °C – 2 хв., 35 × (94°C – 20 с, 53°C – 30 с, 72 °C – 90 с), 72°C – 5 хв.

Реакцію з кожним праймером повторювали щонайменше двічі, враховували тільки добре помітні і відтворювані у повторних реакціях амплікони.

2.5.3. Електрофорез ДНК в агарозному гелі. Продукти ПЛР фракціонували електрофорезом у 1,3 % агарозному гелі в 1 × SB-буфері (5 мМ Na₂B₄O₇, рН 8,5). Для розділення ДНК готували пластину агарози. Спочатку 1,3 %-ну суміш агарози нагрівали на киплячій водяній бані до повного розчинення порошку, далі охолоджували до +50°C і додавали 20-кратний буфер SB до кінцевої 1 × концентрації. Для візуалізації фрагментів ДНК у ході електрофорезу в агарозний розчин вносили флуоресцентний барвник – етидій бромід, у кількості 0,5 мкг/мл (у його присутності електрофоретична рухливість дволанцюгової ДНК знижується на 15 %). Барвник інтеркалює у ДНК, збільшуючи інтенсивність флуоресценції. Ультрафіолетове випромінювання, яке поглинається ДНК в області 260 нм, а барвником при 300 і 360 нм, спостерігається потім у червоно-оранжевій області видимого спектру (590 нм). Готовий розчин агарози заливали в горизонтально встановлену плашку, з поміщеною в неї за 1 см від краю і на висоті 0,5–1 мм від дна гребінкою (від зубців гребінки в гелі повинні залишитись лунки для проб). В електрофоретичну камеру заливали 1 × SB буфер для розділення та переносили у неї гель після повного його затвердіння [56].

Препарати ДНК у кількості 10–15 мкг на лунку змішували з буфером для нанесення проб, що складається із 5–10 % гліцеролу, 7 % фіколу і барвника (0,025 % бромфенолового синього) і необхідний для контролю за проходженням проб ДНК під час електрофорезу. Приготований таким чином препарат вносили в лунки гелю під електрофорезний буфер.

Продукти ампліфікації розділяли методом горизонтального електрофорезу впродовж 5–6 год за напруженості електричного поля 4–5 В/см. Для визначення розміру фрагментів використовували ДНК-маркер «100 bp + 1,5 Kb», який містив фрагменти ДНК наступних розмірів: 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; 1000; 1500; 3000 п.н.

Кожну реакцію проводили у двох повторях, враховували лише чіткі і відтворювані амплікони. Для кількісної оцінки ISSR- та IRAP- поліморфізму дані обробки електрофоретичних спектрів ПЛР-продуктів записували у вигляді бінарних матриць. При проведенні аналізу припускали, що кожний амплікон відповідає індивідуальному геномному локусу, що існує у вигляді одного із двох алелей: домінантного (1) – амплікон присутній, або рецесивного (0) – відсутній.

Розрахунок попарних генетичних відстаней між рослинами за Жакардом проводили в програмі FAMD 1.3 [263].

Гелі фотографували в проникаючому УФ світлі цифровим фотоапаратом “NU-2E Carl Zeiss” із цифровим фотоапаратом “Canon 1000D” з використанням фільтра «О-2,8х».

Обробку електрофореграм проводили за допомогою програми TotalLab TL120 (Nonlinear Dynamics).

2.5.4. Цитогенетичний аналіз. Для цитогенетичного аналізу використовували корінці рослин довжиною 1–1,5 см. Для накопичення та синхронізації мітозів перед фіксацією зразки витримували в крижаній воді впродовж 24 годин при температурі 3–4 °С або в 0,2 %-му розчині колхіцину впродовж 2 год при температурі 37 °С. Матеріал фіксували в суміші етанол : крижана оцтова кислота у співвідношенні 3:1 упродовж 24 годин за кімнатної температури. Через добу фіксатор змінювали на свіжий. Зафіксований матеріал зберігали при –20°C. Зразки фарбували 1 %-им розчином ацетоорсеїну, після чого робили давлені препарати.

У роботі використовували мікроскоп “NU-2E Carl Zeiss” із цифровим фотоапаратом “Canon 1000D”. На кожному препараті аналізували лише ті

метафазні пластинки, у яких можна було достовірно підрахувати кількість хромосом.

2.6. *Статистичні методи обробки результатів досліджень*

Результати біотехнологічних, фізіолого-біохімічних та цитогенетичних досліджень представляли у вигляді $M \pm s$, де M – середнє арифметичне результатів окремих вимірів, s – стандартна похибка виміру.

При обробці результатів порівняльних досліджень використовували t -критерій Стьюдента для визначення достовірної різниці [51].

РОЗДІЛ 3

КУЛЬТИВУВАННЯ *D. ANTARCTICA IN VITRO*

3.1. Індукція проростання насіння

3.1.1. Річна (сезонна) динаміка проростання насіння. Відомо, що ефективним методом введення рослин в культуру *in vitro* є отримання асептичних проростків шляхом пророщування простерилізованого насіння. Перешкодою цьому може бути стан органічного спокою насіння. На глибину спокою нерідко значно впливають умови, за яких проходить формування насіння, а також ступінь його дозрівання, тривалість та умови зберігання [47, 63]. Тому в деяких випадках фактори, які впливають на порушення спокою насіння одних видів, виявляються неефективними щодо інших видів з подібним типом спокою. Нерідко відрізняються умови пророщування навіть різних партій одного й того ж виду [47]. Дослідження сезонної періодичності проростання насіння, його схожості та залежності цих процесів від різних чинників дозволяє в контрольованих умовах цілеспрямовано стимулювати проростання насіння у різні пори року та отримувати життєздатні проростки (рис. 3.1.) [13, 47, 63].

Для стимулювання проростання насіння *D. antarctica* використали два фактори: дію низькими позитивними температурами (упродовж 1–70 місяців) та обробку ГК₃. Виявлено, що холодова обробка впродовж 21 місяця сприяла підвищенню схожості насіння до 55 % (острів Дарбо). Гіберелова кислота також сприяла збільшенню відсотку проростання. Для визначення оптимальної концентрації ГК₃, досліджували схожість насіння з чотирьох локалітетів (о-ви Галіндез, Дарбо, Скуа та мис Расмуссен) упродовж шести місяців. Без використання ГК₃ та за обробки 100 і 300 мг/л, насіння не проростало. Серед протестованих варіантів витримування насіння у ГК₃ концентрацією 600 мг/л упродовж 22 год виявилось найбільш ефективним; за таких умов схожість насіння досягала до 40 % (табл. 3.1.). Щоб запобігти можливому мутагенному впливу ГК₃, вищих концентрацій не використовували.

Вплив різних концентрацій ГК₃ на схожість насіння *D. antarctica*

№ з/п	Локалітет	Схожість насіння, %				
		Без обробки ГК ₃	Концентрації ГК ₃ , мг/л			
			100	300	400	600
1.	о. Галіндез	—	—	—	5–13,3	13,3–40
2.	о. Дарбо	—	—	—	—	6,7–36
3.	о. Скуа	—	—	—	5–6,6	5–10
4.	мис Расмуссен	—	—	—	—	6,7–10

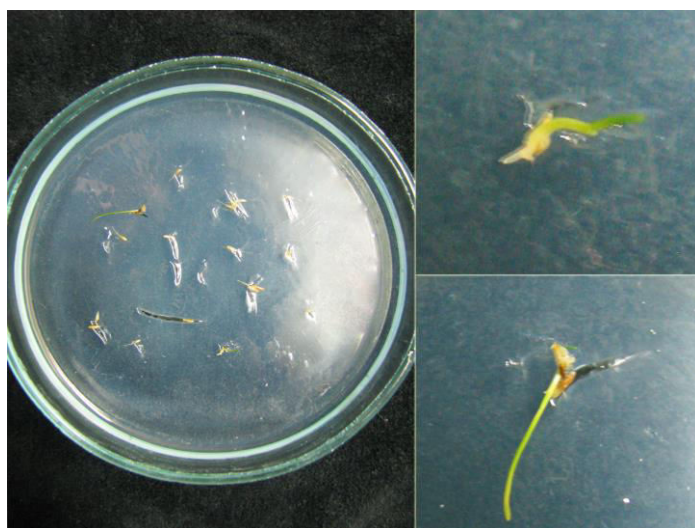


Рис. 3.1. Асептичні проростки *D. antarctica* на живильному середовищі Мурасіге–Скуга. Масштаб – 1 : 3,5

Серед протестованих варіантів найефективнішою виявилася стерилізація насіння 3 %-им розчином пероксиду гідрогену впродовж 20 хв (ефективність стерилізації складала 100 %). Завдяки низькій токсичності H_2O_2 та його розкладанню на світлі, отримані проростки були морфологічно нормальними, зберігали високу життєздатність і характеризувалися інтенсивним ростом.

У результаті проведених досліджень встановлено, що насіння *D. antarctica* фрагментарно проростало впродовж усього року (за винятком травня) (рис. 3.2). Для насіння рослин з усіх досліджених популяцій найбільший сприятливим для схожості виявився саме осінньо-зимовий період (період астрального літа в Антарктиці) [11, 12]. У цей час показник схожості був максимальним і досягав 55 % (насіння з о. Дарбо) (рис. 3.2.).

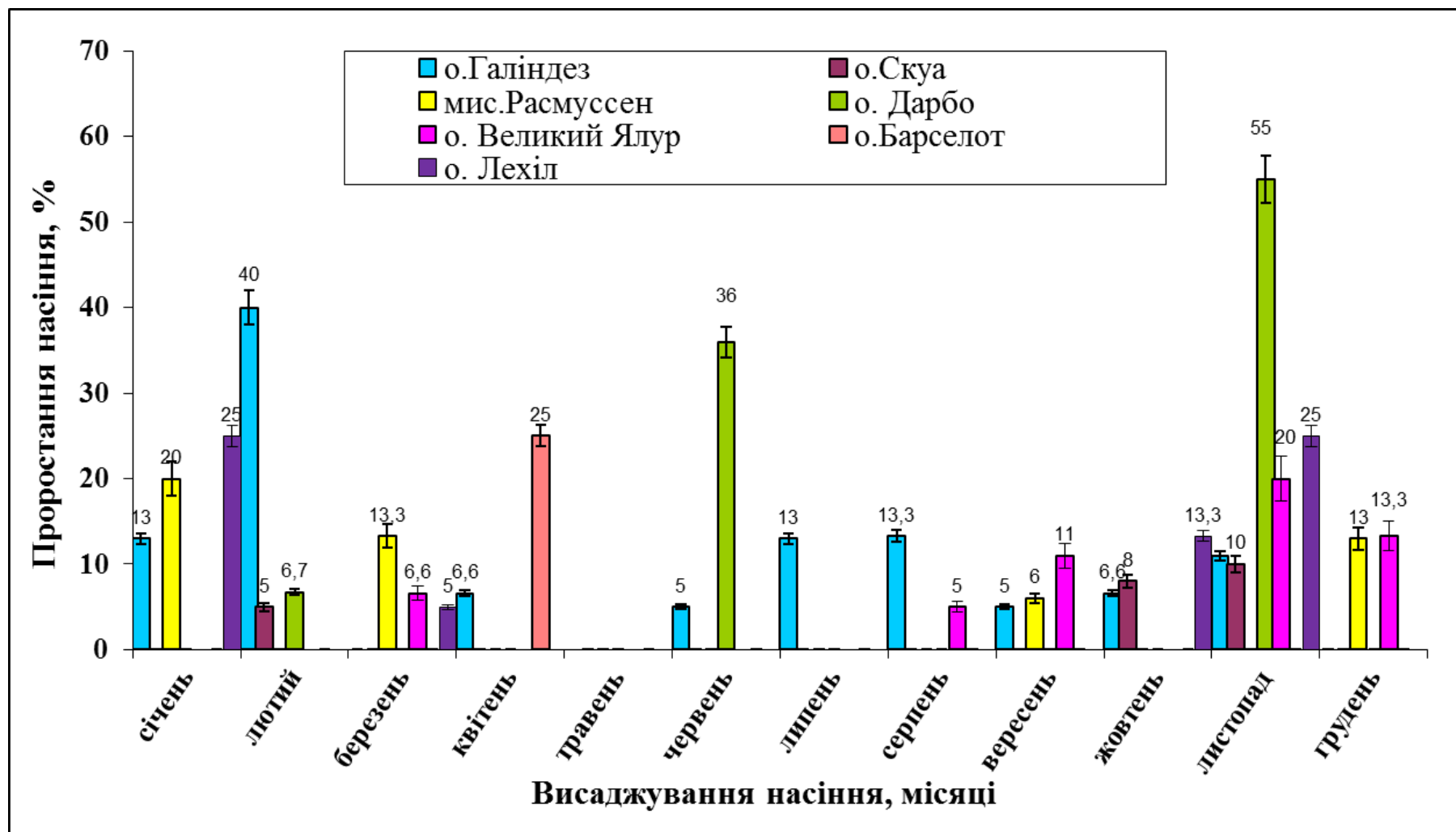


Рис. 3.2. Річна динаміка проростання насіння *D. antarctica in vitro* з різних локалітетів Прибережної Антарктики

3.1.2. Особливості проростання насіння рослин з різних локалітетів.

Нами виявлено відмінності щодо періодичності проростання та відсотку схожості насіння *D. antarctica* з різних місць зростання. Найбільша здатність до проростання властива насінню з о. Галіндез. При цьому воно не проростало лише в травні; відсоток схожості лежав у межах від 5 до 40 %. Порівняно високою була схожість насіння *D. antarctica* з о. Дарбо, однак здатність до проростання проявлялася для цього насіння лише у лютому, червні та листопаді. Показник схожості насіння був найвищим (55 %) у листопаді. Насіння, зібране від рослин з інших досліджених популяцій, проростало лише в окремі місяці. При цьому його схожість була доволі низькою (5–25 %). Найвищим (25 %) у вибірці цих протестованих варіантів показник схожості був для насіння від рослин з о. Барселот у квітні.

Відсоток схожості насіння *D. antarctica* залежав і від тривалості його зберігання. В експериментах використовували насіння 1–6-ти років зберігання (час зберігання за низьких температур від 1 до 72 місяців) (рис. 3.3).

Насіння, яке зберігали за низьких температур (+2 – +4 °C) упродовж одного року, характеризувалося відносно низькою здатністю до проростання (у межах 6,6–20 %). Найбільший відсоток схожості (до 55 % – о. Дарбо) властивий насінню, тривалість зберігання якого становить два роки. При цьому воно здатне проростати як в осінньо-зимовий, так і в літній період. Для насіння, яке зберігалось 3 роки, характерною була здатність до проростання впродовж усього року з максимумами у січні, лютому та грудні. При цьому відсоток схожості цього насіння дещо нижчий (5–25 %) від насіння двох років зберігання. Період березень–вересень (період спокою для рослин) найменш сприятливий для проростання насіння *D. antarctica*. Винятком було насіння рослин з о. Барселот 4-х років зберігання, схожість якого в квітні склала 25 % (рис. 3.3).

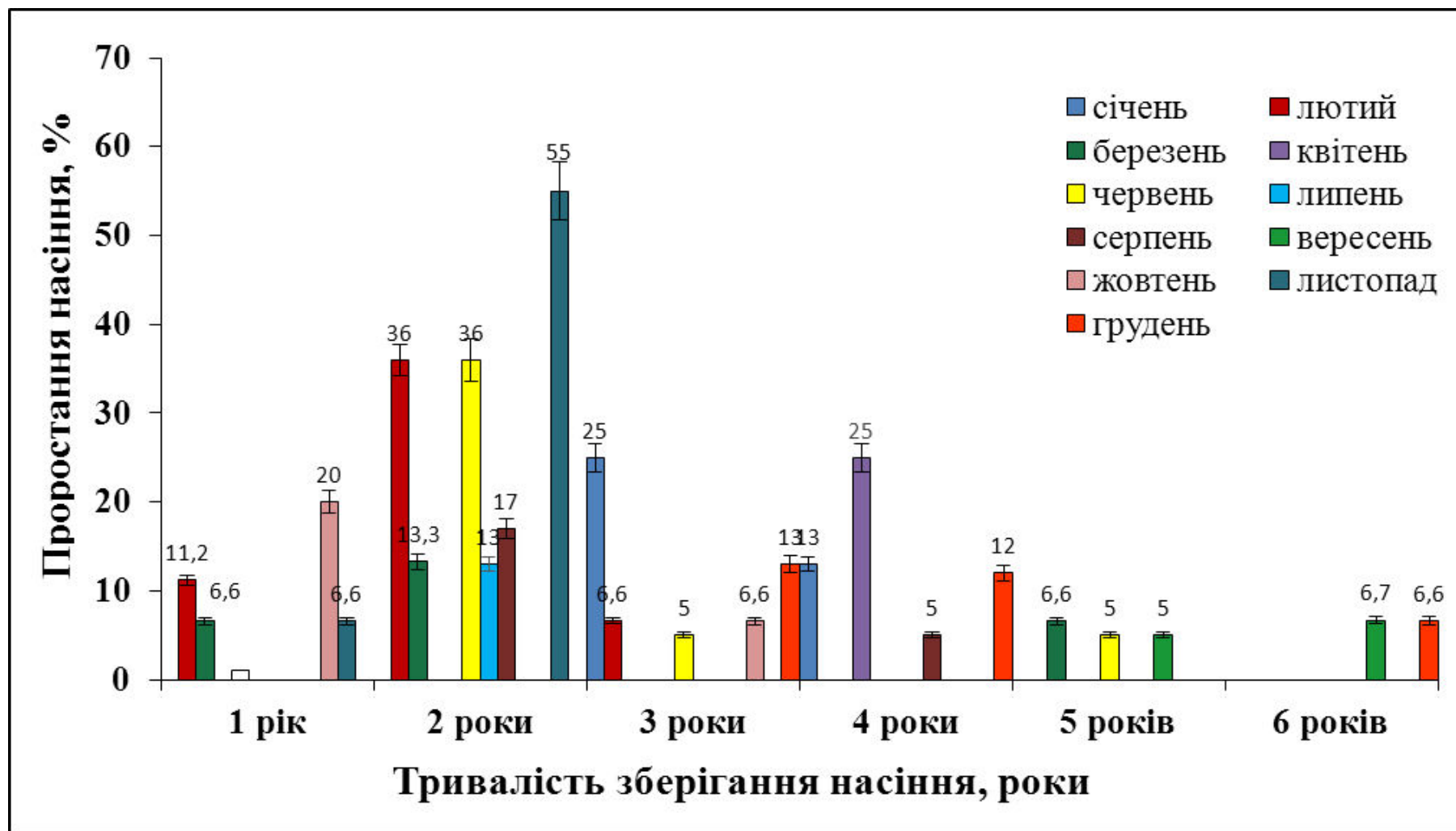


Рис. 3.3. Динаміка схожості насіння *D. antarctica* (%) за різної тривалості зберігання в лабораторних умовах

Нами виявлена здатність насіння *D. antarctica* зберігати схожість навіть після 5–6-ти років зберігання за низьких температур, що надзвичайно важливо в умовах нестачі рослинного матеріалу та його постійної потреби для досліджень. Зокрема, у березні, червні та вересні 2011 року було зафіксовано 5–6,6 % схожості насіння, яке було зібране ще в березні 2005 року, та 6,7–6,6 % (вересень, грудень) насіння, яке було зібране 2006 року на о. Галіндез.

На схожість насіння, очевидно, впливали і кліматичні умови в Антарктиці (в районі Антарктичного п-ва зокрема) [67], які відрізнялися у різні роки збору насіння, оскільки відомо, що саме вони здійснюють суттєвий вплив на формування насіння та його життєздатність.

Незважаючи на виявлені відмінності щодо проростання насіння, для рослин *D. antarctica* з різних місць зростання встановлено спільні ознаки: доцільність використання як стерилента пероксиду гідрогену, ефективність стерилізації у всіх випадках складала 98–100 %; ефективність порушення спокою насіння низькими позитивними температурами +2—+4 °C та обробкою гібереловою кислотою; проростання насіння всіх видів на світлі [11, 12].

3.2. Мікроклональне розмноження

Метод мікроклонування як один із методів біоконсервації *in vitro* можна з успіхом використовувати для масового розмноження різних груп рослин, і особливо, для відновлення рідкісних, зникаючих і корисних видів у природних умовах їх зростання, а також для отримання достатньої кількості рослинного матеріалу [52, 105]. Вважають, що основними факторами, які впливають на процес мікроклонування, є генотип рослини, тип експланта, склад живильного середовища і умови культивування [50, 52, 163].

Для мікроклонального розмноження використовували рослини *D. antarctica*, отримані шляхом пророщування насіння. Ріст та вкорінення проростків проводили на живильних середовищах МС і В5, доповнених Кін

або НОК у таких концентраціях: 0,05, 0,1, 0,2 та 0,5 мг/л. На цих живильних середовищах з 0,05 мг/л Кін або НОК вкорінення проростків відбувалось упродовж 25–30 діб і становило 40–45 %. При цьому часто спостерігали підсихання верхівок пагонів. За десятикратного збільшення концентрації регуляторів росту вкорінення не відбувалося; пагони через 2–3 тижні втрачали зелене забарвлення і гинули. Доповнення живильного середовища В5 0,1–0,2 мг/л НОК забезпечувало вкорінення проростків на 14–17 добу, відсоток вкорінення при цьому становив 75–80. Проростки, висаджені на живильне середовище МС з 0,1 мг/л Кін, вкорінювалися на 16–20 добу, відсоток вкорінення досягав 60 %. Збільшення концентрації цитокініну у цьому середовищі вдвічі забезпечувало вкорінення 80 % проростків. Оптимальним серед протестованих виявилось середовище В5 з 0,2 мг/л Кін, на якому спостерігали інтенсивніший ріст рослин, а їхнє вкорінення відбувалось на 6–10 діб швидше, порівняно з іншими протестованими варіантами, і досягало 95 % [69]. Через 4–5 місяців культивування на цьому середовищі рослини формували дернину, яку розділяли на фрагменти і використовували для мікроклонування.

Для мікроклонального розмноження використовували живильні середовища МС та В5, доповнені Кін або НОК у таких концентраціях: 0,05, 0,1, 0,2 та 0,5 мг/л. На середовищах МС та В5, доповнених 0,05 мг/л Кін або НОК, ріст рослин був сповільнений. До двох тижнів змін морфометричних параметрів пагонів не спостерігали. Через 3–4 тижні висота висаджених пагонів становила 2,5–3 см, формувалося 2–3 нових пагони до 6 мм заввишки та корені довжиною до 5 мм. Через 3–4 місяці культивування кількість пагонів збільшувалася до 6–8, їх висота досягала 6–8 см, продовжувалося формування кореневої системи, довжина коренів досягала 33–36 мм. Висота клонів через 6 місяців становила 10–12 см, а довжина коренів – 44–50 мм.

За умови вирощування рослин на живильному середовищі МС з 0,1–0,2 мг/л Кін (рис. 3.4) через два тижні висота висаджених мікроклонів становила 3–4 см, формувалися 2–3 нових пагони висотою 3–6 мм. Через

місяць кількість пагонів збільшувалася до 5–6, висота пагонів зростала до 5–6 см, а довжина коренів – до 25–28 мм. Через 3–4 місяці з часу висаджування мікроклонів спостерігали формування дернини з 8–12 пагонів, при цьому висота рослини досягала 7–8 см, а довжина коренів – до 42 мм. Через 5–6 місяців культивування відбувалося розростання рослини та заповнення вегетативною масою усієї культиваційної посудини (висота рослин досягала 12–13 см, а довжина коренів – до 50 мм). За умови культивування рослин у живильному середовищі, доповненому 0,1–0,2 мг/л НОК, відмінностей у формуванні надземної частини рослин, порівняно із аналогічним середовищем, доповненим кінетином, не спостерігали, тоді як коренева система була значно розгалуженішою та міцнішою.

При вирощуванні рослин у живильному середовищі В5 з 0,1–0,2 мг/л Кін або НОК, через два тижні довжина висаджених мікроклонів становила 3,5–4,5 см, формувалося 3–4 нових пагони довжиною 4–6 мм. Ще через місяць довжина рослин зросла до 7–8 см, а коренів – 28–30 мм. Через 3–4 місяці з часу висаджування мікроклонів рослини формували дернину з 12–15 пагонів висотою 8,5–10 см та розгалуженою кореневою системою (довжина коренів до 45 мм), а до 5–6 місяців висота пагонів становила 14–16 см, а довжина коренів до 55 мм. Висота рослин у природних умовах складає від 0,5 до 22 см [4, 239]. Отримані мікроклональним розмноженням дернини розділяли на фрагменти і дорощували рослини знову до формування дернин.

Подібні дослідження проведено щодо розробки умов для клонального мікророзмноження іншого антарктичного виду – *C. quitensis*. При цьому авторами встановлено, що культивування на безгормональному середовищі МС/2 сприяє розвитку пазушних бруньок і формуванню пагонів, які вкорінювалися упродовж 2–3 тижнів. У природних умовах висота *C. quitensis* досягає 5 см; максимальна висота рослин в культурі *in vitro* становила 18–20 мм, при цьому достатньо швидко відбувався розвиток пазушних пагонів [91].

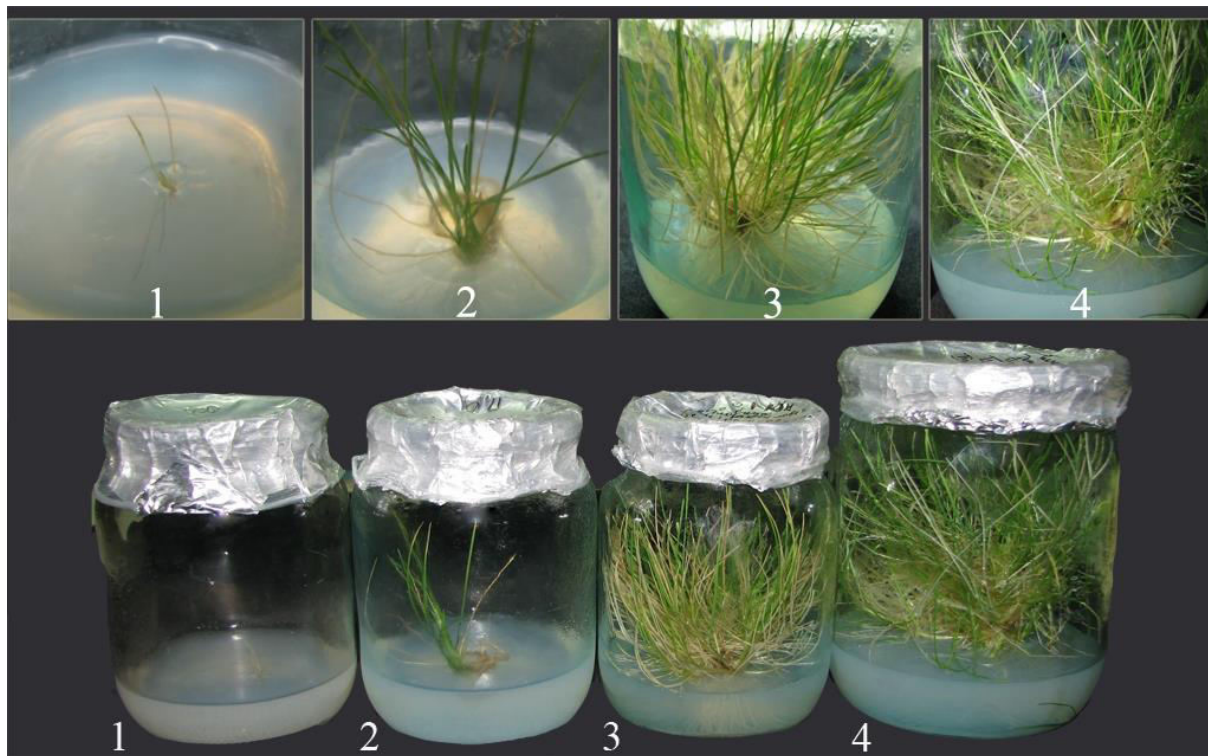


Рис. 3.4. Динаміка росту мікроклонально розмноженої рослини *D. antarctica* в умовах *in vitro* на живильному середовищі В5 з 0,2 мг/л Кін:

1 – двотижнева рослина; 2 – 1,5-місячна рослина; 3 – 3-4 місячна рослина; 4 – 6-місячна рослина. Масштаб – 1 : 2,5

Отже, нами встановлено, що ефективність вкорінення та росту рослин *D. antarctica* залежала від складу живильного середовища концентрації в ньому регуляторів росту. Оптимальним, серед протестованих, для вкорінення отриманих з насіння проростків виявилося середовище В5 з 0,2 мг/л Кін, а для мікроклонального розмноження і росту рослин *in vitro* було середовище В5, доповнене 0,1–0,2 мг/л Кін або НОК. У результаті поділу дернин на фрагменти за відносно короткий проміжок часу можна отримувати значну кількість рослинного матеріалу для наступних різнопланових досліджень.

3.3. Індукція та проліферація калюсу

Під час культивування *D. antarctica in vitro* встановлено, що пагонові та кореневі експланти рослин *D. antarctica* з різних місць зростання (з островів

Дарбо, Великий Ялур, Галіндез, Скуа, Лехіл та мису Расмуссен) здатні формувати калюс на середовищах В5, В5/2, 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 діб 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 та типу експланта [36] (рис. 3.5 – 3.10).

Інтенсивність калюсогенезу залежала від місця зростання рослини-донора експланта. При цьому найбільшу інтенсивність калюсоутворення було виявлено при тестуванні корневих і пагонових експлантів рослин з о. Галіндез (32,3 %) та мису Расмуссен (30,7 %). Дещо нижчою калюсогенною активністю характеризувалися експланти від рослин з о. Великий Ялур (29,7 %) та о. Лехіл (27,5 %). Найменшу здатність до калюсоутворення проявляли рослини з островів Скуа і Дарбо (22,3 % і 19 % відповідно).

Ефективність калюсоутворення залежала від мінерального складу живильного середовища. Використані живильні середовища ШХ, МС та В5 характеризувалися різною підтримуючою здатністю для калюсоутворення *D. antarctica*. Зокрема, на середовищі ШХ формування калюсу було результативним на корневих і пагонових експлантах рослин з островів Скуа, Дарбо та мису Расмуссен і відбувалося через 10-12 діб. При цьому процес наростання калюсу повільний; відсоток калюсоутворення коливався у межах 6,5–52,3 %. Сформований калюс компактний, темно-жовтого кольору; його ріст сповільнений.

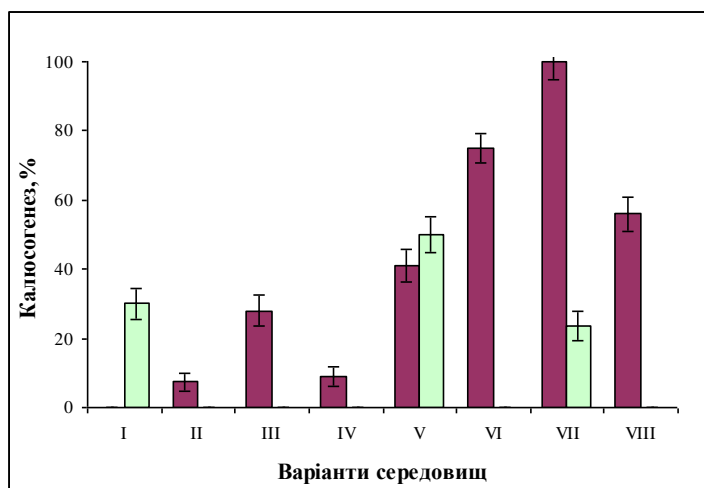


Рис. 3.5. Частота калюсоутворення (%) з корневих і пагонових експлантів рослин *D. antarctica* з о. Галіндез на різних варіантах живильних середовищ:

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

■ – кореневі експланти;

■ – пагонові експланти.

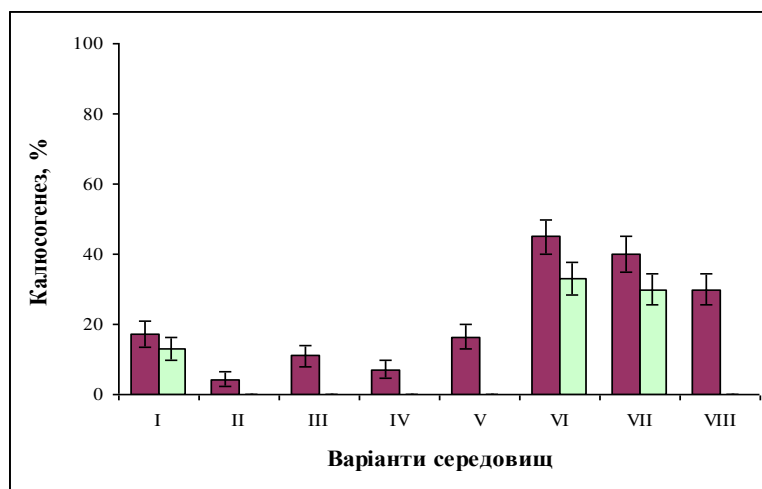


Рис. 3.6. Частота калюсоутворення (%) з корневих і пагонових експлантів рослин *D. antarctica* з о. Дарбо на різних варіантах живильних середовищ:

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;

■ – кореневі експланти;

■ – пагонові експланти.

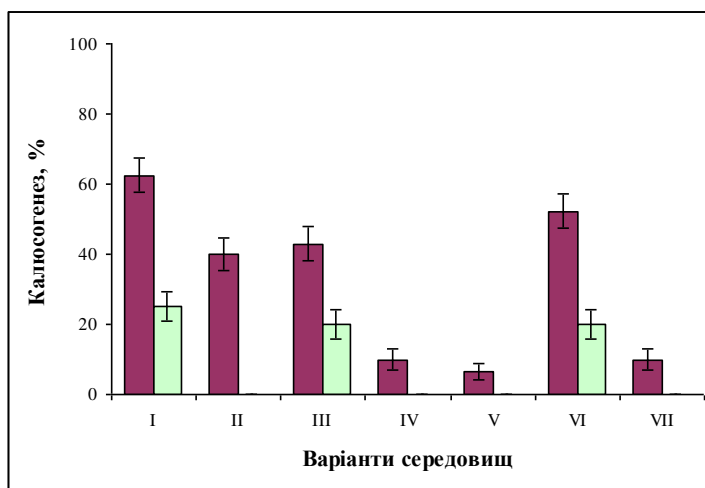


Рис. 3.7. Частота калюсоутворення (%) з корневих і пагонових експлантів рослин *D. antarctica* з о. Скуа на різних варіантах живильних середовищ:

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;

■ – кореневі експланти;

■ – пагонові експланти.

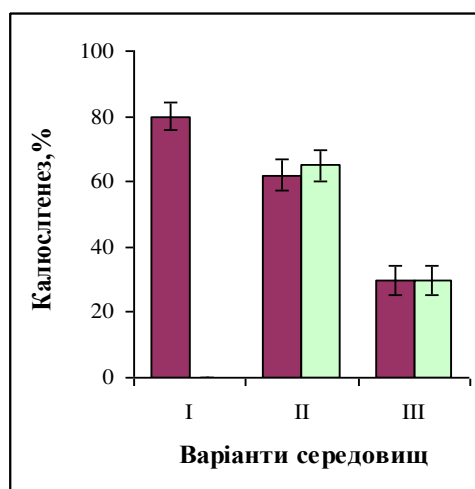


Рис. 3.8. Частота калюсоутворення (%) з корневих і пагонових експлантів рослин *D. antarctica* з о. Великий Ялур на різних варіантах живильних середовищ:

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;

■ – кореневі експланти;

■ – пагонові експланти.

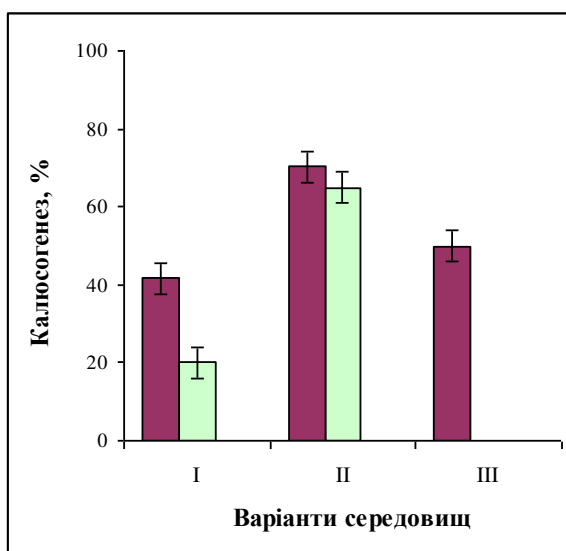


Рис. 3.9. Частота калюсоутворення (%) з корневих і пагонових експлантів рослин *D. antarctica* з о. Лехіл на різних варіантах живильних середовищ:

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

■ – кореневі експланти; ■ – пагонові експланти.

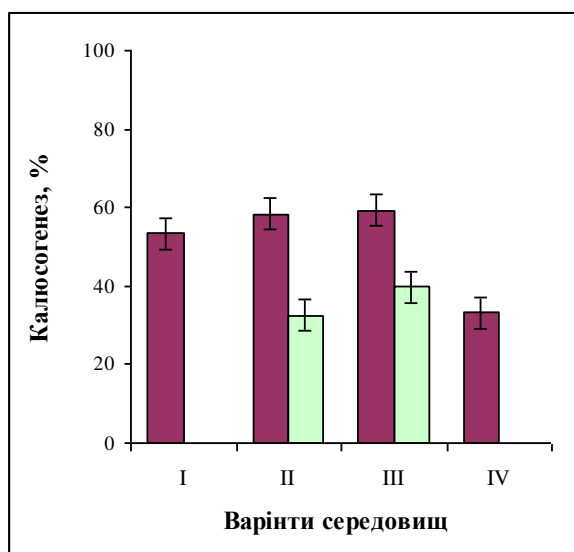


Рис. 3.10. Частота калюсоутворення (%) з корневих і пагонових експлантів рослин *D. antarctica* з мису Расмуссен на різних варіантах живильних середовищ:

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 – ШХ з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП;

■ – кореневі експланти; ■ – пагонові експланти.

Як і в попередньому випадку, середовище МС забезпечувало індукцію калюсогенезу лише з деяких протестованих зразків – із пагонових та корневих експлантів рослин з о. Дарбо (13 % і 17 %), пагонових – з о. Галіндез (30 %), корневих – з о. Лехіл та о. Великий Ялур (50 % і 80 % відповідно). Формування калюсу відбувалося повільно (впродовж 5–6 тижнів); утворена калюсна тканина характеризувалася блідо-жовтим забарвленням та пухкою консистенцією. При подальшому пасажуванні калюс набував буро-жовтого забарвлення, його структура ущільнювалася, ріст суттєво сповільнювався.

Використання для процесу калюсоутворення середовища В5 виявилось найбільш ефективним. На ньому формування калюсу відбувалося з корневих та пагонових експлантів через 7 – 10 діб; відсоток калюсогенезу у деяких випадках досягав 100, сформований калюс характеризувався пухкою консистенцією та світло-жовтим забарвленням (рис. 3.11).

Більша підтримуюча здатність середовища В5 для калюсогенезу *D. antarctica*, очевидно, обумовлена меншим, порівняно з іншими варіантами протестованих середовищ, вмістом у ньому компонентів. У природі цей вид росте в умовах нестачі елементів живлення, тому серед протестованих середовищ В5, очевидно, найбільшою мірою відповідає його трофічним потребам [36].

Зменшення у живильних середовищах концентрації макро- та мікросолей удвічі забезпечувало формування калюсу лише з корневих експлантів рослин островів Дарбо і Галіндез (середовище В5/2) та Великий Ялур (МС/2). Утворення калюсу відбувалося через 15–18 діб; частота калюсогенезу варіювала у межах 11–80 %. Сформований калюс був світло-жовтого забарвлення та пухкої консистенції. При подальшому культивуванні проліферативна активність калюсу сповільнювалася.

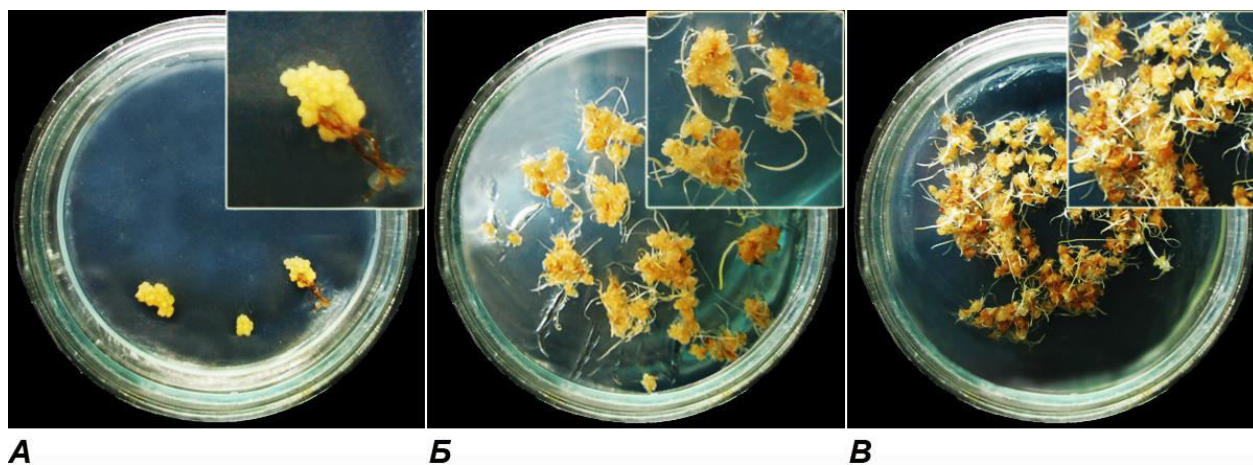


Рис. 3.11. Утворення та ріст калюсу з корневих експлантів рослин *D. antarctica* (о. Галіндез):

А – калюсогенез через 7–10 діб (середовище В5 з 1 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП); ріст калюсу на 13–14-ту (Б) та 24–25-ту (В) добу (В5 з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП). Масштаб – 1 : 2,3

Суттєвий вплив на калюсогенез мало *співвідношення і концентрації регуляторів росту* 2,4-Д, НОК і 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 пагонових експлантах. При цьому відсоток калюсогенезу усіх досліджених зразків *D. antarctica* коливався від 13 % (експланти рослин з о. Дарбо) до 100 % (з о. Галіндез) (рис. 3.5, 3.6).

Доповнення живильних середовищ 0,5 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л БАП забезпечувало калюсоутворення з корневих експлантів рослин з островів Дарбо, Галіндез, Скуа, Великий Ялур, Лехіл та мису Расмуссен. За такої комбінації регуляторів росту найменш інтенсивно формування калюсу відбувалося з корневих експлантів рослин з о. Дарбо (ВК – 4,3 %), і найбільш інтенсивно (ВК – 80 %) – з корневих експлантів рослин з о. Великий Ялур. Збільшення концентрації ауксину вдвічі без змін цитокініну сприяло дедиференціації із корневих (ВК – 17–100 %) та пагонових (ВК – 13–65 %) експлантів рослин з усіх досліджуваних популяцій. При підвищенні концентрації обох регуляторів росту (1 мг/л 2,4-Д та 0,2 мг/л БАП)

калюсогенез відбувався із корневих експлантів рослин з островів Скуа, Великий Ялур і Дарбо та із пагонових – з островів Дарбо і Великий Ялур.

За умови внесення у 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 з часу закладання на ранових поверхнях експлантів формувалася калюс світло-жовтого забарвлення компактної структури з опушенням. При подальшому культивуванні калюс набував буро-коричневого забарвлення щільної структури. При пересаджуванні на аналогічне за складом живильне середовище чи середовища, доповнені іншими комбінаціями регуляторів росту, ріст калюсу сповільнювався, він темнів і поступово відмирав.

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

Отже, на основі отриманих результатів встановлено здатність *D. antarctica* до калюсогенезу. Інтенсивність утворення калюсу була найвищою на середовищі В5 з додаванням 0,9 – 1 мг/л 2,4-Д і 0,09–0,1 мг/л БАП. Калюсогенна активність із корневих експлантів перевищувала пагонову: середнє значення ВК з корневих експлантів складало 46,7 %, із пагонових – 22,7 %. Оптимальним із протестованих середовищ для проліферації калюсу як кореневого, так і пагонового походження, було В5 з 1,0 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП [36].

На відміну від одержаних нами результатів, іншими авторами встановлено, що ефективним для індукції калюсоутворення з корневих і пагонових експлантів *D. antarctica* було живильне середовище МС. У той же

час, як і у наших дослідженнях, калюсогенез інтенсивно відбувався за умови присутності у середовищі МС регуляторів росту 2,4-Д і БАП [224]. Авторами показано, що відсоток калюсогенезу при збільшенні концентрації 2,4-Д від 2,2 до 9 мкМ та БАП – від 0,2 до 4 мкМ, зменшувався від 100 % до 58 %.

3.4. Регенерація рослин

При проведенні досліджень, спрямованих на індукцію калюсоутворення з експлантів пагонового та кореневого походження рослин з островів Дарбо, Галіндез, Скуа, Великий Ялур, Лехіл та мису Расмуссен, з утвореного калюсу відбувалася спонтанна регенерація пагонів. При цьому, органогенез відбувався не лише зразу після індукції калюсної тканини, але й при дальшому її культивуванні (рис. 3.12) [36].

На різних за складом живильних середовищах перші ознаки регенерації з калюсних тканин від рослин з різних місць зростання спостерігали через 7–10 діб з часу індукції калюсоутворення (рис. 3.12, А). Через 1-2 тижні з калюсу формувалися пагони довжиною до 4-8 мм. За умов освітлення (2–2,5 клк) впродовж 6-8 діб вони набували зеленого забарвлення (рис. 3.12, Б); через наступних 15-25 діб пагони доростали до 2–2,5 см та відбувалося формування коренів (довжиною 3-5 мм) (рис. 3.12, 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. 3.12, Г). Це свідчить про підвищену здатність *D. antarctica* до вегетативного розмноження *in vitro* [36].

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

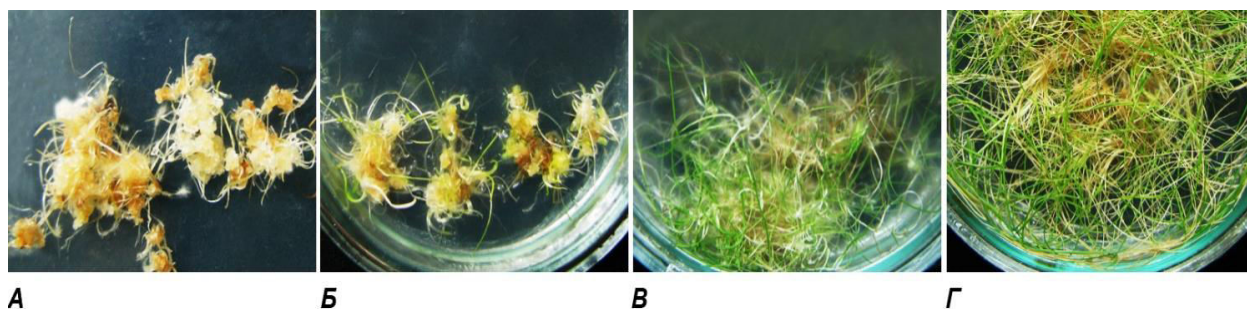


Рис. 3.12. Спонтанна регенерація пагонів із калюсу кореневого походження від рослин *D. antarctica* (о. Дарбо) на середовищі В5, доповненому 1,0 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л БАП:

А – початок регенерації пагонів із калюсу (через 7–8 діб з часу індукції калюсоутворення); *Б* – ріст регенерантів в умовах освітлення (4–5 тижнів); *В* – формування рослин-регенерантів (6–8 тижнів); *Г* – розростання рослин-регенерантів. Масштаб – 1 : 2,3

У процесі культивування було встановлено *залежність ефективності регенерації від складу живильного середовища*. Спонтанна регенерація відбувалася на живильних середовищах В5, МС, МС/2 та ШХ. Органогенез з калюсу як кореневого, так і пагонового походження найчастіше спостерігали на середовищі В5 з регуляторами росту різних концентрацій – 2,4-Д (0,5–1 мг/л) і БАП (0,09–1 мг/л).

Підтримуюча здатність середовища з комбінацією регуляторів росту 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП для регенерації рослин з о. Скуа була найнищою (37,5 %), а для о. Лехіл сягала 80 %. При цьому середня кількість регенерантів на один інокулюм з регенерантами становила 4,4, а ефективність регенерації – 2,5 регенеранта на інокулюм (рег./інок.). При збільшенні у цьому середовищі концентрації ауксину до 0,9 мг/л і незначному зменшенні цитокініну (до 0,09 мг/л) ВР зріс від 38,5 % (із калюсу пагонового походження від рослин з о. Дарбо) до 83,3 % (із пагонового калюсу від рослин з о. Галіндез). СКР при такому поєднанні регуляторів росту на обох типах калюсних інокулюмів становила 5 рег./інок., а ЕР була найвищою – 3,1 рег./інок. При збільшенні

концентрації 2,4-Д до 1,0 мг/л і при концентрації БАП (0,1 мг/л) органогенез відбувався з калюсу кореневого і пагонового походження від рослин з о. Скуа та мису Расмуссен, із калюсу кореневого походження з о. Лехіл, та калюсу пагонового походження з о. Галіндез і був доволі ефективним (табл. 3.1).

Непряма регенерація відбувалася на живильному середовищі МС з 1,0 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП лише з калюсу пагонового походження рослин з о. Скуа (ВР – 54,5 %). На середовищі МС/2 за умови 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. Великий Ялур. При цьому ВР становив 55,5 %, СКР – 3,4 рег./інок., а ЕР – 1,9 рег./інок. (табл. 3.1).

При культивуванні калюсу на різних варіантах середовища ШХ спонтанна регенерація відбувалася лише при доповненні 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 доволі високим і у середньому складав 4 рег./інок.

Формування регенерованих пагонів з калюсу від рослин з о. Скуа також відбувалося доволі інтенсивно, середній ВР для пагонових інокулюмів становив 62,3 %, а для корневих – 47,8 %. У випадку, коли донорами виступали рослини з о. Дарбо, середній ВР з калюсу був нижчим, порівняно з двома наведеними вище варіантами (табл.3.2). З культури тканин від рослин з о. Великий Ялур спонтанна регенерація відбувалася лише в одному випадку з калюсу кореневого походження. СКР для калюсу від рослин цієї популяції на різних варіантах середовищ складала 3-5,2 рег./інок.; ЕР – 1,5-3,4 рег./інок.

Було досліджено особливості *регенерації пагонів з калюсу пагонового і кореневого походження*. Відсоток регенерації для кореневого калюсу варіював від 10 % до 76,9 %, а для пагонового – 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 пагонового походження – від 1,5 рег./інок. до 3,4 рег./інок. (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Регенерація пагонів з калюсу кореневого і пагонового походження від рослин *Deschampsia antarctica* Desv. 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						
B5, 0,9 мг/л 2,4-Д + 0,09 мг/л БАП	23	14	73	60,8±4,9	5,2	3,1
B5, 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						
B5, 0,9 мг/л 2,4-Д + 0,09 мг/л БАП	13	10	61	76,9±4,2	6,1	4,7
B5, 1,0 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП	12	8	45	66,6±4,7	5,6	3,8
B5, 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						
B5, 0,9 мг/л 2,4-Д + 0,09 мг/л БАП	16	7	36	43,7±3,7	5,1	2,2
B5, 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП	12	8	38	66,6±4,7	4,8	3,2
о. Великий 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
мис Расмуссен						
B5, 1,0 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП	13	7	28	53,8±5,0	4	2,2
B5, 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП	8	5	20	62,5±4,8	4	2,5

о. Лехіл						
B5, 1,0 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП	10	8	32	80±4,0	4	3,2
B5, 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП	12	7	24	58,3±4,9	3,4	2
Загалом на усіх середовищах, на яких відбувалася регенерація	157	88	408	55,2±5,0	4,4	2,5
<i>калюс пагонового походження</i>						
о. Галіндез						
ШХ, 0,9 мг/л 2,4-Д + 0,09 мг/л БАП	6	3	9	50±5,0	3	1,5
B5, 0,9 мг/л 2,4-Д + 0,09 мг/л БАП	18	15	61	83,3±3,7	4,1	3,4
B5, 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						
B5, 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						
B5, 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
мис Расмуссен						
B5, 1,0 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП	6	4	16	66,7±4,7	4	2,7
Загалом на усіх середовищах, на яких відбувалася регенерація	88	51	210	56,3±5,0	4,1	1,9

Примітка. * – У таблиці подано лише ті варіанти живильних середовищ, на яких поряд з калюсогенезом відбувався непрямий органогенез.

Формування регенованих пагонів з культури тканин в усіх наведених вище випадках відбувалося упродовж 6–8 тижнів, після чого їх висаджували на живильні середовища відповідного складу, доповнені 0,1–0,2 мг/л Кін або 0,1 мг/л НОК (рис. 3.13).

Для дальшого росту і розмноження одержаних рослин, що культивували на живильному середовищі з 0,2 мг/л Кін, концентрацію цитокініну зменшували вдвічі.

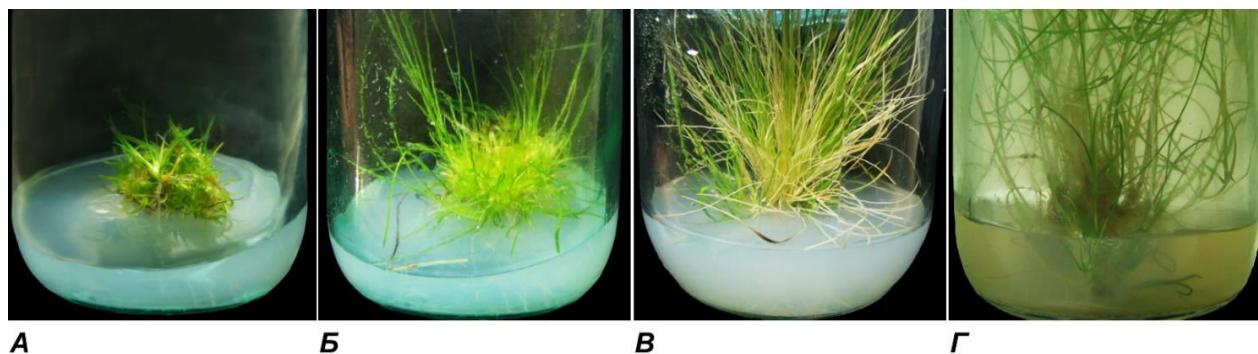


Рис. 3.13. Ріст та вкорінення регенованих пагонів *D. antarctica* (о. Дарбо): отриманих з калюсу кореневого походження (А), на середовищі В5, доповненому 0,1 мг/л НОК, через 3–4 (Б), 6–7 (В) та 8–10 (Г) тижнів. Масштаб – 1 : 2,4

При порівнянні морфометричних параметрів, одержаних з насіння [11] та регенованих з калюсу рослин *D. antarctica*, було встановлено більшу інтенсивність росту останніх. Розростання та заповнення вегетативною масою рослини усієї культиваційної посудини (висота посудини 12 см, діаметр – 10–12 см) у першому випадку відбувалося через 5–6 місяців, у другому – на 2–2,5 місяців швидше. Біомаса рослини, одержаної шляхом пророщування насіння, через 3–3,5 місяці культивування може досягати 0,1–0,2 г, а рослини-регенеранта – 1–1,5 г. Крім цього, у випадку рослини-регенеранта коефіцієнт розмноження є більшим, оскільки сформовану «дернину» (утворену шляхом вегетативного розмноження сукупність особин) через 3–3,5 місяці можна поділити на 5–6 частин. Вирощені з насіння

рослини через триваліший проміжок часу – 5–6 місяців, можна розділити лише на 3–4 частини [28].

Отже, на різних за складом живильних середовищах (В5, МС, МС/2 та ШХ) шляхом спонтанного непрямого органогенезу з калюсу пагонового та кореневого походження (від рослин з островів Дарбо, Галіндез, Скуа, Векий Ялур, Лехіл та мису Расмуссен) нами одержано пагони *D. antarctica*, вкорінено їх та підібрано умови для росту рослин-регенерантів [36].

Іншими дослідниками при індукції калюсоутворення з надземної частини і коренів *D. antarctica* також виявлено, що на середовищі МС, доповненому регуляторами росту 2,4-Д та БАП, із сформованого калюсу відбувалася регенерація пагонів. Низькі концентрації регуляторів росту у найбільшій мірі сприяли регенерації (відсоток регенерації досягав 99 %, середня кількість пагонів у розрахунку на калюсний інокулюм складала 25,4 [224].

Отже нами розроблено умови індукції та проліферації калюсу з різних типів експлантів рослин-донорів *D. antarctica* в умовах *in vitro*. Виявлено, 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 із корневих експлантів перевищували такі зі пагонових в 1,5–2 рази. Серед протестованих рослин з різних місць зростання на Аргентинських островах Антарктики (Галіндез, Скуа, Берселот, Дарбо, Великий Ялур) та мисі Расмуссен найбільш ефективно калюсоутворення відбувалося на експлантах рослин-донорів з о. Галіндез та о. Великий Ялур [36]. Досліджено особливості спонтанної регенерації пагонів *D. antarctica* з калюсу при вирощуванні в умовах освітлення (2500–3000 лк) на живильних середовищах В5, МС і ШХ, доповнених регуляторами росту 2,4-Д та БАП. Встановлено залежність ефективності органогенезу від мінерального складу живильного середовища та концентрацій регуляторів росту у 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 при культивуванні 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 регенерованих з калюсу рослин *D. antarctica* порівняно з рослинами, одержаними шляхом проростання насіння в умовах *in vitro* [36].

Результати, подані у даному розділі, опубліковано у таких працях:

Статті:

1. Введення в культуру *in vitro Deschampsia antarctica* з двох районів Прибережної Антарктики / **О.М. Загричук**, Н.М. Дробик, І.А. Козерецька, І.Ю. Панікоза, В.А. Кунах // Український антарктичний журнал – 2011/2012. – № 10–11. – С. 289–295.

2. Калюсогенез та регенерація рослин *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) в культурі *in vitro* / **О.М. Загричук**, А.І. Герц, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // Biotechnologia Acta. – 2013. – Vol. 6. – Р. 77–85.

Тези доповідей:

1. Введення в культуру *in vitro Deschampsia antarctica* з двох районів Прибережної Антарктики / **О.М. Загричук**, Н.М. Дробик, І.А. Козерецька, І.Ю. Панікоза, В.А. Кунах // Матеріали V Міжнародної Антарктичної конференції Антарктика і глобальні системи Землі: нові виклики та перспективи, 17–19 травня 2011. – Київ, 2011. – С. 209–211.

2. Особенности культивирования *in vitro Deschampsia antarctica* Desv. с разных мест произрастания в прибрежной Антарктике / **О.М. Загричук**, Н.М. Дробик, И.Ю. Парникоза, И.А. Козерецкая, В.А. Кунах // Материалы VI Международной научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)», 12–17 октября 2014 г.: тезисы докл. – Ялта, 2014. – С. 26–27.

3. Особливості введення в культуру *in vitro* рослин *Deschampsia antarctica* Desv. та вплив різних концентрацій йонів кадмію на їх ріст // **О.М. Загричук**, Г.Б. Гуменюк, Т.В. Гарбуз, В.Б. Чеховська, Н.М. Дробик // Концепція сталого розвитку та її реалізація в освіті: матеріали науково-практичної конференції, присвяченої 75-річчю ТНПУ імені Володимира Гнатюка та хіміко-біологічного факультету, 16–18 квітня 2015 р.: тези. – Тернопіль, 2015. – С. 36–37.

4. **Загричук О.М.** Особливості прямого та непрямого органогенезу *Deschampsia antarctica* Desv. *in vitro* / **О.М. Загричук**, Д.М. Семенюк, Н.М. Дробик // Тернопільські біологічні читання – Ternopil bioscience – 2017: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 20-річчю заснування наукового фахового видання України «Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія Біологія», 20–22 квітня 2017 р. – Тернопіль, 2017. – С. 250–254.

РОЗДІЛ 4

ГЕНЕТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ОТРИМАНИХ МІКРОКЛОНАЛЬНИМ РОЗМНОЖЕННЯМ РОСЛИН *D. ANTARCTICA*

Відомо, що система вирощування рослин в асептичних умовах на штучних живильних середовищах найбільш придатна для розмноження матеріалу в контрольованих умовах, забезпечує його захист від впливу факторів чужорідного середовища і забезпечує дотримання вимог біобезпеки [48]. *D. antarctica* – кущовий злак, багаторічна рослина, яка хоча і не має спеціальних пристосувань для вегетативного розмноження, може давати початок новим особинам шляхом партикуляції або розчленування існуючих дернин. Припускається також, що для цього виду головним шляхом колонізації нових територій в Антарктиці є вегетативне розмноження шляхом перенесення частин рослин птахами, що використовують їх як гніздовий матеріал [68, 169]. Завдяки таким біологічним особливостям *D. antarctica* вирощування рослини на штучних живильних середовищах і розмноження шляхом поділу дернини може стати оптимальним способом для отримання необхідного обсягу рослинного матеріалу в лабораторних умовах [11, 36].

Водночас, культивування на штучних живильних середовищах є значним стресом для рослини, який впливає на організм в цілому і може викликати певні зміни його спадкового матеріалу [48]. Такі зміни проявляються в формі метилювання ДНК, хромосомних перебудов, точкових мутацій, тощо. Крім того, вегетативне розмноження сприяє накопиченню соматичних мутацій. Раніше було запропоновано методику, яка дозволяє отримувати непрямі регенеранти із калюсної культури, та показано незначну генетичну мінливість отриманих рослин [224]. Проте цілеспрямованих досліджень генетичної мінливості *D. antarctica* за тривалого вегетативного

розмноження *in vitro* не проводилось.

Нами підібрано умови для проростання насіння та запропоновано методику мікроклонального розмноження *D. antarctica in vitro* [11]. З метою з'ясування можливості використання розробленої методики для отримання генетично однорідного рослинного матеріалу *D. antarctica* нами досліджено генетичну мінливість мікроклонально розмножених рослин цього виду із використанням ПЛР-аналізу та цитогенетичного аналізу [19].

Для визначення генетичної стабільності рослин *D. antarctica*, культивованих *in vitro*, провели порівняльний генетичний аналіз рослин, отриманих мікроклональним розмноженням, які культивували на живильному середовищі впродовж різного часу (від одного до 26 пасажів). Загалом було досліджено клональне потомство отриманих із насіння 5 рослин, які походили з островів Дарбо (генотип DAR12, DAR15), Галіндез (генотип G/D12-2a та G/D20) та Скуа (генотип S7), яке складалося із 23 зразків.

Для первинної характеристики використаного для досліджень рослинного матеріалу, було проведено молекулярно-генетичний та цитогенетичний аналіз вихідних рослин *D. antarctica*, отриманих із насіння. Генетичний поліморфізм оцінювали методом ISSR-аналізу із використанням 10 праймерів, назви та послідовності яких наведено у табл. 2.1. Застосовані праймери були підібрані раніше при дослідженні популяційно-генетичного різноманіття *D. antarctica* в Прибережній Антарктиці на основі оцінки показників інформативності за методикою, описаною в [229]. Загалом для цих зразків було враховано 106 ампліконів, 39 (35 %) з яких були поліморфними. Встановлено, що рослини відрізняються між собою за спектрами ПЛР-продуктів. Спектри ПЛР-продуктів вихідних рослин, отримані з деякими праймерами, наведено на рис. 4.1.

Значення попарних генетичних відстаней Жаккарда між різними генотипами, розраховані на основі результатів ISSR-аналізу, знаходилися в межах 0,145–0,277 (табл. 4.1).

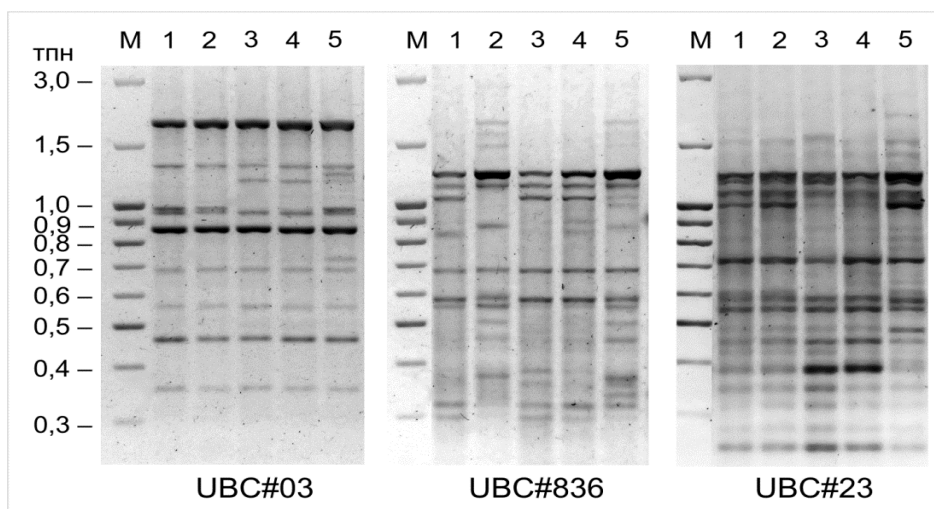


Рис. 4.1. Електрофоретичні спектри ПЛР-продуктів, які демонструють відмінності між дослідженими рослинами *Deschampsia antarctica*: 1, 2 – генотипи G/D12-2a та G/D20 (о. Галіндез); 3, 4 – генотипи DAR15 та DAR12 (о. Дарбо), відповідно; 5 – генотип S7 (о. Скуа), М – маркер молекулярної маси ДНК. Назви ISSR-праймерів наведено під електрофореграмами

Таблиця 4.1.

Генетичні відстані Жаккарда між рослинами *D. antarctica*, використаними для мікроклонального розмноження, розраховані за результатами ISSR-аналізу

Генотип	G/D12-2a (о. Галіндез)	G/D20 (о. Галіндез)	DAR15 (о. Дарбо)	DAR12 (о. Дарбо)	S7 (о. Скуа)
G/D12-2a	–				
G/D20	0,1446	–			
DAR15	0,1818	0,2553	–		
DAR12	0,1765	0,2135	0,1667	–	
S7	0,2577	0,2347	0,2451	0,2772	–

Цитогенетичний аналіз деяких з використаних в роботі рослин показав, що обидва зразки із о. Галіндез (генотипи G/D12-2a та G/D20) мають типовий для цієї рослини диплоїдний набір хромосом $2n = 26$. Водночас, у однієї із рослин з о. Дарбо (генотип DAR12) в кореневій меристемі поряд із клітинами з типовим набором хромосом знайдено клітини, які мали додаткові В-хромосоми, з числом хромосом $2n = 26+1(3)В$ (рис. 4.2, табл. 4.2) [102, 103, 237].

Підтвердження того, що це саме В-хромосоми, а не фрагменти хромосоми, було отримано в спеціально проведених дослідженнях [227].

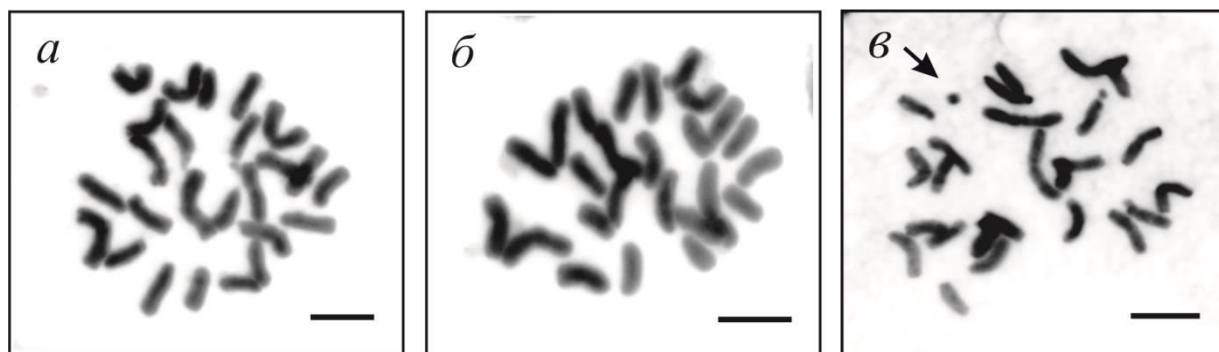


Рис. 4.2. Метафазні пластинки клітин апікальної меристеми кореня рослин *D. antarctica*: *a* – генотип G/D12-2a (о. Галіндез) – типовий набір хромосом ($2n=26$); *б, в* – генотип DAR12 (о. Дарбо): (*б*) – типовий набір хромосом ($2n=26$), (*в*) – набір з додатковою В-хромосомою ($2n=26+1B$). Стрілкою вказано В-хромосому. Масштаб – 10 мкм

Таблиця 4.2.

**Результати цитогенетичного аналізу рослин *D. antarctica*,
культивованих *in vitro***

Місце зростання вихідних рослин	Генотип	Досліджені корінці, шт.	Кількість корінців		Число хромосом, $2n^*$	Метафази із диплоїдним набором хромосом, %
			Диплоїдних, шт.	з додатковими хромосомами, шт.		
о. Галіндез	G/D20	6	6	—	26(19)	100
	G/D12-2a	1	1	—	26(8)	100
о. Дарбо	DAR12	5	4	1	26(12), 26+1B(1), 26+2B(1)	85,7±9,2

Примітка: * – у дужках наведено кількість вивчених метафаз.

Для оцінки впливу стресу, зумовленого культивуванням *in vitro*, на геном *D. antarctica* вивчали рослини, отримані мікроклональним розмноженням. Оскільки найбільший стрес при культивуванні рослин та рослинних тканин *in vitro* зазвичай припадає саме на початковий етап, коли відбувається адаптація до нових умов існування, ми, насамперед, провели дослідження генетичної мінливості рослин у динаміці впродовж перших 6–8 пасажів, здійснюючи відбір

матеріалу кожні 1–2 пасажі. Загалом було проведено молекулярно-генетичний аналіз 16 зразків (рослин) трьох генотипів (S7 – на 1, 2, 3, 4, 6, 8 пасажах, DAR15 – на 1, 2, 4, 6 пасажах та G/D20 – на 1, 2, 3, 4, 5, 6 пасажах). Нам не вдалося виявити жодних відмінностей між зразками (клонами) одного генотипу, що може свідчити про відсутність помітних генетичних змін на початкових етапах мікроклонального розмноження.

Для одного з генотипів (DAR12), який характеризувався наявністю клітин з додатковими В-хромосомами, були досліджені клональні варіанти рослини, які отримали після 8-го пасажу і продовжили культивувати окремо впродовж подальших 9 пасажів. Порівняльне дослідження 5 клонів між собою та з матеріалом, відібраним на 8-му пасажі, за допомогою ПЛР-аналізу також не виявило генетичних відмінностей ані між культивованими клонами, ані між клональними варіантами та вихідною рослиною.

З метою вивчення наслідків тривалого культивування *in vitro* для геному рослин провели порівняльний аналіз вихідних рослин *D. antarctica* трьох різних генотипів (G/D12-2а, DAR12 та G/D20), отриманих з насіння, та рослин-нащадків, які культивували впродовж 24–26 пасажів. Але навіть після такого тривалого культивування нами не виявлено змін в спектрах ПЛР-продуктів мікроклонально розмножених рослин як з нормальним каріотипом, так і тих, що мали анеуплоїдні клітини або клітини з додатковими В-хромосомами.

Цитогенетичні дослідження отриманих мікроклональним розмноженням рослин двох генотипів, які відрізняються між собою за кількістю хромосом: G/D12-2а (о. Галіндез) і DAR12 (о. Дарбо) (табл. 4.2), засвідчили відсутність мінливості у процесі тривалого культивування (57–79 пасаж) у клонованих рослини генотипу G/D12-2а ($2n = 26$) та появу на 49–70 пасажах невеликої кількості анеуплоїдних клітин ($2n = 27$ та $2n = 28$) у рослин генотипу DAR12 на додачу до клітин з додатковими В-хромосомами.

У результаті проведеної роботи методами молекулярно-генетичного та цитогенетичного аналізу досліджено генетичну мінливість культивованих *in*

vitro рослин *D. antarctica*, отриманих мікроклональним розмноженням [103].

Із використанням ISSR-аналізу було досліджено клональні варіанти рослин п'яти генотипів, які відрізнялися між собою за молекулярно-генетичними маркерами та цитогенетичними характеристиками. Три з цих генотипів були досліджені на початковому етапі культивування, який, як вважають, характеризується найбільшим стресовим впливом на рослинний організм. Крім того, було проаналізовано вихідний рослинний матеріал та клональні варіанти одного із генотипів, які культивували окремо впродовж 9 пасажів. Для трьох генотипів проведено порівняльний аналіз вихідних рослин, отриманих із насіння, та їх клональних варіантів, які культивували *in vitro* впродовж 24–26 пасажів. У жодному з цих порівняльних аналізів нами не виявлено генетичних відмінностей ані між клонами та вихідним генотипом, ані між самими клональними варіантами [19, 102].

Аналіз вихідних рослин показав, що деякі з них відрізняються за цитогенетичними параметрами. Два генотипи (G/D12-2a та G/D20) містили типовий для виду набір хромосом $2n=26$, тоді як у рослин генотипу DAR12 у кореневій меристемі спостерігали анеуплоїдні клітини та клітини з додатковими В-хромосомами. В-хромосоми зустрічаються у каріотипі достатньо великої кількості покритонасінних рослин [49, 247]. Вважають, що варіабельність числа В-хромосом може відігравати значну роль в еволюційно значимій мінливості кількості гетерохроматину [179]. Було показано, що наявність В-хромосом асоційована з підвищеною частотою мутацій в А-хромосомах [261] і може сприяти міжклітинним хромосомним міграціям (цитоміксису), що приводить до зміни числа хромосом в клітинах [243]. Роль додаткових хромосом остаточно не з'ясована, однак припускають, що в певних випадках, а саме в несприятливих умовах за дії різноманітних стресових чинників, вони можуть мати адаптивне значення завдяки здатності підвищувати мінливість геному і відповідно поліморфізм популяції рослин. На користь цього припущення свідчать такі факти: рослини з додатковими В-хромосомами частіше виявляють в субоптимальних чи екстремальних умовах

зростання [49]; такі рослини характеризуються підвищеною стійкістю до посухи та низьких температур [90, 101].

Порівняння цитогенетичних параметрів клональних рослин двох генотипів (G/D12-2a та DAR12), які культивували *in vitro* упродовж 49–79 пасажів, показало, що на відміну від рослин з типовим для виду хромосомним набором $2n=26$, у яких при тривалому культивуванні та вегетативному розмноженні не спостерігали змін числа хромосом, у рослин з додатковими В-хромосомами виявлено хромосомну мінливість, а саме зміни відсотку клітин з В-хромосомами, а також анеуплоїдних клітин з числом хромосом $2n=27$ та 28 [19, 102]. Досліджень, які б дозволили з'ясувати вплив на рівень хромосомної мінливості початкових етапів культивування нами, на жаль, не проводилося, однак, очевидно, що рослини із додатковими хромосомами характеризуються підвищеною мінливістю геному. Водночас, за тривалого культивування *in vitro* відсоток клітин з типовим числом хромосом у таких рослин варіює в певних межах і залишається порівнюваним з вихідними рослинами. Отже, це дозволяє зробити висновок про те, що, незважаючи на незначні зміни, які виявлено для генотипу DAR12 з додатковими В-хромосомами, застосована методика мікроклонального розмноження у цілому забезпечує збереження цитогенетичних характеристик рослин.

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших досліджень генетичної мінливості рослин, отриманих мікроклональним розмноженням. Зокрема, молекулярно-генетичний аналіз рослин *Gerbera jamesonii* Bolus [171], *Swertia chirayita* [206], *Allium ampeloprasum* L. [156], трьох сортів банана (*Musa spp.*) [180], п'яти високорослих сортів чорниці, двох брусниці і шести малини [223], *Trichodesma indicum* (L.) [254], показав ідентичність профілів ПЛР-продуктів, отриманих із використанням RAPD- та ISSR-праймерів для клонів, мікроклонально розмножених *in vitro*, та вихідної рослини. При дослідженні клонованих *in vitro* рослин цінного лікарського виду *Viola pilosa* за допомогою RAPD і ISSR маркерів показано відсутність у

них соматоклональної мінливості [266]. Не виявлено мінливості за даними RAPD-аналізу і серед мікроклонів лікарської рослини *Satureja avromanica*, яка знаходиться під загрозою зникнення в Ірані, що дозволило авторам рекомендувати розроблені протоколи мікроклонування для масштабного розмноження і збереження виду [235].

Таким чином, із використанням ISSR-аналізу та цитогенетичного аналізу показано збереження молекулярно-генетичних та цитогенетичних характеристик у клонального потомства *D. antarctica* в процесі тривалого культивування *in vitro* згідно із запропонованою нами раніше методикою [19, 102]. Ці результати свідчать про можливість та доцільність використання розробленого нами способу отримання рослин *D. antarctica* мікроклональним розмноженням *in vitro*.

Результати, подані у даному розділі, опубліковано у таких працях:

Статті:

1. Цитогенетичний аналіз рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з Прибережної Антарктики / Д.О. Навроцька, М.О. Твардовська, І.О. Андрєєв, **О.М. Загричук**, І.Ю. Парнікоза, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 184–190.

2. New forms of chromosome polymorphism in *Deschampsia antarctica* Desv. from the argentine islands of the maritime antarctic region / D.O. Navrotska, M.O. Twardovska, I.O. Andreev, I.Yu. Parnikoza, A.A. Betekhtin, **О.М. Zahrychuk**, N.M. Drobyk, R. Hasterok, V.A. Kunakh // Український антарктичний журнал – 2014. – № 13. – С. 185–191.

3. Генетична стабільність отриманих мікроклональним розмноженням рослин *Deschampsia antarctica* Desv. за тривалого культивування *in vitro* / К.В. Спірідонова, І.О. Андрєєв, **О.М. Загричук**, Д.О. Навроцька, М.О. Твардовська, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // Фізіологія рослин і генетика. – 2016. – Т. 48, №6. – С. 498–507.

Тези доповідей:

1. Цито- та молекулярно-генетичні дослідження отриманих мікроклональним розмноженням рослин *Deschampsia antarctica* Desv. за тривалого культивування *in vitro* / К.В. Спірідонова, І.О. Андреев, Д.О. Навроцька, **О.М. Загричук**, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // VIII Міжнародна Антарктична Конференція, присвячена 25-ій річниці приєднання України до Договору про Антарктику (17 вересня 1992 р.), 16–18 травня 2017 р. – Київ, 2017. – С. 98–99.

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЙОНІВ КАДМІЮ НА РОСЛИНИ

D. ANTARCTICA IN VITRO

Останнім часом встановлено широкі межі варіювання вмісту біогенних елементів та важких металів у верхньому органогенному шарі педосфери островів, прилеглих до західного узбережжя Антарктичного півострова. Значне потепління в регіоні Антарктичного півострова і пов'язане з цим танення льодовиків супроводжується опрісненням поверхневого шару води в Прибережній Антарктиці [4]. У результаті знижується комплексоутворююча здатність ВМ і, як наслідок, підвищується рухливість їх йонних форм. У порівнянні з фоновими аналогами, у ґрунтових субстратах антарктичних оазисів, що піддаються антропогенному впливу (об'єкти будівельної і дорожньої інфраструктури антарктичних станцій), у 3–10 разів перевищені концентрації As, Pb, Cs і Cd [1].

Спричинене значним потеплінням підвищення міграційної здатності елементів відображається на накопиченні їх біотою. Рослини, будучи ключовою, активною ланкою трофічних ланцюгів, поглинають макро- та мікроелементи, залучаючи їх до участі у метаболічних процесах. При цьому слід зазначити, що підвищення температури забезпечує прискорення процесів метаболізму рослинних організмів, а це, в свою чергу, відображається на поглинанні та зв'язуванні ними йонів ВМ [18, 46, 123].

Останнім часом увагу дослідників привертає здатність рослин Антарктики, зокрема *D. antarctica*, зростати в умовах доволі високих концентрацій важких металів.

Серед ВМ значну токсичність виявляє є кадмій, якому властиві високі темпи нагромадження в біосфері; він не належить до необхідних для рослин елементів, однак інтенсивно поглинається як кореневою системою, так і листками рослин [21, 95, 104]. Вченими досліджено, що кадмій досить поширений у Прибережній Антарктиці ВМ; його вміст відрізняється у ґрунтових субстратах з різних островів і коливається від 0,04 до 38,7 мг/кг сухої речовини [18, 46, 190]. Кадмій належить до першої категорії токсичності за ступенем дії на біоту [10, 22]. Цьому елементу притаманна висока рухливість у рослинах, він може транспортуватись як по ксилемі, так і по флоемі, а для кінетики його поглинання характерна мультифазність, кількість фаз передусім визначається діапазоном концентрацій катіону металу та видовими особливостями рослин [207].

Для з'ясування особливостей стійкості рослин Антарктики до ВМ було проведено дослідження їх впливу на різні параметри рослин. Проведені нами дослідження засвідчили збереження молекулярно-генетичних та цитогенетичних характеристик у клонального потомства *D. antarctica* в процесі тривалого культивування *in vitro*. Це дало можливість використати отримані мікроклональним розмноженням рослини для з'ясування впливу різних концентрацій йонів Кадмію на їх фізіологічні та молекулярно-генетичні характеристики даного виду.

5.1. Вплив йонів Кадмію на ріст рослин

Для визначення концентрацій йонів Кадмію, за яких відбувається ріст рослин та визначення граничних концентрацій, що призводять до зупинки росту та наступної загибелі, *D. antarctica* вирощували за концентрацій йонів Cd^{2+} від 0,1 мМ до 20 мМ [29, 72].

У результаті дослідження впливу різних концентрацій йонів Кадмію виявлено, що токсична дія цього ВМ концентрацією 1,5–20 мМ на рослини *D. antarctica* проявлялася вже через 7 діб культивування. Про це свідчили

морфологічні зміни дослідних рослин: пагони мали світліше, порівняно з контролем, забарвлення, частина з них була згорнута в трубочку, ріст рослин не відбувався; молоді пагони та корені не формувалися. У місцях контакту пагона з живильним середовищем відбувалося виділення непрозорої рідини, що можна оцінити як специфічну захисну реакцію клітин на дію йонів Кадмію. Саме такі фітопаталогічні зміни є типовими при отруєнні рослин кадмієм [7, 98, 131, 207].

Упродовж 3–4 тижнів вирощування на живильному середовищі з наведеними вище концентраціями йонів Cd^{2+} відбувалося зменшення сирої маси рослин на 20–70 %, сухої – на 23–70 %; пагони рослин втрачали зелене забарвлення, листки скручувалися. На живильних середовищах з високими концентраціями йонів Кадмію (5–20 мМ) рослини гинули через 3 тижні, на нижчих (1,5–5 мМ) – через 4 тижні культивування [29, 72] (рис. 5.1).

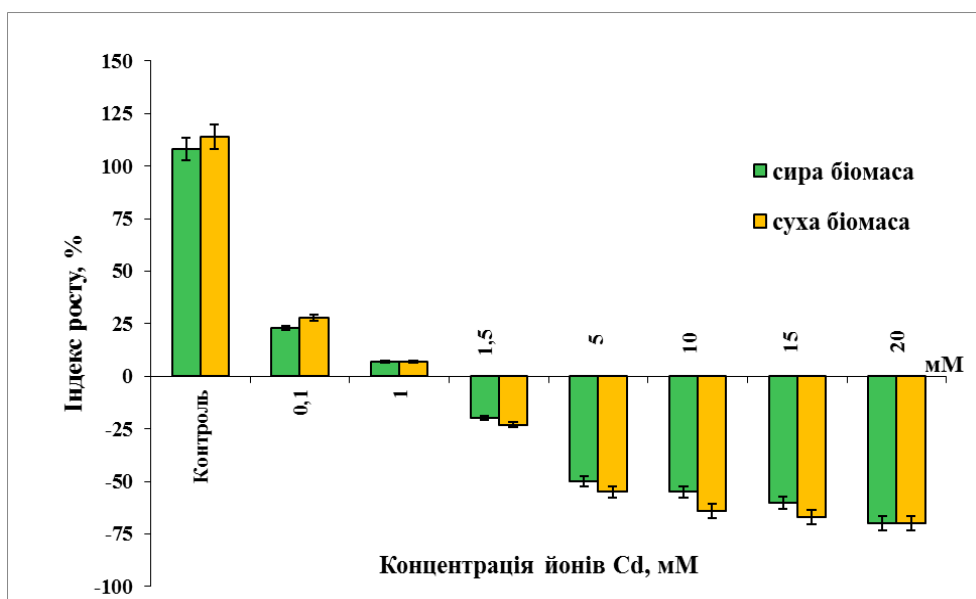


Рис. 5.1. Індекс росту сирої та сухої біомаси *D. antarctica* за культивування упродовж 4 тижнів у живильному середовищі з різними концентраціями Cd^{2+}

Рослини, які культивували у живильних середовищах, доповнених 1,5 мМ Cd^{2+} , через 4 тижні починали формувати потовщені, опушені з бурим відтінком ослизнені корені довжиною 2–5 мм. Рослини значно відставали в

рості порівняно з контрольними варіантами. В окремих випадках починали рости молоді пагони, у той же час пагони висаджених рослин втрачали зелене забарвлення і відмирили. Після 6 тижнів культивування корені темніли, заново сформовані пагони знебарвлювалися, рослини гинули. Сира біомаса за період культивування (6 тижнів) зменшувалась на 10–25 %, а суха – на 40–70 % [26, 29] (рис. 5.1).

На живильних середовищах з вмістом йонів Кадмію 0,1–1 мМ упродовж 3–4 тижнів рослини поступово адаптовувалися до існування в присутності металу: відновлювали свій ріст, формували молоді корені та пагони. У той же час, у контрольних рослинах зазначені вище зміни відбувалися вже на 7–10 доби культивування. Довжина молодих коренів дослідних рослин через 3–4 тижні сягала 6–8 мм і була в 1,5–2 рази меншою порівняно з контролем через такий же проміжок культивування; висота молодих сформованих пагонів складала 35–40 мм, що в 1,2–1,5 рази менше порівняно з контролем (рис. 5.2, рис. 5.3). Приріст сирої та сухої маси дослідних рослин через 3–4 тижні культивування був незначним – до 10 % (1 мМ Cd^{2+}) та 25 % (0,1 мМ Cd^{2+}), тоді як біомаса контрольних рослин за аналогічний період зросла майже вдвічі [29] (рис. 5.2).

Упродовж наступних 4 тижнів ріст як контрольних, так і дослідних (0,1–1 мМ Cd^{2+}) рослин був інтенсивнішим. Приріст сирої та сухої біомаси рослин, культивованих в присутності йонів Кадмію, збільшився на 25–75 %, у контролі – зріс в 4 рази. Довжина коренів у дослідних рослинах сягала 22–25 мм, а в контрольних – 25–32 мм; контрольні рослини мали значно розгалуженішу кореневу систему (рис. 5.2, рис. 5.3).

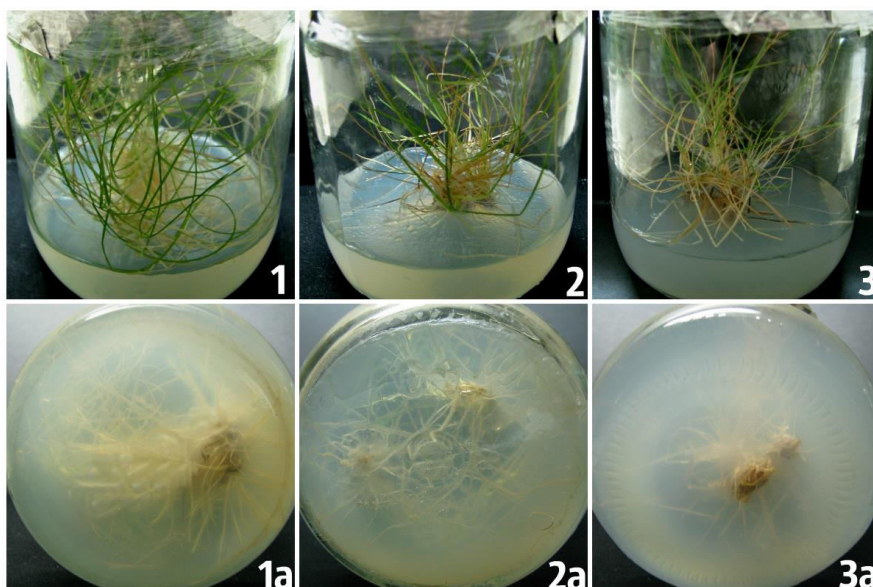


Рис. 5.2. Ріст надземної частини та коренів чотирьохтижневої рослини *D. antarctica* при додаванні солей Кадмію: 1, 1a – контроль: надземна частина та корені; 2, 2a – рослина з вмістом йонів Cd^{2+} 0,1 мМ: надземна частина та корені; 3, 3a – рослина з вмістом Cd^{2+} 1 мМ: надземна частина та корені

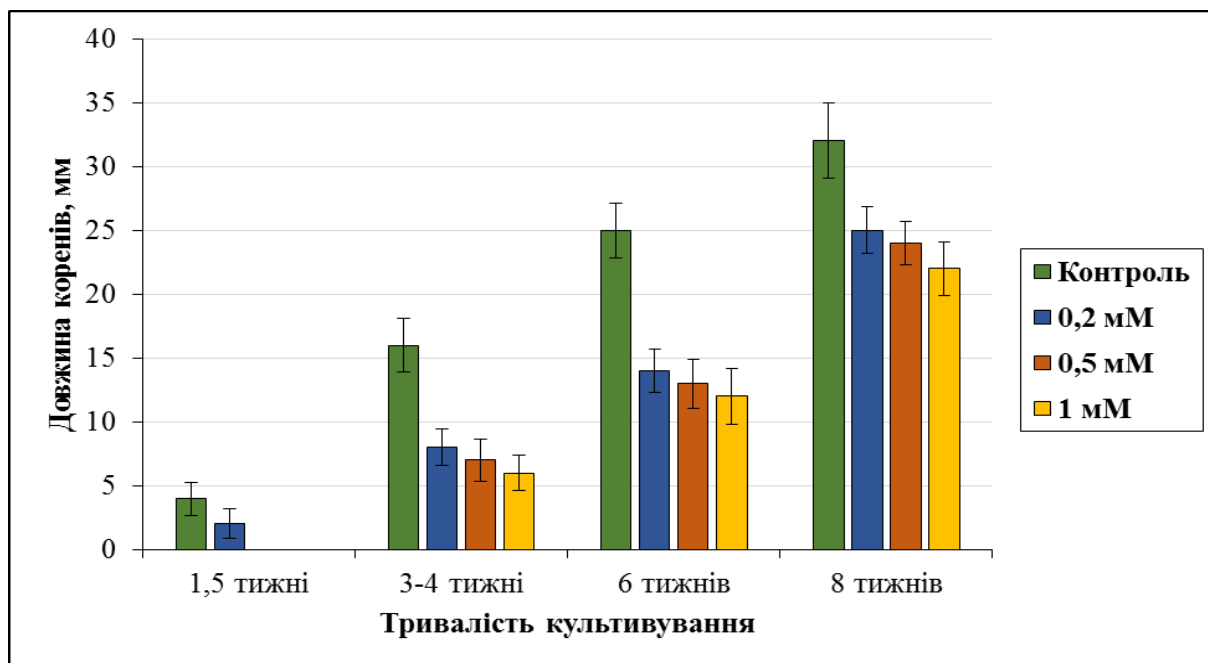


Рис. 5.3. Зміна довжини коренів культивованих *in vitro* рослин *D. antarctica* упродовж 8 тижнів за присутності у живильному середовищі різних концентрацій йонів Cd^{2+}

За морфологічними ознаками рослини, які впродовж восьми тижнів культивували на середовищі з металом, не відрізнялися від контрольних [26]. Ймовірно, використання невисоких концентрацій йонів Кадмію стимулює вироблення рослинами адаптаційних механізмів, що забезпечує нормалізацію їх росту і розвитку впродовж восьми тижнів дії йонів металу.

Отже, нами досліджено вплив широкого діапазону концентрацій (0,1–20 мМ) йонів Cd^{2+} на культивовані *in vitro* рослини *D. antarctica*. З'ясовано, що граничною концентрацією, за якої ще відбувається ріст і розвиток рослин, є 1 мМ. У наших дослідженнях на живильних середовищах з вмістом солей Кадмію 0,1–1 мМ упродовж 3–4 тижнів відбувається поступова адаптація рослин до існування в присутності металу. За вищих концентрацій йонів Cd^{2+} рослини гинули через 3 тижні (5–20 мМ Cd^{2+}) або 4–6 тижнів (1,5–5 мМ Cd^{2+}).

5.2. Накопичення йонів Кадмію у рослинах з різних локалітетів

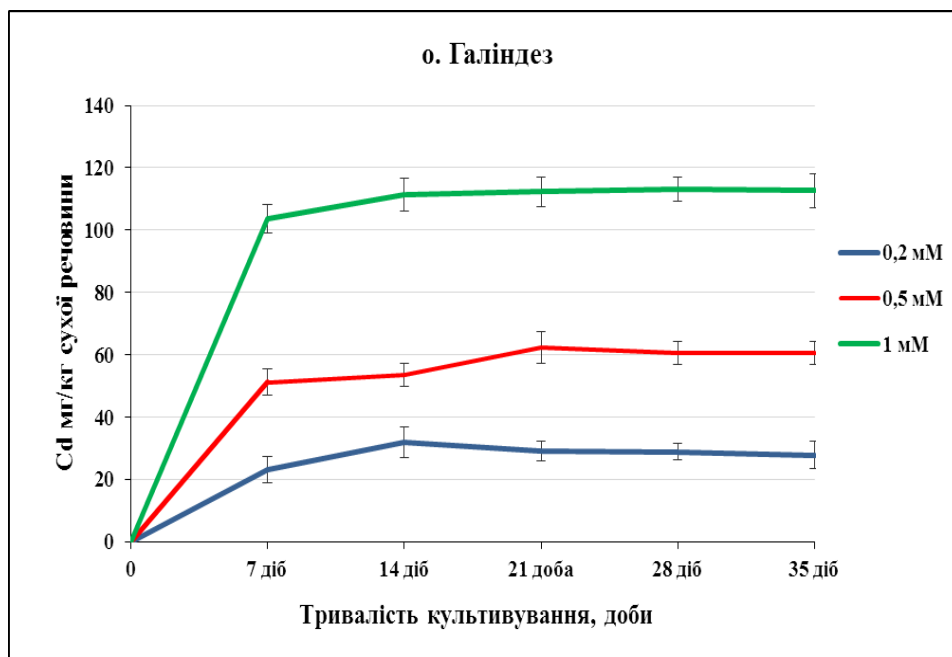
За даними науковців, що вивчали природу Антарктики, на різних островах в ґрунтових субстратах містяться різні концентрації ВМ, у тому числі і йонів Кадмію. Зокрема, на о. Великий Ялур вміст кадмію в 6–10 разів більший, ніж на о. Галіндез [6, 18, 190].

Тому, наступним завданням роботи було дослідити у розроблених нами модельних умовах *in vitro* особливості акумулювання йонів Кадмію мікроклонально розмнуженими рослинами з різних локалітетів Прибережної Антарктики.

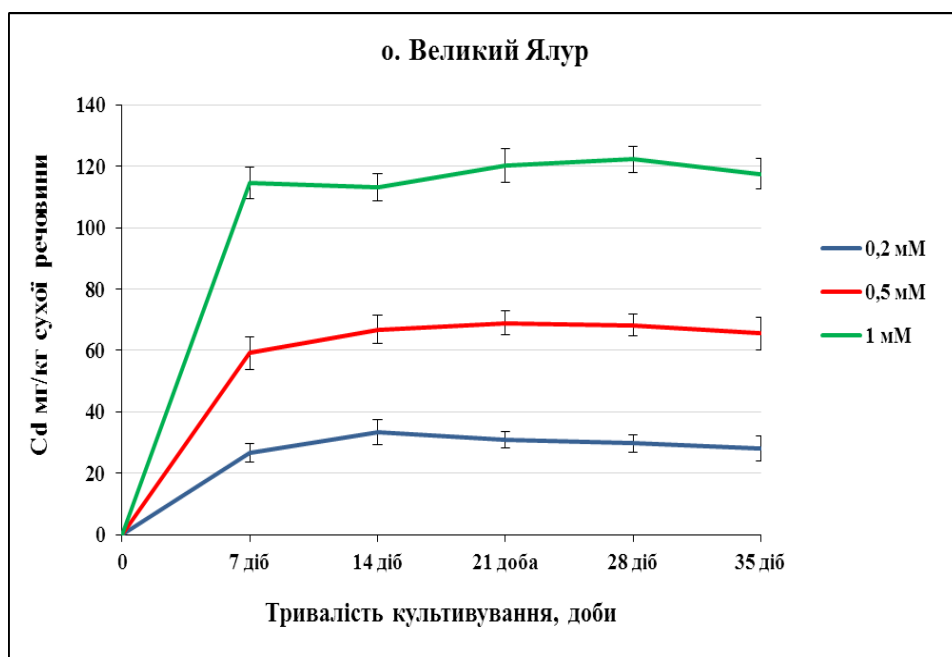
При культивуванні рослини *D. antarctica* з о. Галіндез (генотип G/D12-2a) у живильних середовищах, доповнених різними (0,2, 0,5 та 1 мМ) концентраціями солей Кадмію, практично у всіх випадках спостерігали найбільше накопичення цього металу впродовж перших семи діб. За невисокої концентрації (0,2 мМ) упродовж першого тижня культивування рослини акумулювали йони Кадмію в кількості 23,2 мг/кг сухої речовини, а за наступних 7 діб вміст йонів металу зріс на 37,5 % (до 31,9 мг/кг сухої

речовини рослини). Упродовж 14 діб відбувається адаптація рослин до росту у присутності 0,2 мМ йонів Кадмію. Починаючи з 14 доби і до закінчення дослідів, достовірного підвищення вмісту токсиканта у рослинах не виявлено (рис. 5.4, А). При доповненні живильного середовища 0,5 мМ йонів Кадмію упродовж перших 7 діб рослинами *D. antarctica* було накопичено кадмію в кількості 51,2 мг/кг сухої речовини. На 21 добу вміст Cd^{2+} у рослинах був максимальним і залишався без помітних змін до 35 доби (рис. 5.4, А). При підвищенні концентрації йонів Кадмію до 1 мМ на 7 добу у рослинах накопичувалося кадмію в кількості 103,7 мг/кг сухої речовини, до 14 доби вміст токсиканта зріс на 7,5 %, на 28 добу – досягав максимуму (113,2 мг/кг сухої речовини). До закінчення дослідів достовірного підвищення вмісту токсиканта у рослинах не виявлено (рис. 5.4, А) [73].

При дослідженні впливу різних концентрацій йонів Cd^{2+} на рослини *D. antarctica* з о. Великий Ялур (генотип Y66) (рис. 5.4, Б), як і у випадку рослин з о. Галіндез, спостерігали найбільше накопичення цього металу впродовж перших семи діб. При доповненні живильного середовища 0,2 мМ йонів Кадмію рослини *D. antarctica* за перші 7 діб накопичували йонів Кадмію в кількості 26,5 мг/кг сухої речовини. Впродовж наступних 7 діб вміст йонів Кадмію зріс на 7 мг/кг сухої речовини і досягнув максимуму. З 14 доби і до закінчення дослідів підвищення вмісту токсиканта у рослинах не виявлено. При підвищенні концентрації йонів Кадмію до 0,5 мМ рослини на 7 добу поглинали 59,2 мг/кг сухої речовини, на 14 добу – вміст Cd^{2+} зростав на 13 %, з 14 до 21 доби – лише на 3 % і був максимальним у цьому варіанті дослідів. За умови додавання у живильне середовище 1 мМ йонів Кадмію, рослини впродовж перших семи діб акумулювали Cd^{2+} в кількості 114,7 мг/кг сухої речовини. До 28 доби ця кількість була максимальною – 122,3 мг/кг сухої речовини, і до завершення дослідів практично не змінювалася (рис. 5.4, Б). Із збільшенням концентрації йонів Кадмію у живильному середовищі у 2,5 рази (з 0,2 мМ до 0,5 мМ) та у 2 рази (з 0,5 до 1 мМ) нами відзначено прямо пропорційне зростання вмісту токсиканта у рослинах (рис. 5.4) [73].



A



B

Рис. 5.4. Динаміка накопичення кадмію (мг/кг сухої речовини) у рослинах *D. antarctica* з о. Галіндез (G/D12-2a) (A) та о. Великий Ялур (Y66) (B) упродовж 7, 14, 21, 28, 35 діб культивування за присутності у живильному середовищі 0,2 мМ, 0,5 мМ та 1 мМ Cd²⁺

Отже, нами проаналізовано поглинання йонів Cd^{2+} рослинами *D. antarctica* з островів Галіндез та Великий Ялур упродовж 7, 14, 21, 28 та 35 діб культивування *in vitro* у живильному середовищі з різними концентраціями йонів Cd^{2+} . Суттєвих відмінностей щодо його акумулювання культивованими *in vitro* рослинами з цих локалітетів не виявлено. В обох випадках за впливу різних концентрацій йонів металу основна кількість йонів Кадмію накопичується впродовж перших семи діб культивування на середовищі з металом [73]. Підвищення концентрації йонів Cd^{2+} в діапазоні 0,2–1 мМ у живильному середовищі, на нашу думку, є причиною збільшення тривалості встановлення динамічної рівноваги вмісту кадмію у середовищі та всередині клітини: при 0,2 мМ Cd^{2+} – з 14 доби, 0,5 мМ Cd^{2+} – з 21 доби, 1 мМ Cd^{2+} – з 28 доби.

На основі проведених нами досліджень встановлено, що *D. antarctica* є стійкою до йонів Кадмію: пригнічення росту культивованих *in vitro* рослин цього виду відбувається при концентраціях Cd^{2+} від 0,1 мМ (11,2 мг/л) і вище, а припинення росту та загибель рослин – за концентрацій 1 мМ (112 мг/л) і вище. Аналіз літературних даних показав, що токсичний вплив йонів Кадмію на більшість рослин проявляється при значно нижчих концентраціях – 4–20 мкМ. При цьому слід зазначити, що гранично допустима концентрація кадмію у ґрунті становить 3 мг/кг [76, 79, 97].

Вивчення впливу широкого діапазону концентрацій кадмію (від 4 до 200 мкМ) на рослини кукурудзи впродовж 6 діб показало, що цей ВМ викликає уповільнення росту рослин навіть при найменшій з використаних концентрацій – 4 мкМ [39]. Зменшення сирої та сухої маси рослин спостерігалось за концентрацій токсиканта від 20 мкМ до 200 мкМ. Пригнічення росту рослин кукурудзи після 31 доби стресу було більше, ніж після 6-ти діб стресу. Рослини, що піддавались впливу 20 мкМ кадмію упродовж 6 діб, за висотою відставали від контрольних рослин на 25,3 %, а упродовж 31 – на 55,7 %. Найбільша з використаних концентрацій кадмію (200 мкМ) викликала зниження висоти рослин до 46,6 % щодо контролю при

короткотривалому впливі, і до 20,7 % – за 31 добу впливу. Накопичення маси пагонів і коренів, як і при короткотривалому впливі, зменшувалось більше, ніж лінійний ріст рослин (у присутності 200 мкМ Кадмію сира маса пагонів і коренів знижувалася від 3,3 % до 7,4 % від контролю) Летальний ефект Кадмій викликав в концентрації 250 мкМ. Перші випадки загибелі рослин кукурудзи спостерігалися тільки після 8 діб впливу ВМ, а масова загибель починалася з 18 доби стресу, досягаючи 42 % на 31 добу. Загибель 50 % рослин відбувалася після 34 діб впливу [39].

У трьох видів рослин, які відрізнялися за здатністю акумулювати в своїх тканинах кадмій, *Thlaspi caerulescens* J.Presl & C.Presl, *Thlaspi arvense* L. та *Lactuca sativa* L., явні морфологічні ознаки токсичного впливу спостерігали після культивування з 10 і 100 мкМ Cd^{2+} упродовж 28 діб [175]. Йони Кадмію викликали пожовтіння і деформацію листків та пригнічували ріст коренів картоплі *Solanum tuberosum* L. при концентрації 7,5 мкМ упродовж одного тижня, а при концентрації 5 мкМ – упродовж двох тижнів культивування [62]. У помідора *Lycopersicon esculentum* 10–12 діб вирощування в присутності 10 мкМ важкого металу викликали симптоми хлорозу, а 100 мкМ – некротичні плями на листі, при обох концентраціях спостерігали побуріння коренів [133].

При вирощуванні пшениці та кукурудзи на піщаній культурі з вмістом кадмію хлориду 25 мг/кг упродовж 28 діб виявлено значне нагромадження кадмію в коренях. Акумуляція цього токсиканта в коренях пшениці була у 12 разів вищою, ніж у надземній частині рослин; вміст кадмію в коренях кукурудзи був вдвічі більший, ніж у пагонах [43].

У наших дослідженнях на живильних середовищах з вмістом йонів Cd^{2+} 0,1–1 мМ упродовж 3–4 тижнів спостерігається поступова адаптація рослин до існування в присутності йонів металу. Аналогічні результати були отримані для проростків пшениці, обробка яких солями Плюмбуму і Кадмію в низьких концентраціях індукувала підвищення їх стійкості до впливу металів, дозволяла надалі переносити без пошкодження і з меншим пригніченням ростових процесів дію високих концентрацій цих токсикантів

[54]. Під час вивчення впливу солей ВМ (у тому числі Кадмію) на біологічні показники злаків, дослідниками встановлено, що рослини, які вирости з насіння, обробленого незначними дозами токсикантів, що викликали активне включення захисних механізмів, характеризувалися вищими темпами росту і розвитку [34]. Згідно з А. Ф. Тітовим, при невисоких концентраціях ВМ зміни, які спостерігаються в рослинах, не порушують основні фізіологічні процеси, а іноді навіть викликають активізацію частини з них [95, 98].

У наших же дослідженнях із збільшенням концентрації йонів Cd^{2+} до 1,5–20 мМ негативний вплив на рослини *D. antarctica* проявлявся вже через 7 діб культивування. Типовими наслідками впливу йонів Кадмію на культивовані *in vitro* рослини *D. antarctica* були: пригнічення росту коренів і надземної частини, зменшення приросту біомаси, хлороз пагонів, згортання пагонів у трубочки, ослизнення коренів, їх почорніння та відмирання, утворення непрозорої рідини у місцях контакту пагонів із середовищем з високим вмістом йонів Кадмію.

Подібний ефект кадмію спостерігали й інші дослідники. Зокрема, негативний вплив кадмію на рослини *Glycine max* (L.) Merr. візуально виявлявся у пригніченні їхнього росту, хлорозі листків, почорнінні апексів коренів, що, на думку авторів, є наслідками порушення фізіологічних процесів [260]. Дія кадмію виявлялася у пригніченні росту коренів сої і почорнінні їхніх апексів, що може свідчити про метал-індуковане окиснення різноманітних фенолів у коренях (а вони, як відомо, є ендогенними інгібіторами росту), або може бути наслідком оксидного стресу [99, 170, 176]. При вивченні впливу йонів Кадмію, Цинку та Плюмбуму на рослини деяких видів родини *Roaceae* іншими науковцями було виявлено значне зменшення (порівняно з контрольним варіантом) висоти рослин та зниження накопичення біомаси надземних органів [98]. Так, під дією металу (концентрація 25, 50, 100 и 200 мг/кг субстрату) суттєво знижувалася висота головного пагона, накопичення сирогої та сухої біомаси пагонів *Phleum pratense* L. [16]. При проведенні досліджень дії сульфату кадмію в діапазоні

концентрацій від 100 до 2000 мкМ на ростові параметри пшениці встановлено, що за таких умов приріст пагонів рослин за 7 діб зменшувався, складаючи, залежно від його концентрацій, 32 % і менше. У той же час як у контролі приріст досягав приблизно 70 % [84].

При культивуванні кукурудзи впродовж 31 доби з вмістом 20, 80 і 200 мкМ Кадмію помітно сповільнювався розвиток рослин. Це проявлялося у зменшенні кількості листків на рослині із зростанням концентрації кадмію [39]. Крім прямої дії, кадмій може гальмувати ріст рослин і опосередковано. При цьому встановлено, що найбільш чутливим до даного металу є фотосинтез [16, 124]. При оцінці впливу кадмію на фотосинтетичний апарат рослин, авторами було виявлено, що під дією цього металу помітно зменшується площа листової пластинки і знижується вміст зелених пігментів [39, 82]. Значний вплив ВМ відзначається на світлові реакції фотосинтезу та на функціональну цілісність фотосистем, зокрема фотосистеми II [95, 98].

Іншими авторами виявлено, що у присутності ацетату кадмію у високих концентраціях (800 і 1000 мг/кг субстрату) ріст і розвиток однорічних злаків припиняються вже на початкових етапах онтогенезу, закладання та формування нових органів не відбувається. Вчені припускають, що за впливу таких високих концентрацій порушується процес вибіркового поглинання йонів, потік токсичних йонів Кадмію безперешкодно надходить в рослини, і механізми детоксикації вже не можуть впоратися з ним. У результаті припиняється поділ клітин, спостерігається неузгодженість основних фізіологічних процесів, унаслідок чого, очевидно, відбувається перерозподіл пластичних і енергетичних ресурсів у рослині. В результаті, ріст і розвиток злаків припиняються і відтак, вони гинуть [35].

У результаті вивчення впливу Плюмбуму і Кадмію на ріст і розвиток рослин ячменю і вівса, авторами зроблено висновок про те, що негативний вплив цих ВМ обумовлений комплексом фізіологічних змін, головною з яких, в умовах проведених авторами дослідів, були: уповільнення росту кореневої системи, що призводить до порушення мінерального живлення, і

зміни функціонування листкового апарату, пов'язані зі зменшенням кількості зелених пігментів. Поряд із цим, у результаті дії різних захисно-приспосувальних механізмів рослини ячменю і вівса здатні розвиватися в присутності досить високих концентрацій йонів Плюмбуму і Кадмію, що свідчить про їх металостійкість [35].

У численних лабораторних, вегетаційних і польових дослідках з різними видами (сортами, генотипами) показано, що під впливом ВМ у рослин зменшуються лінійні розміри коренів і пагонів, знижується накопичення біомаси, зменшується кількість бічних коренів та відбувається відмирання кореневих волосків [95]. Саме пригнічення росту коренів є першою ознакою їх гострого отруєння кадмієм [137; 183], адже клітини кореня першими зазнають згубної дії йонів цього металу [60]. Гальмування росту коренів під впливом кадмію та інших ВМ є типовим і пояснюється зменшенням швидкості як поділу клітин, так і їхнього росту розтягненням [87].

У меристематичних клітинах коренів високі концентрації ВМ призводять до цитогенетичних порушень, таких як спіралізація хромосом, нерівномірність їх розходження до полюсів клітини або повна відсутність розходження, поява тетраплоїдних клітин [24, 95, 134, 276]. У присутності ВМ виявлено розриви ниток ДНК, хромосомні аберації, порушення регуляції експресії генів [95, 98, 112]. Дослідниками також встановлено, що мікрофіламенти є однією з внутрішньоклітинних мішеней Cd^{2+} при реалізації клітинних механізмів його фітотоксичності. У природних умовах у ризосфері рослинами, наприклад, сорго, пшениці [258] виділяється велика кількість різних сполук (органічні кислоти, амінокислоти, феноли, фітосидерофори, пептиди, ферменти), що можуть перешкоджати поглинанню коренями рослин деяких металів, які не є життєво необхідними для рослин, шляхом зв'язування йонів цих металів у ризосфері [191]. Також аналогічно, зменшувати негативний вплив ВМ на рослини можуть ризобактерії (*Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*,

Pseudomonas, Rhizobium, Serracia), які можуть зв'язувати токсичні йони у своїй клітинній стінці [187, 191].

При проведенні досліджень нами виявлено суттєвіший вплив йонів Кадмію на формування та ріст коренів, порівняно з надземною частиною рослин. За вмісту йонів Кадмію в концентрації 1,5–20 мМ корені у висаджених рослин не формувалися, а наявні корені темніли і гинули.

Рослини, культивовані на живильних середовищах, доповнених солями Кадмію в кількості $1 \text{ мМ} < \text{Cd}^{2+} \leq 1,5 \text{ мМ}$, через 4 тижні починали формувати потовщені, опушені з бурим відтінком ослизнені корені довжиною 2–5 мм. Відомо, що слиз, який виділяється клітинами кореня і вкриває його поверхню, також обмежує проникнення кадмію у клітини, тобто виконує захисну функцію [62, 98]. Очевидно, у нашому випадку підвищення концентрації йонів Кадмію у живильному середовищі призводило до залучення додаткового механізму захисту у вигляді виділення клітинами кореня слизу та виділення непрозорої рідини у місцях контактів кореня з живильним середовищем. Одним із чинників, що зумовлюють стійкість рослин, очевидно є синтез у них фенольних сполук [40, 42, 239, 272]

5.3. Мутагенна дія йонів Кадмію на отримані мікроклональним розмноженням рослини

Мутагенний вплив йонів Кадмію на *D. antarctica* вивчали із використанням генетично ідентичних рослин (генотип G/D12-2a), отриманих мікроклональним розмноженням *in vitro*. Для дослідження було обрано концентрації Cd^{2+} у середовищі в діапазоні 0,1–10 мМ. Було також вивчено вплив токсиканта на рівень генетичних перебудов за різної тривалості культивування рослин. Мутагенний вплив оцінювали шляхом порівняння спектрів ПЛР-продуктів, отриманих з ДНК рослин, що росли у присутності Cd^{2+} , та контрольних рослин, які вирощували на тому ж середовищі без йонів Кадмію. Для кількісного вираження відмінностей у спектрах розраховували генетичні

відстані за Жакардом. Було проведено три варіанти дослідів, які відрізнялися за використаними концентраціями кадмію та тривалістю культивування рослин (табл. 5.1).

Таблиця 5.1.

Умови вирощування *D. antarctica* в присутності Cd^{2+} у різних варіантах дослідів

№ п/п	Варіант дослідів	Концентрація Cd^{2+} у живильному середовищі, мМ	Тривалість культивування, добі	
			з Cd^{2+}	без Cd^{2+}
1	I	0,1	63	—
2		0,2	63	—
3		1	63	—
4		1,5	63	—
5		2	63	—
6		5	63	—
7		10	63	—
8		контроль	—	63
9	II	0,2	17	17
10		0,4	17	17
11		0,6	17	17
12		0,8	17	17
13		1	17	17
14		контроль	—	34
15	III	0,1	265	—
16		0,1	165	100
17		0,4	140	—
18		0,4	96	44
19		контроль	—	265

У першому варіанті дослідів, спрямованому на визначення граничних концентрацій йонів Кадмію, що призводять до зупинки росту та наступної загибелі рослин, *D. antarctica* вирощували за широкого спектру концентрацій Cd^{2+} від 0,1 мМ до 10 мМ упродовж 63 діб. Уже при концентрації 0,1 мМ спостерігали зниження швидкості росту. Рослини, культивовані з 0,1–0,2 мМ Cd^{2+} (що становить 11,2–22,4 мг/л Cd^{2+}) упродовж 2-х місяців, не

відрізнялися за морфологічними ознаками від контрольних. У присутності 2 мМ (224 мг/л Cd^{2+}) або вищих концентрацій Cd^{2+} спостерігали значне сповільнення росту. На середовищі з 5 і 10 мМ Cd^{2+} не спостерігали ознак росту рослин, з часом вони втрачали хлорофіл і, очевидно, гинули, муміфікуючись у стерильних умовах, оскільки ДНК із них виділити не вдалося. Із решти рослин було виділено ДНК і використано її для аналізу генетичної мінливості методом ПЛР [77].

Для ПЛР-аналізу використали сім ISSR та один IRAP праймери (див. табл. 2.2), які були підібрані раніше для популяційно-генетичних досліджень *D. antarctica* з Прибережної Антарктики та характеризувалися достатньо високим рівнем поліморфізму спектрів ПЛР-продуктів. Обрані праймери в ПЛР з ДНК використаних для дослідів рослин утворювали 93 амплікони в діапазоні довжин від 3000 п.н. до 260 п.н.

У рослин, які піддавали токсичному впливу йонів Кадмію впродовж 63 діб, було виявлено зміни ПЛР-спектрів усіх використаних праймерів. Вони проявлялись як у зникненні окремих ампліконів, так і у появі нових, а також у зміні їх копійності. У рослин, культивованих при 0,1 або 0,2 мМ Cd^{2+} , в порівнянні з контрольними рослинами, змін у спектрах ПЛР-продуктів не відбувалося. При концентрації 1 мМ рівень відмінностей від контрольних рослин становив 15,9 %. Водночас, у зразках, які культивували у присутності Cd^{2+} в концентраціях вище 1 мМ, спостерігали зменшення інтенсивності спектру ПЛР-продуктів із втратою фрагментів переважно у зоні 700–2000 п.н. (рис. 5.5). Враховуючи цей факт та неоднозначність можливої інтерпретації таких змін у спектрах ПЛР-продуктів, ми не розглядали їх в подальшому аналізі. За результатами цього експерименту було визначено діапазон концентрацій кадмію, за яких продовжується ріст рослин *in vitro*, – до 1 мМ Cd^{2+} . Ці концентрації було використано в наступних дослідях [77].

У другому варіанті дослідів для вивчення гострої дії йонів Кадмію на генетичний апарат *D. antarctica* рослини культивували 17 діб у присутності йонів кадмію в діапазоні концентрацій 0,2–1 мМ, після чого переносили на

середовище без Cd^{2+} і продовжували культивувати ще впродовж 17-ти діб. Така схема експерименту тут і в наступному варіанті досліджу була обрана, виходячи з того, що кадмій пригнічує ростові процеси. Ми припустили, що перенесення рослин після певного періоду впливу токсиканта у контрольні умови для відновлення фізіологічних процесів і більш інтенсивного приросту біомаси має сприяти виявленню мутагенного ефекту кадмію [77].

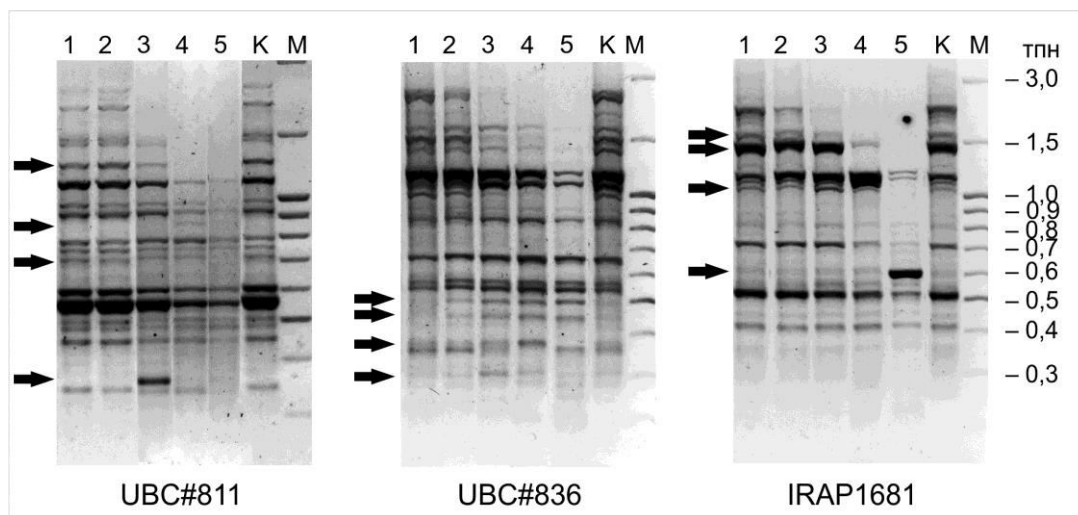


Рис. 5.5. Зміни електрофоретичних спектрів ПЛР-продуктів рослин *D. antarctica*, культивованих у присутності Cd^{2+} упродовж 63 діб: 1 – 0,1 мМ, 2 – 0,2 мМ, 3 – 1 мМ, 4 – 1,5 мМ, 5 – 2 мМ, К – контрольні рослини, М – маркер молекулярної маси ДНК. Стрілками позначено перебудовані фрагменти; назви використаних праймерів наведено під зображеннями фракціонованої ДНК

Поліморфізм спектрів ПЛР-продуктів спостерігали для трьох праймерів: UBC#03, UBC#811, UBC#840. Зміни в спектрах були виявлені лише за культивування рослин у присутності Cd^{2+} в концентраціях вище 0,4 мМ. Вони проявлялися у вигляді зміни копійності фрагментів та у появі нових (додаткових) фрагментів (рис. 5.6). Так, в одному випадку додаткові фрагменти було виявлено у рослини, культивованої на середовищі із 0,6 мМ (праймер UBC#03), в іншому – із 1 мМ Cd^{2+} (праймери UBC#840 та

UBC#811). При концентрації йонів Кадмію в концентрації 0,2 мМ і 0,4 мМ змін в ПЛР-спектрах не спостерігали.

За результатами ПЛР-аналізу було розраховано генетичні відстані за Жакардом між рослинами *D. antarctica*, культивованими впродовж 17 діб на живильних середовищах з різними концентраціями Cd^{2+} . Значення генетичних дистанцій між рослинами знаходилися в межах 3,5–11,4 % і зростали залежно від концентрації йонів Кадмію в живильному середовищі (рис. 5.7).

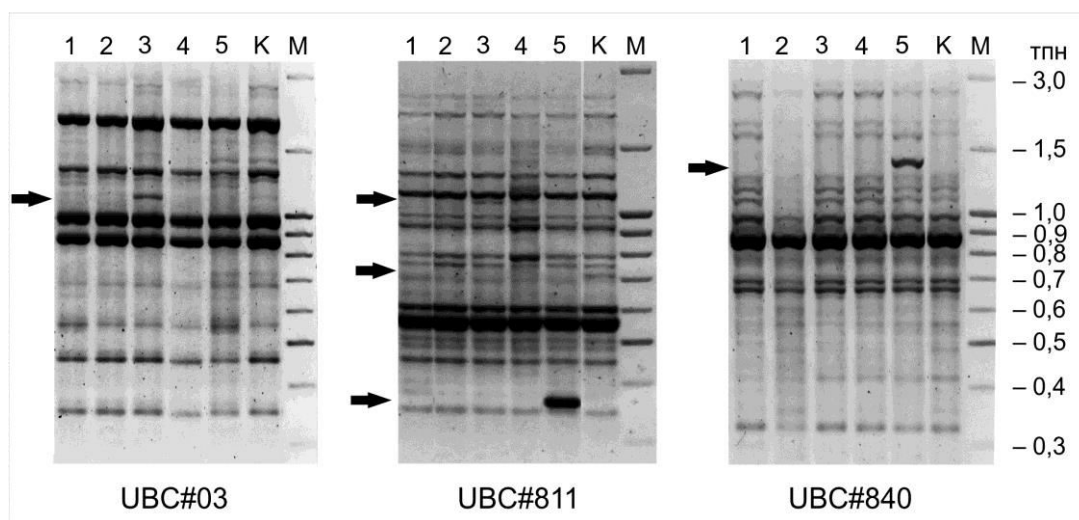


Рис. 5.6. Зміни електрофоретичних спектрів ПЛР-продуктів рослин *D. antarctica*, культивованих у присутності Cd^{2+} упродовж 17 діб: 1 – 0,2 мМ, 2 – 0,4 мМ, 3 – 0,6 мМ, 4 – 0,8 мМ, 5 – 1 мМ, К – контрольні рослини, М – маркер молекулярної маси ДНК. Стрілками позначено перебудовані фрагменти; назви використаних праймерів наведено під зображеннями фракціонованої ДНК

Третій варіант досліду був спрямований на вивчення хронічної дії йонів Кадмію на геном *D. antarctica*. Відомо, що йони Кадмію на перших етапах культивування накопичуються в коренях рослин, викликаючи, залежно від дози, фізіологічні та генетичні порушення. Відтак, починається накопичення токсиканта в інших органах, що також може провокувати в них дегенеративні процеси. Дослід передбачав тривале культивування рослин при двох порівняно невисоких концентраціях кадмію, а саме 0,1 мМ та

0,4 мМ (див. табл. 5.1). Рослину, яка формувала дернину, культивували впродовж певного часу на середовищі з ВМ, після чого в стерильних умовах відбирали її частину для генетичного аналізу, а решту дернини продовжували вирощувати на контрольному живильному середовищі. Тривалість культивування з 0,1 мМ становила 265 діб; у варіанті з наступним вирощуванням на контрольному середовищі рослини піддавали впливу 0,1 мМ Cd^{2+} 165 діб і ще 100 діб культивували без важкого металу. При вищій концентрації (0,4 мМ) тривалість культивування на середовищі з Cd^{2+} складала 140 діб, а у варіанті із дорощуванням в контрольних умовах – 96 діб у присутності йонів Кадмію і 44 доби – на контрольному середовищі.

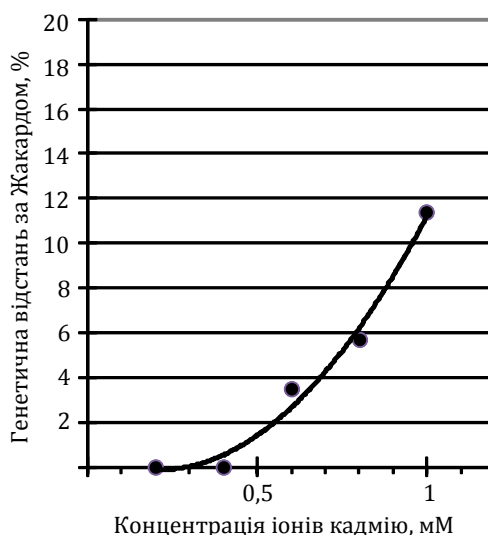


Рис. 5.7. Рівень відмінностей від вихідного генотипу рослин *D. antarctica*, які культивували на середовищі з різним вмістом йонів Кадмію впродовж 17 діб

ПЛР-аналіз ДНК рослин, що зазнали тривалого впливу порівняно невисоких концентрацій солей кадмію (0,1 та 0,4 мМ), не виявив відмінностей від контрольних рослин. Слід зазначити, що у рослин, які після культивування на середовищі з кадмієм упродовж тривалого часу росли на живильному середовищі без важкого металу, також не виявлено відмінностей

від контролю та рослин, взятих до аналізу безпосередньо після культивування на середовищі з Cd^{2+} (через 165 діб – 0,1 мМ Cd^{2+} та 96 діб – 0,4 мМ Cd^{2+}) [77].

Важкі метали, зокрема кадмій, дуже токсичні для живих організмів. Генотоксичність солей Кадмію показано для представників різних видів рослин – *Solanum tuberosum* L. [162], *Nicotiana tabacum* [176], *Allium sativum* [291], *Allium cepa*, *Hordeum vulgare*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Vicia faba* та *Zea mays* [114, 161, 181, 214]. Cd^{2+} в меристематичних клітинах коренів *Vicia faba* L. викликає розвиток мультиполярності, поліплоїдії, появу хромосомних мостів і фрагментацію веретена поділу [182]. Накопичення кадмію викликає в рослин пригнічення фотосинтезу, зменшує проникнення води і поживних речовин, а також призводить до видимих пошкоджень, таких як хлороз та інгібування росту [165, 175]. У рослинах *Thlaspi caerulescens* J.Presl & C.Presl, *Thlaspi arvense* L. та *Lactuca sativa* L. пошкодження ДНК у пагонах та коренях спостерігали після культивування з 10 і 100 мкМ Cd^{2+} упродовж 28 діб [175]. У клітинах коренів Cd^{2+} спричинює зменшення показника мітотичного індексу, викликає хромосомні аберації, утворення мікроядер [114, 161]. Водночас відомо про існування рослин, що мають підвищену стійкість до ВМ. У цій роботі ми провели дослідження мутагенного впливу кадмію на рослину, що здатна рости в екстремальних умовах – *D. antarctica*, у якій внаслідок адаптації до існування в умовах Прибережної Антарктики сформувались певні механізми стійкості до різноманітних екстремальних впливів.

Дослідження проводили із використанням рослин одного генотипу, отриманих мікроклональним розмноженням, які культивували на штучних живильних середовищах *in vitro*. Це дозволило проводити досліди в стандартизованих контрольованих умовах, а також виключити можливий вплив на результати внутривидового поліморфізму або потенційних відмінностей різних генотипів за чутливістю до кадмію. Для оцінки мутагенного впливу кадмію використали метод ПЛР-аналізу, який

надзвичайно ефективний при дослідженні геному і широко використовується для виявлення пошкоджень ДНК і мутацій. Зокрема, за допомогою RAPD-ПЛР було показано індуковані йонами Кадмію зміни геному *Arabidopsis thaliana* [161], *Urtica dioica* – кропиви дводомної [200], *Hydrilla verticillata* і *Ceratophyllum demersum* (водяні рослини) [189], ячменю (*Hordeum vulgare*) [214]; ISSR маркери виявили мутагенний вплив трьох важких металів Zn, Pb и Cd на *Eruca sativa* [115]. У цьому дослідженні ми застосували метод ISSR-аналізу, який дозволяє виявити поліморфізм ділянок геному, фланкованих мікросателітними повторами, і, на відміну від RAPD-ПЛР, має вищу відтворюваність та надійність результатів [251].

Культивування рослин *D. antarctica* з йонами Кадмію в концентраціях від 0,1 до 10 мМ упродовж 63 діб показало, що морфологічні зміни у рослин спостерігаються на середовищах із вмістом важкого металу 1 мМ або вище. При вищих концентраціях виявлено припинення росту і хлороз. Поряд із морфологічними змінами, починаючи з концентрації 1 мМ, спостерігали також зміни в спектрах ПЛР-продуктів. При вирощуванні рослин на середовищах з Cd^{2+} в діапазоні концентрацій 0,2–1 мМ упродовж 17 діб з наступним культивуванням на контрольному середовищі впродовж такого ж терміну, зміни спектрів ПЛР-продуктів спостерігали лише за концентрацій вище 0,4 мМ, а їх рівень зростав залежно від вмісту Cd^{2+} в середовищі. За культивування при концентраціях Cd^{2+} 0,1 та 0,4 мМ упродовж тривалішого періоду (265 та 140 діб, відповідно) генетичних змін у рослинах виявлено не було.

Генотоксичний вплив за обробки кадмієм, а саме пошкодження ДНК, які виявляли цитогенетичними методами, спостерігали при подібних концентраціях. Наприклад, зниження мітотичного індексу і утворення мікроядер у проростках *Allium sativum* і *Vicia faba* викликала обробка 10 мкМ Cd^{2+} упродовж 48 годин, а за концентрацій 100 і 200 мкМ ці показники зазнавали дуже істотних змін [136], у *Vigna unguiculata* – такі зміни спостерігали після 15 діб вирощування рослин, отриманих з насіння,

одноразово обробленого 2–10 мМ Cd^{2+} [116]. У коренях рослин *L. sativa*, на відміну від рослин-аккумуляторів кадмію *T. caerulescens* та *T. arvense*, пошкодження ДНК методом проточної цитометрії виявили після культивування впродовж 28 діб у присутності 100 мкМ Cd^{2+} [175]. У водяних рослин *Hydrilla verticillata* і *Ceratophyllum demersum*, які обробляли 10 мкМ Cd^{2+} упродовж 96 годин, спостерігали зміни в спектрах продуктів RAPD-ПЛР [189]. У *Solanum tuberosum* L. пошкодження ДНК, детектовані за допомогою кометного форефу, спостерігали при культивуванні з 5 мкМ Cd^{2+} після двох тижнів, з 7,5 мкМ – після одного тижня, а з 20 мкМ – вже після двох годин [162].

Обробка нітратом Кадмію в концентраціях 0,4–2 мМ упродовж 2 годин призводила до значних пошкоджень ДНК, які значно зростали після наступного культивування рослин без токсиканта впродовж 24 годин [162]. У проростках пшениці *Triticum aestivum* L. зміну RAPD-спектрів відмічали при вирощуванні в присутності 5 мг/мл (~25 мкМ) хлориду кадмію впродовж 9 діб [202]. Мутагенну дію кадмію на *Phaseolus vulgaris* L. спостерігали при культивуванні проростків у присутності $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ в концентрації 150 мг/мл (0,61 мМ) впродовж 7 діб [121].

Таким чином, отримані нами результати свідчать про високу стійкість *D. antarctica* до йонів Кадмію, порівняно із іншими вищими судинними рослинами, дані відносно яких представлені в науковій літературі [20, 77]. Пригнічення росту рослин *D. antarctica* відбувається при концентраціях Cd^{2+} від 0,1 мМ і вище, а припинення росту та загибель рослин – за концентрацій вище 1 мМ. Мутагенний вплив на *D. antarctica* виявлено при концентраціях Cd^{2+} вище 0,4 мМ. За тривалого вирощування рослини (впродовж 3–8 місяців) в присутності 0,1–0,4 мМ йонів Кадмію генетичних змін не знайдено.

Результати, подані у даному розділі, опубліковано у таких працях:

Статті:

1. Підвищена стійкість *Deschampsia antarctica* Desv. до мутагенної дії

іонів кадмію / К.В. Спірідонова, І.О. Андрєєв, **О.М. Загричук**, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2016. – Т. 14, № 1. – С. 63–71.

2. Особливості накопичення кадмію в культивованих *in vitro* рослинах *Deschampsia antarctica* Desv. / **О.М. Загричук**, В.О. Хоменчук, Г.Б. Гуменюк, Н.М. Дробик // XXVIII Всеукраїнська наукова інтернет-конференція «Вітчизняна наука на зламі епох: проблеми та перспективи розвитку». – Переяслав-Хмельницький. – 2016. – С. 9–11.

Тези доповідей:

1. Дослідження впливу йонів кадмію на ріст рослин *Deschampsia antarctica* Desv. *in vitro* / **О.М. Загричук**, Т.В. Гарбуз, В.Б. Чеховська, Н. М. Дробик // Сучасні досягнення екології та їх імплементація у природничу освіту: матеріали науково-методичного семінару, 24 квітня 2014 року. – Тернопіль, 2014. – С. 18.

2. **Загричук О. М.** Оценка влияния ионов Кадмия на рост и развитие растений *Deschampsia antarctica* Desv. *in vitro* / **О.М. Загричук**, И.Ю. Парникоза, Н.М. Дробик // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: VIII съезд общества физиологов растений России (Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых), 21–26 сентября 2015 г.: тезисы докл. – Петрозаводск, 2015. – С. 199.

3. Генотоксичні концентрації кадмію для антарктичного екстремофіла *Deschampsia antarctica* É. Desv. / К.В. Спірідонова, **О.М. Загричук**, І.О. Андрєєв, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // VIII Міжнародна Антарктична Конференція, присвячена 25-ій річниці приєднання України до Договору про Антарктику (17 вересня 1992 р.), 16–18 травня 2017 р. – Київ, 2017. – С. 56–58.

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Метод культури *in vitro* широко використовується для вирішення багатьох фундаментальних питань фізіології і генетики рослин, а також є основою сучасних біотехнологій, спрямованих на одержання достатньої кількості потрібного рослинного матеріалу, цінних вторинних метаболітів, нового вихідного матеріалу для селекції, збереження генофонду зникаючих видів тощо [48, 66, 88].

Використання рослин, культивованих *in vitro*, дає можливість у контрольованих лабораторних умовах моделювати дію певних абіотичних стресових факторів (температури, вологості ґрунту, освітлення, складу середовища тощо) і визначати їх вплив на фізіологічні та біохімічні параметри, що практично неможливо через віддаленість та складність проведення досліджень в умовах Антарктиди. Таким чином, використання культивованих у стерильних умовах рослин дозволяє обійти деякі перешкоди, що виникають під час роботи з рослинами *in vivo* [48, 59].

Зважаючи на складність збору достатньої кількості рослинного матеріалу, несприятливість умов для проведення експериментальних досліджень у природі, у даній роботі проведено комплексне вивчення, яке полягало у розробці технологій мікроклонального розмноження, отримання та вирощування культури тканин і органів *D. antarctica*, а також вивченні їхніх фізіолого-генетичних особливостей.

Дослідження, представлені у цій роботі, проводили за схемою, що складається з трьох частин: власне біотехнологічної; оцінки генетичної стабільності/мінливості отриманих мікроклональним розмноженням рослин; з'ясування фізіологічних та генетичних наслідків впливу різних концентрацій йонів Кадмію на рослини *D. antarctica*.

Особливістю запропонованої і реалізованої в даній роботі схеми є взаємозв'язок її складових, який передбачає не лише отримання та вирощування культури *in vitro* *D. antarctica*, але й з'ясування придатності розроблених технологій для практичного використання шляхом дослідження фізіолого-генетичних параметрів культури *in vitro* *D. antarctica*.

Перша, власне біотехнологічна, частина цієї схеми включала в себе два аспекти: перший – отримання асептичних рослин шляхом індукції проростання простерилізованого насіння з різних локалітетів; розробку умов мікроклонального розмноження *D. antarctica* для отримання достатньої кількості рослин, які можуть надалі бути використаними як матеріал для різнопланових досліджень; другий – підбір умов отримання та вирощування культури тканин та органів.

Друга частина схеми передбачала проведення генетичних досліджень з використанням ПЛР-аналізу та цитогенетичного аналізу з метою встановлення придатності розробленої методики мікроклонального розмноження для отримання генетично однорідного рослинного матеріалу *D. antarctica*. Проведення таких досліджень є важливим, оскільки відомо, що обмеженням у створенні ефективних технологій *in vitro* може бути соматоклональна мінливість, яка виникає в процесі вирощування клітин, тканин і органів на штучних живильних середовищах. Наслідком мінливості може бути неможливість збереження вихідного генотипу у незміненому вигляді. Тому суттєве значення має контроль генетичної стабільності рослинної культури *in vitro*. Досліджені показники, поряд із теоретичним, мають важливе практичне значення, оскільки визначають доцільність подальшого використання цих рослин.

Третя частина схеми включала у себе вивчення в умовах *in vitro* впливу різних концентрацій йонів Кадмію на ріст рослин *D. antarctica* та особливостей акумулювання цього токсиканта рослинами з різних локалітетів, а також дослідження мутагенного впливу різних концентрацій йонів Кадмію на цю рослину із застосуванням ПЛР-аналізу. За результатами

цих досліджень передбачалось зробити висновок про рівень металрезистентності *D. antarctica*, а також про придатність/непридатність розробленої модельної системи для вивчення впливу різних факторів на прикладі вивчення впливу йонів Кадмію.

У результаті реалізації усіх складових схеми на основі всебічного аналізу та теоретичної інтерпретації експериментальних даних у роботі розроблено умови для отримання культури тканин і органів *D. antarctica* як експериментальної модельної системи для проведення різнопланових досліджень антарктичної рослини *D. antarctica in vitro* та з'ясовано придатність розроблених технологій з використанням фізіолого-генетичних методів.

Отримані результати, підсумовані відповідно до наведеної вище схеми, можна представити у вигляді поетапної реалізації усіх ланок дослідження.

Першим кроком біотехнологічної частини роботи було отримання асептичних рослин шляхом пророщування *in vitro* насіння *D. antarctica* після його попередньої стерилізації. У результаті з'ясовано особливості і розроблено умови проростання насіння *D. antarctica in vitro*. Досліджено періодичність проростання насіння, його схожість, залежність цих процесів від різних чинників. Незважаючи на виявлені відмінності, для проростання насіння рослин *D. antarctica* з різних місць зростання встановлено спільні ознаки: доцільність використання як стерилента пероксиду гідрогену, відсоток асептичного насіння у всіх випадках складав 98–100 %; ефективність порушення спокою насіння дією низьких позитивних температур (2–4 °C) та обробкою гіберелової кислоти; проростання насіння в умовах освітлення.

Встановлено, що для мікроклонального розмноження *D. antarctica* оптимальним серед протестованих було агаризоване живильне середовище B5, доповнене 0,2 мг/л кінетину. Мікроклонування проводили шляхом відокремлення утворених на дернині пагонів.

Розроблено умови індукції калюсоутворення з корневих і пагонових експлантів та тривалого вирощування культури тканин *D. antarctica*. Здатність до калюсогенезу залежала від мінерального складу живильного середовища, комбінації концентрацій регуляторів росту, місця зростання рослини-донора та типу експланта. Оптимальним для отримання калюсної тканини було живильне середовище B5, доповнене 0,9–1 мг/л 2,4-Д і 0,09–0,1 мг/л БАП. Калюсогенна активність із корневих експлантів значно перевищувала (у 1,5–2 рази) таку зі пагонових. Отримано пагони шляхом спонтанного непрямого органогенезу. Виявлено вплив складу живильного середовища та походження калюсу на ефективність регенерації. Вкорінено регенеровані пагони та підібрано умови для росту рослин-регенерантів *in vitro*.

З метою встановлення придатності розробленої методики мікроклонального розмноження досліджували клональне потомство рослин, які відрізнялися за молекулярно-генетичними маркерами та цитогенетичними характеристиками. Порівняльний аналіз рослин на початкових етапах розмноження (1–6-й пасажі) та за тривалого культивування *in vitro* (24–26-й пасаж та більше) не виявив генетичних відмінностей між клонами спільного походження та вихідним генотипом за ISSR-маркерами. Аналіз тривало культивованих рослин (49–79-й пасажі) показав також збереження цитогенетичних характеристик рослин.

У цілому, отримані результати свідчать, що розроблена методика забезпечує збереження генетичних характеристик *D. antarctica* в процесі тривалого культивування *in vitro* і може бути використана для отримання генетично однорідного рослинного матеріалу.

Відомо, що дослідження стійкості рослин до абіотичних стресових чинників і потенційних наслідків їхніх впливів є важливою науковою проблемою, яка, окрім суто академічного інтересу, має безпосереднє відношення до вирішення як практичних завдань у галузі сільськогосподарського виробництва, так і складних питань прогнозування

стану екологічних систем в умовах зростання антропогенного навантаження та значних кліматичних змін, що спостерігаються впродовж останніх десятиліть. Одним із перспективних модельних об'єктів для таких досліджень є *D. antarctica*, яка постійно піддається суттєвому впливу різних чинників, оскільки зростає в екстремальних умовах Антарктики. Здатність *D. antarctica* до виживання в жорстких умовах довкілля дозволяє припускати існування у цього виду підвищеної стійкості до різноманітних стресових чинників, а також генетичну обумовленість такої адаптивності. Водночас, дослідження стійкості цієї рослини до впливу ВМ і, зокрема кадмію, та її генетичної реакції практично не проводилися.

Для з'ясування впливу різних концентрацій йонів Кадмію на їх фізіологічні та молекулярно-генетичні характеристики нами використано генетично однорідні, отримані мікроклональним розмноженням рослини *D. antarctica*.

При дослідженні впливу широкого діапазону концентрацій (0,1–20 мМ) Cd^{2+} на культивовані *in vitro* рослини *D. antarctica* з'ясовано, що граничною концентрацією, за якої ще відбувається ріст і розвиток рослин, є 1 мМ. На живильних середовищах з вмістом Cd^{2+} 0,1–1 мМ упродовж 3–4 тижнів відбувається поступова адаптація рослин до існування в присутності. За вищих концентрацій Cd^{2+} рослини гинули через 3–6 тижнів.

Типовими наслідками впливу йонів Кадмію на культивовані *in vitro* рослини *D. antarctica* у наших дослідженнях є: пригнічення росту коренів і надземної частини, зменшення приросту біомаси, хлороз пагонів, згортання пагонів у трубочки, ослизнення коренів, їх почорніння та відмирання, утворення непрозорої рідини у місцях контакту пагонів із середовищем з високим вмістом йонів Кадмію. Нами проаналізовано поглинання йонів Cd^{2+} рослинами *D. antarctica* з островів Галіндез та Великий Ялур упродовж 7, 14, 21, 28 та 35 діб культивування *in vitro* у живильному середовищі з різними концентраціями йонів Cd^{2+} . Суттєвих відмінностей щодо його акумулювання культивованими *in vitro* рослинами з цих локалітетів не виявлено. В обох

випадках за впливу різних концентрацій йонів металу основна кількість кадмію накопичується впродовж перших семи діб культивування на середовищі з металом.

При дослідженні впливу йонів Кадмію на генетичні параметри культивованих *in vitro* рослин *D. antarctica* встановлено, що концентрації 0,1 та 0,2 мМ не викликають змін спектрів ПЛР-продуктів. За культивування рослин впродовж 17 діб з концентрацією 0,2–1 мМ Cd^{2+} зміни в спектрах ПЛР-продуктів спостерігали при концентраціях токсиканта вище 0,4 мМ; кількість змін зростала залежно від його вмісту. Після довготривалої (140–265 діб) дії йонів Кадмію в порівняно невисоких концентраціях 0,1 мМ та 0,4 мМ змін геному не виявлено.

Отримані нами результати свідчать про високу стійкість *D. antarctica* до йонів Кадмію, порівняно із іншими судинними рослинами, дані відносно яких представлені в науковій літературі. Можна припустити дві причини стійкості *D. antarctica* до кадмію. У цієї рослини внаслідок адаптації до існування в жорстоких умовах Антарктики сформувались комплексні механізми стійкості до різних екстремальних впливів, таких як холод, посуха, засолення, УФ-опромінення, які можуть забезпечувати також і неспецифічну толерантність до шкідливого впливу важких металів. Водночас, з літературних даних відомо, що в окремих ділянках островів Західної Антарктики ґрунти можуть мати підвищений вміст важких металів [46, 123] і це також могло вплинути на формування у *D. antarctica* стійкості до цього абіотичного фактору.

Таким чином, у результаті проведених досліджень нами розроблені ефективні технології культивування *D. antarctica in vitro*. Зокрема, розроблено умови проростання насіння, мікроклонального розмноження, а також індукції калусоутворення з різних типів експлантів та тривалого вирощування культури тканин *D. antarctica*; шляхом спонтанного непрямого органогенезу *in vitro* отримано пагони, підібрано умови для їх вкорінення і росту рослин-регенерантів.

На основі проведених молекулярно-генетичних та цитогенетичних досліджень мікроклонально розмножених рослин *D. antarctica* встановлено збереження ними генетичної стабільності в процесі тривалого культивування *in vitro*. Ці результати свідчать про можливість та доцільність використання розробленого нами способу отримання рослин *D. antarctica* мікроклональним розмноженням *in vitro*. За відсутності достатньої кількості рослинного матеріалу через віддаленість Антарктики цей спосіб надає можливість клонування рослин з стабільними генетичними характеристиками для подальшого їх використання в модельних експериментах.

На прикладі дослідження впливу йонів Кадмію на фізіологічні та генетичні параметри рослин *D. antarctica in vitro* зроблено висновок про придатність розробленої експериментальної модельної системи культивування *in vitro* для різнопланових досліджень цієї антарктичної вищої судинної рослини.

ВИСНОВКИ

У результаті проведення комплексу експериментальних робіт вивчено особливості і розроблено умови мікроклонального розмноження *Deschampsia antarctica* Desv., а також індукції калюсоутворення з різних типів експлантів та тривалого вирощування культури тканин цього виду. З'ясовано придатність розроблених технологій для практичного використання шляхом дослідження фізіолого-генетичних параметрів культури *in vitro* *D. antarctica*.

1. Розроблено спосіб отримання вихідного асептичного матеріалу для біотехнологічних досліджень *D. antarctica*, що полягав у стерилізації і пророщуванні *in vitro* стратифікованого насіння. Спосіб дозволяє одержувати впродовж усього року життєздатні морфологічно нормальні проростки цього виду.
2. Встановлено, що для мікроклонального розмноження *D. antarctica* оптимальним серед протестованих було агаризоване живильне середовище В5, доповнене 0,2 мг/л кінетину. Ефективним способом мікроклонування є відокремлення утворених на дернині пагонів.
3. Розроблено умови індукції та проліферації калюсу з різних типів експлантів рослин-донорів *D. antarctica*. Найбільш ефективним для калюсогенезу серед протестованих було живильне середовище В5 з 0,9–1 мг/л 2,4-Д і 0,09–0,1 мг/л БАП. Значення калюсогенної активності із корневих експлантів перевищували такі із пагонових в 1,5–2 рази. Найбільша частота калюсогенезу виявлена для експлантів рослин-донорів з о. Галіндез та о. Великий Ялур.
4. Виявлено здатність *D. antarctica* до спонтанної регенерації пагонів із калюсу на середовищах В5, МС і ШХ, доповнених 2,4-Д та БАП. Показники ефективності регенерації варіювали від 0,4 до 4,7 регенеранта на інокулюм і були найвищими при культивуванні калюсу на середовищі В5 з 0,9 мг/л 2,4-Д та 0,09 мг/л БАП. Приріст біомаси регенерованих з калюсу рослин був на порядок більший, порівняно з

рослинами, одержаними шляхом проростання насіння в умовах *in vitro*.

5. Показано збереження молекулярно-генетичних та цитогенетичних характеристик у клонального потомства *D. antarctica* в процесі тривалого культивування *in vitro*. Ці результати свідчать про можливість та доцільність використання розробленого нами способу отримання рослин *D. antarctica* мікроклональним розмноженням *in vitro*.
6. Оцінено вплив різних концентрацій йонів Кадмію ($0,1 \text{ мМ} - 20 \text{ мМ Cd}^{2+}$) у живильному середовищі на ріст *D. antarctica in vitro*. Встановлено, що рослина зберігає здатність виживати за умови, коли концентрація Cd^{2+} у живильному середовищі не перевищує 1 мМ . Формування та ріст коренів більш чутливі до дії кадмію, ніж надземної частини рослин.
7. Вивчено накопичення йонів Кадмію в рослинах *D. antarctica* з островів Галіндез та Великий Ялур, культивованих *in vitro* в присутності різних концентрацій Cd^{2+} упродовж 7, 14, 21, 28 та 35 діб. Основна кількість йонів токсиканта за його різних концентрацій у живильному середовищі накопичується у рослинах з обох локалітетів упродовж перших семи діб культивування.
8. Із використанням ПЛР-аналізу досліджено вплив різних концентрацій йонів Кадмію та різної тривалості культивування за їх присутності у живильному середовищі на рівень генетичної мінливості у мікроклонально розмножених рослин *D. antarctica*. Мутагенний вплив виявлено при концентраціях Cd^{2+} вище $0,4 \text{ мМ}$. За тривалого вирощування рослини (упродовж 3–8 місяців) у присутності $0,1 - 0,4 \text{ мМ Cd}^{2+}$ генетичних змін не знайдено.
9. На основі фізіологічних, цито- та молекулярно-генетичних досліджень культур *in vitro D. antarctica*, а також вивчення впливу йонів Кадмію на ріст, накопичення та молекулярно-генетичні характеристики рослин цього виду зроблено висновок про придатність розробленої модельної системи для вивчення впливу різних стресових чинників.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Абакумов Е.В. Почвенное разнообразие наземных экосистем Антарктики (в районах расположения российских станций) / Е.В. Абакумов, А.В. Лупачев // Український антарктичний журнал. – 2011/2012. – № 10–11. – С. 222–228.
2. Абакумов Е.В. Почвы Антарктиды / Е.В. Абакумов, В.А. Крыленков // Природа. – 2011. – № 3. – С. 58–62.
3. Александров В. Я. Колебания среднегодовых аномалий температуры воздуха на Антарктическом полуострове в связи с особенностями атмосферных процессов в южной полярной области / В.Я. Александров, А.Я. Коржиков // Ученые записки РГГМУ. – 2010. – № 15. – С. 86–91.
4. Александров В.Я. Увеличение площади расселения злака *Deschampsia antarctica* в окрестностях российской антарктической станции Беллинсгаузен (о-ва Кинг-Джордж и Нельсон, Южные Шетландские о-ва) в связи с общим потеплением климата в регионе / В.Я. Александров, М.П. Андреев, Л.Е. Курбатова // Проблемы Арктики и Антарктики. – 2012. – № 2 (92). – С. 72–84.
5. Андреев М.П. Ботанические исследования на Южных Шетландских островах в сезоне 54-й РАС / М.П. Андреев, Л.Е. Курбатова // Российские полярные исследования. Информационно–аналитический сборник. – 2012. – № 1 (7). – С. 21–23.
6. Антарктические микроорганизмы, устойчивые к высоким концентрациям Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , CrO_4^{2-} / А.Б. Таширев, В.А. Романовская., И.Б. Сиома, [и др.] // Доповіді НАН академії наук України. – 2008. – №1. – С. 169–176.
7. Байсаитова Н.М. Фитотоксичное действие тяжелых металлов при техногенном загрязнении окружающей среды / Н.М. Байсаитова,

Х.М. Сартаева // Молодой ученый. – 2014. – № 2 (61). – С. 382–384.

8. Бильданова Л.Л. Основные свойства и особенности эволюции антифризных белков / Л.Л. Бильданова, Е.А. Салина, В.К. Шумный // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Том 16, № 1. – С. 250–270.

9. Биологические и токсикологические предикторы потепления климата в Антарктике / Э.З. Самышев, Н.И. Минкина, Ю.П. Копытов [и др.] // Мониторинг состояния природной среды Антарктики и обеспечение деятельности национальных экспедиций: Материалы I Межд. научн.-практ. Конф. (26-29 мая 2014 г.). – Минск: Экоперспектива, 2014. – С. 224–230.

10. Важкі метали: надходження в ґрунти, транслокація в рослинах та екологічна небезпека / [В.Н. Гришко, Д.В. Сищиков, О.М. Піскова [та ін.]]. – Д.: Донбас, 2012. – 304 с.

11. Введення в культуру *in vitro* *Deschampsia antarctica* з двох районів прибережної Антарктики / О.М. Загричук, Н.М. Дробик, І.А. Козерецька [та ін.] // Український антарктичний журнал – 2011/2012. – № 10–11. – С. 289–295.

12. Введення в культуру *in vitro* *Deschampsia antarctica* з двох районів прибережної Антарктики / О.М. Загричук, Н.М. Дробик, І.А. Козерецька [та ін.] // Матеріали V Міжнародної Антарктичної конференції Антарктика і глобальні системи Землі: нові виклики та перспективи, 17–19 травня 2011. – Київ, 2011. – С. 209–211.

13. Введення в культуру *in vitro* деяких видів роду *Gentiana* L. / Н.М. Страшнюк, Л.Р. Грицак, О.М. Леськова [та ін.] // Физиология и биохимия культ. растений. – 2004. – Т.36, №4. – С. 327–334.

14. Вивчення геномів рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з різних локалітетів прибережної антарктики за допомогою хромосомних та молекулярних маркерів / М.О. Твардовська, І.О. Андрєєв, А.В. Амосова [та ін.] // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. Т. 14: присвяч. 180-річчю від часу заснування Київського національного університету імені Тараса Шевченка / Редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. – К.: Логос, 2014. – С. 133–137.

15. Відповідь фотосинтетичного апарату двох видів *Deschampsia* з різним ареалом розповсюдження на абіотичний стрес / N. Taran, V. Storozhenko, A. Okanenko [et al.] // Український антарктичний журнал. – 2013. – № 12. – С. 282–293.

16. Влияние загрязнения кадмием на рост и семенную продуктивность однолетних злаков / Ю.В. Батова, Г.Ф. Лайдинен, Н.М. Казнина [и др.] // Агрохимия. – 2012. – № 6. – С. 79–83.

17. Влияние птиц на пространственное распределение *Deschampsia antarctica* Desv. острова Галиндез (Аргентинские острова, Прибрежная Антарктика) / И.Ю. Парникоза, Е.В. Абакумов, И.В. Дикий [и др.] // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2015. – Сер. 3, вып. 1. – С. 78–87.

18. Вплив природних та антропогенних чинників на хімічний склад ґрунтів Прибережної Антарктики / С.Г. Корсун, І.А. Козерецька, І.Ю. Парнікоза [та ін.] // Агроекологічний журнал. – 2008. – № 4. – С. 20–25.

19. Генетична стабільність отриманих мікроклональним розмноженням рослин *Deschampsia antarctica* Desv. за тривалого культивування *in vitro* / К.В. Спірідонова, І.О. Андрєєв, О.М. Загричук, Д.О. Навроцька, М.О. Твардовська, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // Фізіологія рослин і генетика. – 2016. – Т. 48, №6. – С. 498–507.

20. Генотоксичні концентрації кадмію для антарктичного екстремофіла *Deschampsia antarctica* É. Desv. / К.В. Спірідонова, О.М. Загричук, І.О. Андрєєв [та ін.] // VIII Міжнародна Антарктична Конференція, присвячена 25-ій річниці приєднання України до Договору про Антарктику (17 вересня 1992 р.), 16-18 травня 2017 р. – Київ, 2017, – С. 56–58.

21. Гончарук Е.А. Тяжелые металлы: поступление, токсичность и защитные механизмы растений (на примере ионов кадмия) / Е.А. Гончарук, Н.В. Загоскина // Вісн. Харків. нац. аграрн. у-ту. Сер. Біологія. – 2017. – Вип. 1 (40). – С. 35–49.

22. Гришко В.Н. Функционирование глутатионзависимой антиоксидантной системы и устойчивость растений при действии тяжелых

металлов и фтора / В.Н. Гришко, Д.В. Сыщиков – К.: Наукова думка, 2012. – 239 с. – (Проект «Наукова книга»).

23. Грушинский Н. Антарктида / Н.П. Грушинский, А.Г. Дралкин. – М.: Недра, 1988. – 194 с.

24. Довгальок А.И. Цитогенетические эффекты солей токсичных металлов в клетках апикальной меристемы корней проростков *Allium cepa* L. / А.И. Довгальок, Т.Б. Калиняк, Я.Б. Блюм // Цитология и генетика. – 2001. – Т. 35, № 2. – С. 3–10.

25. Долгорукова С.В. Скринінг вірусних антигенів в рослинах *Deschampsia antarctica* з Антарктиди та близькоспоріднених рослинах України [Електронний ресурс] / С.В. Долгорукова, І.Г. Будзанівська, В.П. Поліщук // Наукові доповіді НУБіП 2012-2 (31). – Режим доступу до журн.: http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2012_2/12dsv.pdf.

26. Дослідження впливу йонів кадмію на ріст рослин *Deschampsia antarctica* Desv. *in vitro* / О.М. Загричук, Т.В. Гарбуз, В.Б. Чеховська [та ін.] // Сучасні досягнення екології та їх імплементація у природничу освіту: матеріали науково-методичного семінару, 24 квітня 2014 року. – Тернопіль, 2014. – С. 18.

27. Загричук О.М. *Deschampsia antarctica* Desv.: характеристика виду, його поширення та особливості адаптації до існування в умовах Антарктики / О.М. Загричук, Н.М. Дробик // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. – 2016. – № 1 (65). – С. 135–145.

28. Загричук О.М. Особливості прямого та непрямого органогенезу *Deschampsia antarctica* Desv. *in vitro* / О.М. Загричук, Д.М. Семенюк, Н.М. Дробик // Тернопільські біологічні читання – Ternopil bioscience – 2017: матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 20-річчю заснування наукового фахового видання України «Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія Біологія», 20–22 квітня 2017 р. – Тернопіль, 2017. – С. 250–254.

29. Загричук О.М. Оценка влияния ионов Кадмия на рост и развитие растений *Deschampsia antarctica* Desv. *in vitro* / О.М. Загричук, И.Ю. Парникоза, Н.М. Дробик // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: VIII съезд общества физиологов растений России (Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых), 21–26 сентября 2015 г.: тезисы докл. – Петрозаводск, 2015. – С. 199.

30. Загрязненность прибрежной экосистемы тяжелыми металлами как показатель климатических изменений в Антарктике / Э.З. Самышев, Н.И. Минкина, Ю.П. Копытов [и др.] // Український антарктичний журнал. – 2014. – №13. – С. 198–213.

31. Заименко Н.В. Аллелопатическая активность луговика антарктического (*Deschampsia antarctica* E. Desy.) в контексте глобальных изменений климата [Электронный ресурс] / Н.В. Заименко, Т.Ю. Бедерничек, П.Б. Хоецкий // Бюллетень БСИ ДВО РАН. – 2016. – Вып. 15. – С. 26–28. – Режим доступа: <https://botsad.ru/media/cms/3615/26-28.pdf>.

32. Збереження унікальності за комплексною пристосовуваністю різних генотипів *Deschampsia antarctica* Desv. в умовах стандартизованого вирощування рослин *in vitro* / Н. Мірюта, О. Пороннік, І. Парнікоза [та ін.] // Український антарктичний журнал. – 2016. – № 15. – С. 60–80.

33. Зведений латентний показник пристосовуваності *Deschampsia antarctica* Desv. як відбиток мікроумов існування в районі адміральської бухти (о. Короля Георга, Прибережна Антарктика) / Н.Ю. Мірюта, І.Ю. Парнікоза, Г.Ю. Мирюта [та ін.] // Український антарктичний журнал. – 2014. – № 13. – С. 159–174.

34. Зуев Е.А. Влияние солей тяжелых металлов на биологические показатели злаков: атореф. дис. на соиск. наук ст. кан. биол. наук: спец. 03.00.16 «Экология» / Е.А. Зуев. – Ставрополь. – 2002. – 133 с.

35. Казнина Н.М. Влияние кадмия на физиологические процессы и продуктивность растений семейства Poaceae / Н.М. Казнина, А.Ф. Титов // Успехи соврем. биологии. – 2013. – Т. 133, № 6. – С. 588–603.
36. Калюсогенез та регенерація рослин *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) в культурі *in vitro* / О.М. Загричук, А.І. Герц, Н.М. Дробик [та ін.] // Biotechnologia Acta. – 2013. – Vol. 6. – P. 77–85.
37. Качество пыльцы и особенности структуры митогаметофита у антарктических популяций *Deschampsia antarctica* E. Desv. / О.И. Юдакова, Т.Н. Шакина, В.С. Тырнов [и др.] // Бюллетень ботанического сада СГУ. – 2012. – Вып. 10. – С. 203–207.
38. Кир'яченко С.С. *Deschampsia antarctica*: генетичні та молекулярно-біологічні аспекти поширення в Антарктиці / С.С. Кир'яченко, І.А. Козерецька, С. Ракуса-Сущевські // Цитология и генетика. – 2005. – № 4. – С. 75–80.
39. Клаус А.А. Влияние кадмия и теплового шока на сплайсинг мРНК в хлоропластах кукурузы: дис. ... кандидата б. наук: 03.01.05 / Клаус Александр Александрович. – Москва – 2014. – 139 с.
40. Клоновані *in vitro* рослини роду *Deschampsia* як джерело фенольних сполук з протопухлинними властивостями / О.О. Пороннік, А.В. Кузьменко, А.В. Воловик [та ін] // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 200–204.
41. Клонування і молекулярно-генетична характеристика послідовностей ДНК хлоропластів та мітохондрій *Deschampsia antarctica* Desv. / Р.О. Макаренко, Б.В. Івашук, О.П. Савчук [та ін.] // Modern Phytomorphology. – 2012, № 2. – P. 261–263.
42. Кобилецька М. Вплив іонів кадмію на вміст фенольних сполук та вільного проліну в рослинах кукурудзи / М. Кобилецька, О. Терек // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологія – 2002, Вип. 28. – С. 311–316.

43. Кобилецька М.С. Індуковані саліцилатом зміни розподілу важких металів у пшениці та кукурудзи за дії кадмію хлориду / М.С. Кобилецька // Біологічні Студії / *Studia Biologica*. – 2016 – Том 10, №2. – С. 95–104.
44. Колесниченко А.В. Белки низкотемпературного стресса у растений / А.В. Колесниченко, В.К. Войников. – Иркутск: Арт-Пресс, 2003. – 196 с.
45. Комплексне вивчення антарктичної біоти / В.П. Поліщук, І.Ю. Костіков, Н.Ю. Таран [та ін.] // Український антарктичний журнал. – 2009. – № 4. – С. 284–292.
46. Корсун С.Г. Оцінка вмісту біогенних елементів та важких металів у верхньому шарі ґрунту островів поблизу західного узбережжя Антарктичного півострова / С.Г. Корсун // Український антарктичний журнал. – 2005. – № 3. – С. 151–154.
47. Кузнецов В.В. Физиология растений. Учебник для вузов / В.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М.: Высшая школа, 2005. – 742 с.
48. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В.А. Кунах. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
49. Кунах В.А. Додаткові або В-хромосоми рослин. Походження і біологічне значення / В.А. Кунах // Вісн. Укр. тов. генетиків і селекціонерів. – 2010. – 8, № 1. – С. 99–139.
50. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. – К.: Наук. думка, 2005. – 270 с.
51. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биологических специальностей вузов / Г.Ф. Лакин. – М.: Высш. школа, – 1980. – 293 с.
52. Левенко Б.А. Генетические основы интродукции растений / Б.А. Левенко // Интродукция растений. – 2005. – № 2. – С. 10–16.
53. Лупачев А.В. Почвы оазисов Антарктиды в местах расположения российских антарктических станций: предварительная характеристика, разнообразие и история развития / А.В. Лупачев // Экология и почвы. Палеогеографические аспекты почвенно-экологических исследований.

Материалы XVII Всероссийской Школы. Программа, краткое содержание докладов. Том VIII. – 2011. – С. 19–20.

54. Мазей Н.Г. Влияние ионов $CD+2$ и $PB+2$ на рост и развитие растений пшеницы / Н.Г. Мазей // Известия ПГПУ им. В. Г. Белинского. – 2008. – № 10 (14). – С. 33–38.

55. МакГонигал Д. Антарктика. Голубой континент / Дэвид МакГонигал, Лин Вудворт. – М.: Бертельсманн Медиа Москау, 2004. – 224 с.

56. Маниатис Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, З. Фрич, Дж. Сэмбрук – М.: Мир, 1984. – 480 с.

57. Мартазинова В.Ф. Атмосферная циркуляция Южной полярной области и климат Антарктического полуострова / В.Ф. Мартазинова, В.Е. Тимофеев, Е.К. Иванова – К.: АБЕРС. –2010. – 92 с.

58. Мартазинова В.Ф. Температурно-влажностный режим и погодные условия на станции Академик Вернадский в 2012 г. / В.Ф. Мартазинова, Е.К. Иванова [и др.] // Український антарктичний журнал. – 2013. – № 12. – С. 83–92.

59. Матвеева Н.А. Незнайом Антарктика: рослини розкривають свої таємниці / Н.А. Матвеева // Вісн. НАН України. – 2013. – № 10. – С. 58–70.

60. Мельничук М. Д. Біотехнологія рослин / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, В. А. Кунах ; підруч. – К.: Поліграф Консалтинг, 2003. – 520 с.

61. Методические указания по определению тяжелых металлов в почвах сельхозугодий и продукции растениеводства (издание 2-е, переработанное, дополненное). – М.: ЦИНАО, 1992. – 64 с.

62. Мурзабаев А.Р. Защитные механизмы растений в ответ на токсическое действие ионов кадмия / А.Р. Мурзабаев, М.В. Безрукова, Ф.М. Шакирова // Агрохимия. – 2014. – № 10. – С. 83–93.

63. Мусієнко М.М. Фізіологія рослин: Підручник / М.М. Мусієнко – Київ.: Либідь, 2005. – 808 с.

64. Мягков С.М. Антарктида: прошлое и будущее оледенение / С.М. Мягков – М.: Из-во МГУ, 1989. – 160 с.

65. Національний антарктичний науковий центр [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.uac.gov.ua>.
66. Носов А.М. Функции вторичных метаболитов растений *in vivo* и *in vitro* / А.М. Носов // Физиол. раст. – 1994. – Т. 41, № 6. – С. 873–878.
67. О потеплении в районе Антарктического полуострова / В.Е. Лагун, А.В. Клепиков, А.И. Данилов [и др.] // Проблемы Арктики и Антарктики. – 2010. – № 2 (85). – С. 90–101.
68. Орнитогенные локалитеты *Deschampsia antarctica* в районе Аргентинских островов (Прибрежная Антарктика) / И.Ю. Парникоза, Е.В. Абакумов, И.В. Дикий [и др.] // Рус. орнитол. журн. – 2014. – Т. 23, Экспресс-выпуск № 1056. – С. 3095–3107.
69. Особенности культивирования *in vitro* *Deschampsia antarctica* Desv. с разных мест произрастания в прибрежной Антарктике / О.М. Загречук, Н.М. Дробык, И.Ю. Парникоза [и др.] // Материалы VI Международной научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)», 12–17 октября 2014 г.: тезисы докл. – Ялта, 2014. – С. 26–27.
70. Особливості складу компонентів ліпідного та пігмент-білкових комплексів фотосинтетичних мембран *Deschampsia antarctica* Desv. / Н.Ю. Таран, О.А. Оканенко, І.П. Ожерєдова [та ін.] / Доповіді НАН України. – 2009. – № 2. – С. 173–178.
71. Особливості антарктичної трав'янистої тундри в умовах різних екологічних градієнтів / І.Ю. Парнікоза, Є. Смикла, І.А. Козерецька [та ін.] // Вісн. Укр. тов-ва генетиків та селекціонерів. – 2009. – Т.7, № 2. – С. 218–226.
72. Особливості введення в культуру *in vitro* рослин *Deschampsia antarctica* Desv. та вплив різних концентрацій йонів кадмію на їх ріст // О.М. Загречук, Г.Б. Гуменюк, Т.В. Гарбуз [та ін.] // Концепція сталого розвитку та її реалізація в освіті: матеріали науково-практичної конференції,

присвяченої 75-річчю ТНПУ імені Володимира Гнатюка та хіміко-біологічного факультету, 16–18 квітня 2015 р. – Тернопіль, 2015. – С. 36–37.

73. Особливості накопичення кадмію в культивованих *in vitro* рослинах *Deschampsia antarctica* Desv. / О.М. Загричук, В.О. Хоменчук, Г.Б. Гуменюк [та ін.] // XXVIII Всеукраїнська наукова інтернет-конференція «Вітчизняна наука на зламі епох: проблеми та перспективи розвитку». – Переяслав-Хмельницький. – 2016. – С. 9–11.

74. Особливості хромосомної мінливості в культурі тканин рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з різним числом хромосом / В.А. Кунах, Д.О. Навроцька, М.О. Твардовська [та ін.] // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2016. – Т. 14, № 1. – С. 36–43.

75. Перенесення складових антарктичної трав'янистої тундрової формації домініканським мартином в регіоні Аргентинських островів (Прибережна Антарктика) / І.Ю. Парнікоза, І.В. Дикий, В.Ю. Іванець [та ін.] // Український антарктичний журнал. – 2011/2012. – № 10–11. – С. 271–281.

76. Писаренко В.М. Агроекологія: навч. посіб. / В.М. Писаренко, П.В. Писаренко, В.В. Писаренко – Полтава, 2008. – 256 с.

77. Підвищена стійкість *Deschampsia antarctica* Desv. до мутагенної дії іонів кадмію / К.В. Спірідонова, І.О. Андрєєв, О.М. Загричук [та ін.] // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2016. – Т. 14, № 1. – С. 63–71.

78. Пластичність морфогенезу та особливості репродукції рослин *Colobanthus quitensis* і *Deschampsia antarctica* в Антарктичному регіоні / О.А. Кравець, Н.Ю. Таран, В.О. Стороженко [та ін.] // Український антарктичний журнал. – 2011/2012. – № 10–11. – С. 302–305.

79. Повышение редокс-активности растений как тест-реакция на загрязнение почв / О.З. Еремченко, О.З. Четина, И.Е. Шестаков [и др.] // Вестн. Тамбов. ун-та. Сер. Естеств. и техн. науки. – 2014. – Т. 19. – С. 1285–1288.

80. Полирезистентность и сверхустойчивость к тяжёлым металлам антарктических микроорганизмов / А.Б. Таширеву, Н.А. Матвеева, В.А. Романовская [и др.] // Доп. НАН України. – 2007. – № 11. – С. 170–175.

81. Почвы Антарктического полуострова: результаты и перспективы изучения / Е.В. Абакумов, А.В. Лупачев, И.Ю. Парникоза [и др.] // Материалы II Международной научно-практической конференции: Природная среда Антарктики: современное состояние изученности, 18–21 мая 2016 г. – Республика Беларусь, 2016. – С. 38–44.

82. Раздельное и совместное действие низкой температуры и кадмия на некоторые физиологические показатели пшеницы / Ю.В. Венжик, А.Ф. Титов, Е.С. Холопцева [и др.] // Труды КарНЦ РАН. – 2015. – № 12. – С. 23–34.

83. Распределение Cd и Fe в растениях *Mesembryanthemum crystallinum* при адаптации к Cd-стрессу / Н.И. Шевякова, И.А. Нетронина, Е.Е. Аронова [и др.] // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 5. – С. 756–763.

84. Реакция растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на раздельное и совместное действие низкой температуры и кадмия / Н.С. Репкина, В.В. Таланова, А.Ф. Титов [и др.] // Труды КарНЦ РАН. – 2014. – № 5. – С. 133–139.

85. Светлова Н.Б. Функциональное состояние фотосинтетического аппарата двух видов *Deshampsia* с различным ареалом выращивания в условиях жесткого ультрафиолетового излучения [Электронный ресурс] / Н. Б. Светлова, В. А.Стороженко, Н. Н. Топчий // Научный биологический блог. – 23 февр. 2010. – Режим доступа: <http://shmain.ru/page/112>.

86. Секвенирование последовательностей *RBCL* и *ITS2* антарктических растений для определения возможности их использования в ДНК-штрихкодировании / В. П. Дуплий, Н. А. Матвеева, А. М. Шаховский [и др.] // Український антарктичний журнал. – 2011/2012. – № 10–11. – С. 263–271.

87. Серегин И.В. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения / И.В. Серегин, В.Б. Иванов // Физиология растений. – 2001. – Т. 48. – С. 606–630.

88. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция / Владимир Анатольевич Сидоров. – К.: Наук. думка, 1990. – 280 с.

89. Скринінг вірусних антигенів у рослинах *Deschampsia antarctica* та *Colobanthus quitensis* / С.В. Долгорукова, І.Г. Будзанівська, Ф.П. Дем'яненко [та ін.] // Український антарктичний журнал. – 2010. – № 9. – С. 187–193.
90. Соловьева Л.В. О добавочных хромосомах у жимолости / Л.В. Соловьева, Н.М. Плеханова // Цитология и генетика. – 1992. – Т. 26, № 3. – С. 21–25.
91. Сохранение и микроразмножение *in vitro* растений Антарктики / Н.А. Матвеева, В.Б. Белокурова, В.А. Рудас [и др.] // Біотехнологія, – 2010. – Т. 3, № 3. – С. 33–41.
92. Спірідонова К.В. Вивчення особливостей геномної мінливості культивованих клітин раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* Benth : дис... канд. біол. наук: 03.00.15 / Спірідонова Катерина Василівна. – К., 2000. – 149 с.
93. Страны и народы: научно-популярное географо-этнографическое издание в 20-ти томах. Австралия и Океания. Антарктида / [М.В. Андреева, А.Г. Банников, В.Р. Кабо [и др.]]. Гл. редкол. Ю.В. Бромлей и др. – М.: Мысль, 1981. – 301 с.
94. Таран Н.Ю. Адаптивные реакции *Deschampsia antarctica* Desv. в условиях Антарктики на действие оксидного стресса / Н.Ю. Таран, Л.М. Бацманова, А.А. Оканенко // Український Ботанічний журнал. – 2007. – Т. 64, № 2. – С. 279–289.
95. Титов А.Ф. Тяжелые металлы и растения / А.Ф. Титов, Н.М. Казнина, В.В. Таланова. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. – 194 с.
96. Топчій Н. Сучасні методи виділення ДНК вищих рослин / Н. Топчій // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – Львів, 2006. – Вип. 42. – С. 26–31.
97. Трунова І.О. Екологічна оцінка стану забруднення ґрунтів району відвалу фосфогіпсу ВАТ "СУМИХІМПРОМ" важкими металами /

І.О. Трунова // Вісник СумДУ. Серія Технічні науки. – 2006. – №5 (89). – С. 135–138.

98. Устойчивость растений к тяжелым металлам / А.Ф. Титов, В.В. Таланова, Н.М. Казнина, Г.Ф. Лайдинен; Отв. ред. Н.Н. Немова. – Институт биологии КарНЦ РАН. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. – 172 с.

99. Формування адаптивної відповіді *Glycine max* (L.) Merr. на вплив іонів кадмію залежно від умов азотного живлення / Є.О. Конотоп, І. Матушикова, Л. М. Бацманова [та ін.] // Укр. ботан. журн. – 2012. – Т. 69, № 3. – С. 438–446.

100. Ценотичні зв'язки біоти суходолу островів Західної Антарктики / І.В. Дикий, Й.В. Царик, І.В. Шидловський [та ін.] // Український антарктичний журнал. – 2011/2012. – № 10–11. – С. 239–256.

101. Цитленок С.И. Хромосомный полиморфизм *Crepis sibirica* (Asteraceae) / С.И. Цитленок, С.В. Пулькина // Ботан. журнал. – 1991. – Т. 76, № 11. – С. 1538–1544.

102. Цито- та молекулярно-генетичні дослідження отриманих мікроклональним розмноженням рослин *Deschampsia antarctica* Desv. за тривалого культивування *in vitro* / К.В. Спірідонова, І.О. Андреев, Д.О. Навроцька [та ін.] // VIII Міжнародна Антарктична Конференція, присвячена 25-ій річниці приєднання України до Договору про Антарктику (17 вересня 1992 р.), 16-18 травня 2017 р. – Київ, 2017. – С. 98–99.

103. Цитогенетичний аналіз рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з Прибережної Антарктики / Д.О. Навроцька, М.О. Твардовська, І.О. Андреев [та ін.] // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 184–190.

104. Чаплыгин В.А. Накопление и распределение тяжелых металлов в травянистой растительности техногенных ландшафтов Нижнего Дона: дис. ... кандидата б. наук: 03.02.08 / Чаплыгин Виктор Анатольевич. – Ростов-на-Дону, 2014. – 193 с.

105. Шиша Е.Н. Сохранение *in vitro* биоразнообразия видов рода *Allium* L. / Е.Н. Шиша, И.И. Сикура, Н.В. Кучук // Науковий вісник УжНУ. Серія біологія. – 2008. – Вип. 24. – С. 244–254.
106. Щапова А.И. Эволюция базового числа хромосом в семействе Злаковых (Poaceae Barnh.) / А.И. Щапова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т.15, № 4. – С. 769–780.
107. Щербаченко О.І. Важкі метали як токсичний фактор забруднення природного середовища. Стійкість і адаптація рослин до їх впливу / О.І. Щербаченко // Наукові записки ДПМ. – 2014. – Вип. 30. – С. 157–182.
108. Щербаченко О.І. Вплив іонів важких металів на ростові та фізіолого-біохімічні реакції піщаних і водних культур моху *Drepanocladus aduncus* (Hedv.) Varnst / О.І. Щербаченко // Біологічні студії. – 2012. – Том 6, №2. – С. 179–188.
109. Экологическая обусловленность межпопуляционной гетерогенности *Deschampsia antarctica* Desv. Прибрежной Антарктики / И.Ю. Парникоза, И.А. Козерецкая, Н.Ю. Мирюта [и др.] // Сб. тез. науч. конф. «Россия в Антарктике» (12–14 апреля 2006 г., г. Санкт-Петербург). – С.Пб, 2006. – С. 124–125.
110. Эндолитное почвообразование и скальный “загар” на массивно-кристаллических породах в Восточной Антарктике / Н.С. Мергелов, С.В. Горячкин, И.Г. Шоркунов [и др.] // Почвоведение. – 2012. – № 10. – С. 1027–1044.
111. 18 Plants and lichens in the Antarctic, their way of life and their relevance to soil formation / L. Kappen, B. Schroeter, L. Beyer [et al.] // Geocology of Antarctic ice-free coastal landscapes (Ecol. Stud.). – 2002. – Vol. 154. – P. 327–374.
112. A comparative investigation of DNA strand breaks, sister chromatid exchanges and K-ras gene mutations induced by cadmium salts in cultured human cells / S.A. Mouron, C.A. Grillo, F.N. Dulout [et al.] // Mutat. Res. – 2004. – Vol. 68, № 1. – P. 221–231.

113. Accumulation of dehydrin transcripts and protein in response to abiotic stresses in *Deschampsia antarctica* / N. Olave-Concha, S. Ruiz-Lara, X. Munoz [et al.] // Antarctic Science. – 2004. – Vol. 16, № 2. – P. 175–184.
114. Adaption to alkylation damage in DNA measured by the comet assay / K.J. Angelis, M. McGuffie, M. Menke [et al.] // Environ. Mol. Mutagen. – 2000. – Vol. 36. – P.146–150.
115. Al-Qurainy F. Application of inter simple sequence repeat (ISSR marker) to detect genotoxic effect of heavy metals on *Eruca sativa* (L.) / F. Al-Qurainy // Afr. J. Biotechnol. – 2010. – Vol. 9, № 4. – P. 467–474.
116. Amirthalingam T. Cadmium-induced changes in mitotic index and genotoxicity on *Vigna unguiculata* (Linn.) / T .Amirthalingam, G. Velusamy, R. Pandian // J. Env. Chem. Ecotoxicol. – 2013. – Vol. 5, № 3. – P.57–62.
117. Anatomical Features and Ultrastructure of *Deschampsia antarctica* (Poaceae) Leaves from Different Growing / I. Gielwanowska, E. Szczuka, J. Bednara [et al.] // Habitats Annals of Botany. – 2005. – Vol. 96, № 6. – P. 1109–1119.
118. Antarctic climate change during the last 50 years / J. Turner, S.R. Colwell, G.J. Marshall [et al.] // Int. J. Climatol. – 2005. – Vol. 25. – P. 279–294.
119. Antarctic herb tundra colonization zones in the context of ecological gradient of glacial retreat / I.Yu. Parnikoza, D.M. Inozemtseva, O.V. Tyshenko [et al.] // Ukr. Botan. Journ., – 2008. – Vol. 65, № 4. – P. 504–512.
120. Antarctic terrestrial life – challenging the history of the frozen continent? / P. Convey, J.A.E. Gibson, C.D. Hillenbrand [et al.] // Biol. Rev. – 2008. – Vol. 83, № 2. – P. 103–117.
121. Assessment of the genotoxicity of heavy metals in *Phaseolus vulgaris* L. as a model plant system by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis / D. Gjorgieva, T. Kadifkova-Panovska, S. Mitrev [et al.] // J Environ. Sci. Health, Part A: Tox. / Hazard Subst. Environ. Eng. – 2012. – Vol. 47, №3. – P. 366–373.

122. Bargagli R. Antarctic ecosystems / Roberto Bargagli // Ecol. Studies. – 2005. – Vol. 175. – P. 1–395.
123. Baseline values for metals in soils on Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica: the extent of anthropogenic pollution / Z. Lu, M. Cai, J. Wang [et al.] // Environ Monit Assess. – 2012. – Vol. 184. – P. 7013–7021.
124. Bertrand M. Photosynthetic organisms and excess of metals / M. Bertrand, I. Poirier // Photosynthetica. – 2005. – Vol. 43. – P. 345–353.
125. Biosynthesis of scopoletin and scopolin in cassava roots during post-harvest physiological deterioration: The E-Z-isomerisation stage / S. Bayoumi, M. Rowan, I. Blagbrough [et al.] // Phytochemistry. – 2008. – Vol. 69, № 17. – P. 2928–2936.
126. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part II: Reconstruction of multienzyme pathways in plant and microbes / F. Ververidis, E. Trantas, C. Douglas // Biotechnology Journal. – 2007. – Vol. 2, № 10. – P. 1235–1249.
127. Bockheim J.G. A review of pedogenic zonation in well-drained soils of the southern circumpolar region / J.G. Bockheim, F.C. Ugolini // Quaternary Research. – 1990. – Vol. 34. – P. 47–66.
128. Bockheim J.G. Permafrost, active-layer dynamics and periglacial environments of continental Antarctica / J.G. Bockheim, K.J. Hall // South African Journal of Science 98. – 2002. – P. 82–90.
129. Bölter M. Soil development and soil biology on King George Island, Maritime / Manfred Bölter // Antarctic Polish Polar Research. – 2011. – Vol. 32, № 2. – P. 105–116.
130. Bystrzejewska G. Photosynthetic temperature response of Antarctic plant *Deschampsia antarctica* and of temperate region plant *Deschampsia coespitosa* / Grażyna Bystrzejewska // Polish J. Ecol. – 2001. – Vol. 49. – P. 215–219.
131. Cadmium Accumulation in *Marsilea minuta* Linn. and Its Antioxidative Responses // K. Das, C. Mandal, N. Ghosh [et al.] // AJPS. – 2013. – Vol. 4. – P. 365–371.

132. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair / Y.H. Jin, A.B. Clark, R.J.C. Slebos [et al.] // Nat. Genetics. – 2003. – Vol. 34. – P. 326–329.

133. Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics / A.F. López-Millán, R. Sagardoy, M. Solanas [et al.] // Environ. Exp. Bot. – 2009. – Vol. 65. – P. 376–385.

134. Cadmium-induced antioxidant status and sister-chromatid exchanges in *Vicia faba* L. / S. Ünyayar, A. G. Değer, A. Çelik [et al.] // Turk. J. Biol. – 2010. – Vol. 34, № 4. – P. 413–422.

135. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots / A. Schützendübel, P. Schwanz, T. Teichmann [et al.] // Plant Physiol. – 2001. – Vol. 127. – P. 887–898.

136. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba* / S. Unyayar, A.Celik, F. Ozlem [et al.] // Mutagenesis. – 2006. – P. 1–5.

137. Cao H. Ecotoxicity of cadmium to maize and soybean seedling in black soil / H. Cao, J. Wang, X. Zhang // Chinese Geographical Science. – 2007. – Vol. 17, № 3. – P. 270–274.

138. Carbohydrates in *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* / A.I. Piotrowicz-Cieślak, I. Gielwanowska, A. Bochenek [et al.] // Acta Societatis Botanicorum Poloniae. – 2005. – Vol. 74. – P. 209–217.

139. Casanova-Katny M.A. Antarctic moss carpets facilitate growth of *Deschampsia antarctica* but not its survival / M.A. Casanova-Katny, L.A. Cavieres // Polar Biol. – 2012. – Vol. 35. – P. 1869–1878.

140. Change of fattyacid composition in plants during adaptation to hypothermia / M.A. Zhivet'ev, I.A. Graskova, L.V. Dudareva [et al.] // J. Stress Physiol. Biochem. – 2010. – Vol. 6, №. 4. – P. 51–65.

141. Chwedorzewska K.J. Genetic and epigenetic studies on populations of *Deschampsia antarctica* Desv. from contrasting environments on King George Island / K.J. Chwedorzewska, P.T. Bednarek // Pol. Polar Res. – 2011. – Vol. 32, № 1. – P. 15–26.

142. Cloning and functional characterization of *PpDBF1* gene encoding a DRE-binding transcription factor from *Physcomitrella patens* / N. Liu, N.Q. Zhong, G.L. Wang [et al.] // *Planta*. – 2007. – Vol. 226, № 4. – P. 827–838.

143. Cloning and molecular-genetic analysis *Deschampsia antarctica* mitochondrial sequences / R. Makarenko, O. Savchuk, A. Rumianceva [et al.] // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка*. – 2013 2 (64). – С. 45–47.

144. Cold acclimation induces rapid and dynamic changes in freeze tolerance mechanisms in the cryophile *Deschampsia antarctica* E. Desv. / O. Chew, S. Lelean, U.P. John [et al.] // *Plant Cell Environ.* – 2012. – Vol. 35. – P. 829–837.

145. Cold resistance in Antarctic angiosperms / L.A. Bravo, N. Ulloa, G.E. Zúñiga [et al.] // *Physiologia Plantarum* – 2001. – Vol. 111. – P. 55–65.

146. Combined Analysis of the Chloroplast Genome and Transcriptome of the Antarctic Vascular Plant *Deschampsia antarctica* Desv / J. Lee, Y. Kang, S.C. Shin [et al.] // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9, № 3. – P. e92501. doi:10.1371/journal.pone.0092501.

147. Comparative analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. population adaptability in the natural environment of the Admiralty Bay region (King George Island, maritime Antarctic) / I. Parnikoza, N. Miryuta, I. Ozheredova [et al.] // *Polar Biol.* – 2015. – Vol. 38, № 9. – P. 1401–1411.

148. Comparative molecular cytogenetic characterization of seven *Deschampsia* (*Poaceae*) species [Електронний ресурс] / A.V. Amosova, N.L. Bolsheva, S.A. Zoshchuk [et al.] // *PLoS One*. – 2017. – Режим доступу: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175760>.

149. Comparative study on utilization of vascular plants by Antarctic birds / I. Parnikoza, V. Trokhymets, J. Smykla [et al.] // *Electronic Conference on Interactions between Antarctic Life and Environmental Factors, IPY-related Research Brno, October 22-th-23-th, 2009.* “Structure and function of Antarctic Terrestrial ecosystems”. – Book of Abstracts and Contributed Papers. – Brno. – 2009. – P. 43–47.

150. Convey P. Maritime Antarctic climate Change Signals from terrestrial biology / P. Convey // Antarctic research series. – 2003. – Vol. 79. – P. 145–158.

151. Convey P. Reproduction of Antarctic flowering plants / P. Convey // Antarctic Science. – 1996. – Vol. 8, № 2. – P. 127–134.

152. Corner R.W.M. Studies in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. and *Deschampsia antarctica* Desv.: IV. Distribution and reproductive performance in the Argentine Islands / R.W.M. Corner // Br. Antarct. Surv. Bull. – 1971. – Vol. 26. – P. 41–50.

153. Day T.A. Influence of solar ultraviolet-B radiation on Antarctic terrestrial plants: results from a 4-year field study / T.A. Day, C.T. Ruhland, F.S. Xiong // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2001. – Vol. 62. – P. 78–87.

154. *Deschampsia antarctica* Desv. primary photochemistry performs differently in plants grown in the field and laboratory / M.A. Casanova-Katny, G.E. Zúñiga, L.J. Corcuera [et al.] // Polar Biol. – 2010. – Vol. 33. – P. 477–483.

155. *Deschampsia antarctica* Desv. в Прибрежной Антарктике: видовая уникальность или долговременные адаптивные стратегии? / И.Ю. Парникоза, И.А. Козерецкая, М.П. Андреев [и др.] // Ukr. Bot. J. – 2013. – Vol. 70, № 5. – P. 614–623.

156. Determination of genetic integrity in long-term micropropagated plantlets of *Allium ampeloprasum* L. using ISSR markers / S. Gantait, N. Mandal, S. Bhattacharyya [et al.] // Biotechnology. – 2010. – Vol. 9, № 2. – P. 218–223.

157. Differential accumulation of dehydrin-like proteins by abiotic stresses in *Deschampsia antarctica* Desv. / N. Olave-Concha, L.A. Bravo, S. Ruiz-Lara [et al.] // Polar Biol. – 2005. – Vol. 28. – P. 506–513.

158. Discussion note on soil development under the influence of terrestrial vegetation at two distant regions of the Maritime Antarctic / I. Parnikoza, S. Korsun, I. Kozerecka, [et al.] // Polarforschung. – 2011. – Vol. 80, № 3. – P. 181–185.

159. Distribution and characterization of recrystallization inhibitor activity in plant and lichen species from the UK and maritime Antarctic / C.J. Doucet, L. Byass, L. Elias [et al.] // *Cryobiology*. – 2000. – Vol. 40, № 3. – P. 218–227.

160. Distribution of rDNA and polyploidy in *Deschampsia antarctica* E. Desv. in Antarctic and Patagonic populations / M.L. González, J.D. Urdampilleta, M. Fasanella [et al.] // *Polar Biol.* – 2016. – Vol. 39. – P. 1663–1677.

161. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis / W. Liu, P.J. Li, X.M. Qi [et al.] // *Chemosphere*. – 2005. – Vol. 61. – P. 158–167.

162. DNA damage in potato plants induced by cadmium, ethyl methanesulphonate and gamma-rays / T. Gichner, Z. Patkova, J. Szakova [et al.] // *Environ. Exp. Bot.* – 2008. – Vol. 62. – P. 113–119.

163. Dodds J.H. Experiments in Plant Tissue Culture. / J.H. Dodds, L.W. Roberts // 2nd Ed. Cambridge University Press, Cambridge. – 1985. – 272 p.

164. Doyle J.J. A rapid DNA isolation of fresh leaf tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // *Phytochem. Bull.* – 1987. – Vol. 19. – P. 11–15.

165. Drazkiewicz M. Age-dependent response of maize leaf segments to cadmium treatment: effect on chlorophyll fluorescence and phytochelatin accumulation / M. Drazkiewicz, A. Tukendorf, T. Baszynski // *J. Plant Physiol.* – 2003. – Vol. 160. – P. 247–254.

166. Ecological variability of *Deschampsia antarctica* Desv. in the area of Admiralty bay (King George Island, Maritime Antarctic) / A. Barcikowski, J. Czaplewska, P. Loro [et al.] // *Instytut Botaniki PAN, Kraków*. – 2003. – P. 383–396.

167. Ecophysiological traits of Antarctic vascular plants: their importance in the responses to climate change / L.A. Cavieres, P. Sáez, C. Sanhueza [et al.] // *Plant Ecology*. – 2016. – Vol. 217. – P. 343–358.

168. Ecophysiology of Antarctic vascular plants / M. Alberdi, L.A. Bravo, A. Gutierrez [et al.] // *Physiol. Plant.* – 2002. – Vol. 115, № 4. – P. 479–486.

169. Edwards J. A. Studies in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. and *Deschampsia antarctica* Desv.: VI. Reproductive performance on Singy Island / J.A. Edwards // Brit. Antarct. Survey Bull. – 1974. – Vol. 39. – P. 67–86.

170. Effect of manganese toxicity on the proteome of the leaf apoplast in cowpea / M.M. Fecht-Christoffers, H.P. Braun, C. Lemaitre-Guillier [et al.] // Plant Physiol. – 2003. – Vol. 133. – P. 1935–1946.

171. Evaluation of the genetic fidelity of *in vitro*-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers / R. Bhatia, K.P. Singh, T.R. Sharma [et al.] // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2011. – Vol. 104. – P. 131–135.

172. Expansion of Antarctic vascular plants on an Antarctic island – a consequence of climate change? / U. Gerighausen, K. Bräutigam, O. Mustafa [et al.] // Antarctic Biology in a Global Context. – 2003. – P. 79–83.

173. Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd-hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* / J.E. van de Mortel, H. Schat, P.D. Moerland [et al.] // Plant Cell Environ. – 2008. – Vol. 31. – P. 301–324.

174. Flavonoid concentrations in three grass species and a sedge grown in the field and under controlled environment conditions in response to enhanced UV-B radiation / J. Van de Staaij, N.V. De Bakker, A. Oosthoek [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2002. – Vol. 66, № 1. – P. 21–29.

175. Flow cytometric assessment of Cd genotoxicity in three plants with different metal accumulation and detoxification capacities / M.S. Monteiro, E. Rodriguez, J. Loureiro [et al.] // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2010. – Vol. 73, № 6. – P. 1231–1237.

176. Fojtova M. Genotoxic effect of cadmium is associated with apoptotic changes in tobacco cells / M. Fojtova, A. Kovařik // Plant Cell Environ. – 2000. – Vol. 23. – P. 531–537.

177. Furness R.W. Family Stercorariidae Skuas. Handbook of the Birds of the World / R.W. Furness // Hoatzin to Auks, Barcelona, Lynx Edicions, – 1996. – P. 556–571.

178. Gamborg O.L. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley / O.L. Gamborg, D.E. Eveleigh // Can. J. Biochem. – 1968. – Vol. 46, №5. – P. 417–421.

179. Genese des chromosomes B et leur avenir évolutif / R. Lespinasse // Actes Colloq. biol. populat. – 1987. – P. 427–432.

180. Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers / T. Ray, I. Dutta, P. Saha [et al.] // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2006. – Vol. 85. – P. 11–21.

181. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassay / H. Steinkellner, K. Mun-Sik, C. Helm [et al.] // Environ. Mol. Mutagen. – 1998. – Vol. 31. – P. 183–191.

182. Genotoxic impact of cadmium on root meristem of *Vicia faba* L / T. Parween, S. Jan, M.P.M. Sharma [et al.] // Russ. Agricult. Sci. – 2011. – Vol. 37. – P. 115–119.

183. Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. / A. Metwally, V.I. Safronova, A.A. Belimov [et al.] // J. Exp. Bot. – 2005. – Vol. 56. – P. 167–178.

184. Giełwanowska I. Biologiczne przystosowania roślin kwiatowych do warunków klimatycznych Antarktyki morskiej / I. Giełwanowska // Kosmos. Problemy nauk biologicznych – 2013. – T. 62. – P. 381–391.

185. Giełwanowska I. New ultrastructural features of leaf cells organelles in *Deschampsia antarctica* Desv. / I. Giełwanowska, E. Szczuka // Polar Biol. – 2005. – Vol. 28. – P. 951–955.

186. Giełwanowska I. Specyfika rozwoju antarktycznych roślin naczyniowych *Colobanthus quitensis* (Kunth.) Bartl. i *Deschampsia antarctica* Desv / I. Giełwanowska // Olsztyn: Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. – 2005. – P. 10–73.

187. Global southern limit of flowering plants and moss peat accumulation / P. Convey, D.W. Hopkins, S.J. Roberts [et al.] // Polar Res. – 2011. – Vol. 30. – P. 1–10.

188. Gonzalez-Chaves M.C. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements / M.C. Gonzalez-Chaves, S.F. Wright, K.A. Nicols // Environ. Pollut. – 2004. – Vol. 130. – P. 317–323.
189. Gupta M. Heavy metal induced DNA changes in aquatic macrophytes: Random amplified polymorphic DNA analysis and identification of sequence characterized amplified region marker / M. Gupta, N.B. Sarin // J. Environ. Sci. – 2009. – Vol. 21. – P. 686–690.
190. Habitat and leaf cytogenetic characteristics of *Deschampsia antarctica* Desv. in the Maritime Antarctica / I.Yu. Parnikoza, N.Yu. Miryuta, D.N. Maidanyuk [et al.] // Polar Science. – 2007. – Vol. 1. – P. 121–128.
191. Hall J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance / J.L. Hall // J. Exp. Bot. – 2002. – Vol. 53, № 366. – P. 1–11.
192. Hartwig A. Interaction by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications / A. Hartwig, T. Schwerdtle // Toxicol. Lett. – 2002. – Vol. 127, № 1–3. – P. 47–54.
193. Hartwig A. Role of DNA-repair inhibition in lead-induced and cadmium- induced genotoxicity – a review / A. Hartwig // Environ. Health Perspect. – 1994. – Vol. 102. – P. 45–50.
194. High anatomical and low genetic diversity in *Deschampsia antarctica* Desv. from King George Island, the Antarctic / K.J. Chwedorzewska, I. Gielwanowska, E. Szczuka [et al.] // Pol. Polar Res. – 2008. – Vol. 29, № 4. – P. 377–386.
195. Hossain Z. Studies on the interaction between Cd²⁺ ions and nucleobases and nucleotides / Z. Hossain, F. Huq // J. Inorg. Biochem. – 2002. – Vol. 90. – P. 97–105.
196. Ice recrystallization inhibition proteins (IRIPs) and freeze tolerance in the cryophilic Antarctic hair grass *Deschampsia antarctica* E. Desv. / U.P. John, R.M. Polotnianka, K.A. Sivakumaran [et al.] // Plant Cell Environ. – 2009. – Vol. 32. – P. 336–348.

197. Ice recrystallization inhibition proteins of perennial ryegrass enhance freezing tolerance / C. Zhang, S.Z. Fei, R. Arora [et al.] // *Planta*. – 2010. – Vol. 232. – P. 155–164.

198. Identification and characterization of three novel cold acclimation-responsive genes from the extremophile hair grass *Deschampsia antarctica* Desv / M. Gidekel, L. Destefano-Beltrán, P. García [et al.] // *Extremophiles*. – 2003. – Vol. 7, № 6. – P. 459–469.

199. Identification of cadmium regulated genes by cDNA-AFLP in the heavy metal accumulator *Brassica juncea* L. / N. Fusco, L. Micheletto, G.D. Corso [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2005. – Vol. 56, № 421. – P. 3017–3027.

200. Influence of heavy metal stress on antioxidant status and DNA damage in *Urtica dioica* / D. Gjorgieva, T. Kadifkova Panovska, T. Ruskovska [et al.] // *BioMed Res. Intern.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 1–6. Article ID 276417. – DOI:10.1155/2013/276417.

201. Interpopulation heterogeneity of *Deschampsia antarctica* Desv. According to the variability of nuclei areas and the relative level of DNA in different tissues of leaves / I. Parnikoza, M. Mazur, N. Myryuta [et al.] // *Український антарктичний журнал* – 2005. – № 3. – С. 128–134.

202. Investigation of DNA changes in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by cadmium using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis / A. Azimi, F. Shahriari, A. Fotovat [et al.] // *Afr. J. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 12, №16. – P. 1921–1929.

203. Is a Translocation of Indigenous Plant Material Successful in the Maritime Antarctic? / I. Parnikoza, O. Kozeretska, I. Kozeretska // *Polarforschung*. – 2008. – Vol. 78, № 1–2. – P. 25–27 (erschienen 2009).

204. Jellings A. J. Variation in the chloroplast to cell area index in *Deschampsia antarctica* along a 160 latitudinal gradient / A.J. Jellings, M.B. Usher, R.M. Leech // *Bull. Br. Antarct. Surv.* – 1983. – Vol. 61, №10. – P. 13–20.

205. Jonak C. Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium / C. Jonak, H. Nakagami, H. Hirt // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 136. – P. 3276–3283.

206. Joshi P. Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay / P. Joshi, V. Dhawan // *Biol. Plant.* – 2007. – Vol. 51, № 1. – P. 22–26.

207. Kabata-Pendias A. Trace elements in soils and plants / Alina Kabata-Pendias, Henryk Pendias // Boca Raton: CRC Press. – 2010. – 548 p.

208. Karyological studies in *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) / S. Cardone, P. Sawatani, P. Rush [et al.] // *Polar Biol.* – 2008. – Vol. 32, № 3. – P. 427–433.

209. Keystone species and ecosystems functioning: the role of penguin colonies in differentiation of the terrestrial vegetation in the Maritime Antarctic / A. Barcikowski, A. Lyszkiewicz, P. Loro [et al.] // *Ecological Questions.* – 2005. – № 6. – P. 117–128.

210. King J.C. Antarctic Peninsula climate variability and its causes as revealed by analysis of instrumental records. Antarctic Peninsula Climate Variability: Historical and Paleoenvironmental Perspectives / J.C. King // *Antarctic Research Series* 79. – 2003. – P. 17–30.

211. Komárková V. Additional and revisited localities of vascular plants, *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. in the Antarctic Peninsula area / V. Komárková, S. Poncet, J. Poncet // *Arct. Alp. Res.* – 1990. – Vol. 22, №1. – P. 108–113.

212. Komárková V. Two native vascular plants, *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl.: A new southernmost locality and other localities in the Antarctic Peninsula area / V. Komárková, S. Poncet, J. Poncet // *Arct. Alp. Res.* – 1985. – Vol. 17. – P. 401–416.

213. Krna M.A. Effects of neighboring plants on the growth and reproduction of *Deschampsia antarctica* in Antarctic tundra / M.A. Krna, T.A. Day, C.T. Ruhland // *Polar Biology.* – 2009. – Vol. 32, № 10. – P. 1487–1494.

214. Kumar Rai P., Kumar G. The genotoxic potential of two heavy metals in inbred lines of maize (*Zea mays* L.) / P. Kumar Rai, G. Kumar // Turk. J. Bot. – 2010. – Vol. 34 – P. 39–46.

215. Leaf anatomy of *Deschampsia antarctica* (Poaceae) from the Maritime Antarctic and its plastic response to changes in the growth conditions / M. Romero, A. Casanova, G. Iturra [et al.] // Revista Chilena de Historia Natural. – 1999. – Vol. 72. – P. 411–425.

216. Leishman M.R. Vegetation abundance and diversity in relation to soil nutrients and soil water content in Vestfold Hills, East Antarctica / M.R. Leishman, C. Wild // Antarctic Science. – 2001. – Vol. 13, № 2. – P. 126–134.

217. Libros de Santiago G. de la Vega [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://contactosilvestre.blogspot.com/2013/04/plantas-con-flor-en-la-peninsula.html>.

218. Light regulation of sucrose-phosphate synthase activity in the freezing-tolerant grass *Deschampsia antarctica* / A. Zúñiga-Feest, D.R. Ort, A. Gutiérrez [et al.] // Photosynth. Res. – 2005. – Vol. 83, № 1. – P. 75–86.

219. Lindsay D.C. Vegetation of the South Shetland Islands / D.C. Lindsay // Br. Antarct. Surv. Bull. – 1971. – Vol. 25. – P. 59–83.

220. Longton R.E. Vegetation ecology and classification in the Antarctic Zone / R.E. Longton // Can. J. Bot. – 1979. – Vol. 57. – P. 2264–2278.

221. Marques V. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions / V. Marques, A. Farah // Food Chemistry. – 2009. – Vol. 113, № 4. – P. 1370–1376.

222. Mechanisms of Antarctic vascular plant adaptation to abiotic environmental factors / I.P. Ozheredova, I.Yu. Parnikoza, O.O. Poronnik [et al.] // Cytology and Genetics. – 2015. – Vol. 49, № 2. – P. 139–145.

223. Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture *in vitro* / A. Gajdošová, M.G. Ostrolucká, G. Libiaková [et al.] // J. Fruit Orn. Plant Res. – 2006. – № 14 (Suppl. 1). – P. 103–119.

224. Micropropagation of *Deschampsia antarctica* – a frost resistant Antarctic plant / M. Cuba, A. Gutierrez-Moraga, B. Butendieck [et al.] // Antarctic science. – 2005. – Vol. 17, №1. – P. 69–70.

225. Misra R.R. Evaluation of the direct genotoxic potential of cadmium in four different rodent cell lines / R.R. Misra, G.T. Smith, M.P. Waalkes // Toxicol. – 1998. – Vol. 126. – P. 103–114.

226. Mixoploidy in *Deschampsia antarctica* of the Maritime Antarctic / V.I. Adonin, I.Yu. Parnikoza, S.S. Kyrychenko [et al.] // Матеріали читань присвячених 300-річчю з дня народження К. Ліннея. – Луганськ: ЕЛТОН-2. – 2007. – С. 74.

227. Molecular Cytogenetic Analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae), Maritime Antarctic / A.V. Amosova, N.L. Bolsheva, T.E. Samatadze [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, № 9. – P. 1–17.

228. Molecular Evolution and Variability of ITS1- ITS2 in Populations of *Deschampsia antarctica* from Two Regions of the Maritime Antarctic / R.A. Volkov, I.A. Kozeretska, S.S. Kyryachenko [et al.] // Polar Science. – 2010. – Vol. 4, № 3. – P. 469–478.

229. Molecular markers to assess genetic diversity of *Gentiana lutea* L. from the Ukrainian Carpathians / M.Z. Mosula, I.O. Andreev, O.M. Bublyk [et al.] // Plant Gen. Res. – 2015. – Vol. 13. – P. 266–273.

230. Montiel P.O. Soluble carbohydrates (trehalose in particular) and cryoprotection in polar biota / P.O. Montiel // Cryoletters. – 2000. – Vol. 21. – P. 83–90.

231. Moore D. M. Flora of Tierra del Fuego / David M. Moore. – Shrewsbury: Anthony Nelson, 1983. – 396 p.

232. Moore D.M. Studies in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl and *Deschampsia antarctica* Desv.: II Taxonomy, distribution and relationships / D. M. Moore // Bull. Br. Antarct. Surv. – 1970. – Vol. 23, № 6. – P. 63–80.

233. Morimoto R.I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and

negative regulators / R.I Morimoto // Genes Develop. – 1998. – Vol. 12. – P. 3788–3796.

234. Mosyakin S.L. Origins of native vascular plants of Antarctica: comments from historical phytogeography viewpoint / S.L. Mosyakin, L.G. Bezusko, A.S. Mosyakin // Цитология и генетика. – 2007. – Vol. 41, № 5. – P. 54–63.

235. Mozafari A.A. *In vitro* propagation and conservation of *Satureja avromanica* Maroofi – an indigenous threatened medicinal plant of Iran / A.A. Mozafari, Y. Vafaee, E. Karami // Physiol. Mol. Biol. Plants. – 2015. – Vol. 21, № 3. – P. 433–439.

236. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Phys. Plant. – 1962. – Vol.15, № 3. – P. 473–497.

237. New forms of chromosome polymorphism in *Deschampsia antarctica* Desv. From the argentine islands of the maritime antarctic region / D.A. Navrotska, M.O. Twardovska, I.O. Andreev [et al.] // Український антарктичний журнал. – 2014. – № 13. – С. 185–191.

238. Observations: surface and atmospheric climate change. Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change / K.E. Trenberth, P.D. Jones, P.G. Ambenje [et al.] // Cambridge University Press. – 2007. – P. 235–336.

239. Parnikoza I. Vascular plants of the Maritime Antarctic: Origin and adaptation / I. Parnikoza, I. Kozeretska, V. Kunakh // American Journal of Plant Sciences. – 2011. – Vol. 2. – P. 381–395.

240. Parnikoza I.Yu. Are *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. Migratory relicts? / I.Yu. Parnikoza, D.N. Maidanuk, I.A. Kozeretska // Цитология и генетика. – 2007. – № 4. – С. 36–40.

241. Pat. EP 2638798 A1. (PCT/CL2011/000068) European patent application published in accordance with Art. 153 (4) EPC. Thermo-photo-bioreactor and method for the culture and mass micropropagation of *Deschampsia*

antarctica in vitro. / Z. Navarro, S. Honorato, C. Oyarzun [et al.]; applicant Universidad De Santiago De Chile 3363 Santiago; representative: L Carpintero, Francisco, Herrero & S.L. Asociados. – № 11805371.9; date of filing 09.11.2011; date of publication 18.09.2013, Bul. 2013/38.

242. Pat. WO 2009064480 A1 New extracts of *Deschampsia antarctica* Desv. with antineoplastic activity / J. Becera, M. Gidekel, H. Weber [et al.]; this application claims priority of the U.S. provisional application № 61/003,058. – № PCT/US2008/012819; filed on 14.11.2008; date of publication 22.05.2009.

243. Patra N.K. Bchromosomes in spontaneous and induced intercellular chromosome migration of *Papaver somniferum* / N.K. Patra, H.K. Srivastava, S. P. Shauhan // Indian J. Genet. Plant Breed. – 1988. – Vol. 48, № 1. – P. 31–42.

244. Pearce D.A. Viruses in Antarctic ecosystems/ D.A. Pearce, W.H. Wilson // Antarctic Science – 2003. – Vol. 15. – P. 319–331.

245. Peklo A.M. The Birds of Argentine Islands and Petermann Island / A.M. Peklo // Kryvyy Rih: Mineral Publishers. – 2007. – P. 1–264.

246. Photosynthetic temperature response of the Antarctic vascular plants *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* / F.S. Xiong, C.T. Ruhland, T.A. Day // Physiologia Plantarum. – 1999. – Vol. 106. – P. 276–286.

247. Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms / D.A. Levin, B.G. Palestis, R.N. Jones [et al.] // Evolution. – 2005. – Vol. 59. – P. 962–969.

248. Physiological responses of vascular plants to heavy metals / F. Fodor, M.N.V. Prasad, K. Strzałka [et al.] // Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. – 2002. – P. 149–177.

249. Polar regions (Arctic and Antarctic) / O.A. Anisimov, D.G. Vaughan, T.V. Callaghan [et al.] // Climate Change. – 2007. – P. 653–685.

250. Population of Antarctic hairgrass (*Deschampsia antarctica*) show low genetic diversity / R. Holderegger, I. Stehlic, R.I.L. Smith [et al.] // Arct., Antarct. Alp. Res. – 2003. – Vol. 35, № 2. – P. 214–217.

251. Pradeep Reddy M. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding / M. Pradeep Reddy, N. Sarla, E.A. Siddiq // *Euphytica*. – 2002. – Vol. 128, №1. – P. 9–17.

252. Production of phenolic metabolites by *Deschampsia antarctica* shoots using UV-B treatments during cultivation in a photobioreactor / A. Sequeira, E. Tapia, M. Ortega // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2012. – Vol. 15, № 4. – P. 1–8.

253. Protective effects of three extracts from Antarctic plants against ultraviolet radiation in several biological models. / P.B. Kappel, R.R. Moreira, S. da Juliana [et al.] // *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. – 2009. – Vol. 96. – P. 117–129.

254. Random amplified polymorphic DNA analysis detects variation in a micropropagated clone of *Trichodesma indicum* (L.) R. Br. / N. Verma, V. Koche, K.L Tiwari [et al.] // *African J. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 9, № 28. – P. 4322–4325.

255. Recent rapid regional climate warming on the Antarctic Peninsula / D.G. Vaughan, G.J. Marshall, W.M. Connolley [et al.] // *Climatic Change*. – 2003. – Vol. 60. – P. 243–274.

256. Retreating glacier-fronts on the Antarctic Peninsula over the last 50 years / A. Cook, A.J. Fox, D.G. Vaughan [et al.] // *Science*. – 2005. – Vol. 22. – P. 541–544.

257. Reyes M. A. Accumulation of HSP70 in *Deschampsia antarctica* Desv. leaves under thermal stress / M.A. Reyes, L.J. Corcuera, L. Cardemil // *Antarctic Science*. – 2003.–Vol. 15, №5. – P. 345–352.

258. Römheld V. Significance of root exudates in acquisition of heavy metal from a contaminated calcareous soil by graminaceous species / V. Römheld, F. Awad // *J. Plant*. – 2000. – Vol. 23. – P. 1857–1866.

259. Roy C.R. Effects of ozone depletion on the ultraviolet radiation environment at the Australian stations in Antarctica. Ultraviolet radiation in Antarctica: measurements and biological effects / C.R. Roy, H.P Gies, D.W. Tomlinson // *Antarctic Research Series*. – 1994. – Vol. 62. – P. 1–15.

260. Sanitá di Toppi L. Response to cadmium in higher plants / L. Sanitá di Toppi, R. Gabbrielli // *Environ. Exp. Bot.* – 1999. – Vol. 41. – P. 105–130.

261. Saralva L.S. Genetic evidence of an internal deletion induced by B chromosomes in maize (*Zea mays* L.) / L.S. Saralva, C.B. de Carvalho // *Rev. Bras. Genet.* – 1993. – Vol. 6, № 1. – P. 107–113.

262. Schenk R.U. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures / R.U. Schenk, A.C. Hildebrandt // *Can. J. Bot.* – 1972. – Vol. 50. – P. 199–204.

263. Schluter P.M. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data / P.M. Schluter, S.A. Harris // *Mol. Ecol. Notes.* – 2006. – 6, № 2. – P. 569–572.

264. Smith R.I.L. Terrestrial plant biology of the sub-Antarctic and Antarctic / R.I.L. Smith // *Antarct. Ecol.* – 1984. – Vol. 1. – P. 61–162.

265. Smykla J. Zonation of vegetation related to penguin rookeries on King George Island, Maritime Antarctic / J. Smykla, J. Wolek., A. Barcikowski // *Arctic, Antarctic and Alpine Research* – 2007. – Vol. 39, № 1. – P. 143–151.

266. Soni M. Rapid *in vitro* propagation, conservation and analysis of genetic stability of *Viola pilosa* / M. Soni, R. Kaur // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* – 2014. – Vol. 20, № 1. – P. 95–101.

267. Subantarctic flowering plants: preglacial survivors or post-glacial immigrants? / N. Van der Putten, C. Verbruggen, R. Ochyra [et al.] // *Journal of Biogeogr.* – 2010. – Vol. 37. – P. 582–592.

268. Suzuki N. Screening of cadmium responsive genes in *Arabidopsis thaliana* / N. Suzuki, N. Koizumi, H. Sano // *Plant Cell Environ.* – 2001. – Vol. 24. – P. 1177–1188.

269. Tatur A. Ornithogenic ecosystems in the Maritime Antarctic – formation development and disintegration / The coastal and shelf ecosystem of Maritime Antarctica. Admiralty Bay, King Georges Island (collected reprints) / A. Tatur // *Warsaw University Press.* – 2005. – P. 27–47.

270. The complex studying of antarctic biota / V. Polishuk, I. Kostikov, N. Taran [et al.] // Український антарктичний журнал. – 2009. – № 8. – С. 293–301.

271. The enigma of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* in Antarctica / R.I.L. Smith, A.H.L. Huiskes, W.W.C. Gieskes [et al.] // Antarct. Biol. in a Global Context – Leiden: Backhuys. – 2003. – P. 234–239.

272. The influence of ultraviolet-B radiation on growth, hydroxycinnamic acids and flavonoids of *Deschampsia antarctica* during springtime ozone depletion in Antarctica / C. Ruhland, F. Xiong, W. Clark [et al.] // Photochemistry and Photobiology. – 2005. – Vol. 81, № 5. – P. 1086–1093.

273. The problem of ozone depletion in northern Europe / L.O. Bjorn, T.V. Callaghan, C. Gehrke [et al.] // Ambio. – 1998. – Vol. 27. – P. 275–279.

274. The role of photochemical quenching and antioxidants in photoprotection of *Deschampsia antarctica* / E. Pérez-Torres, A. Garcia, J. Dinamarca [et al.] // Functional Plant Biology. – 2004. – Vol. 31, №7. – P. 731–741.

275. The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems-an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. / J. Rozema, L.O. Björn, J.F. Bornman [et al.] // J. Photochem. Photobiol. B. – 2002. – Vol. 66, № 1. – P. 2–12.

276. Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots / R. Aina, M. Labra, P. Fumagalli [et al.] // Environ. Exp. Bot. – 2007. – Vol. 59, № 3. – P. 381–392.

277. Torres-Mellado G.A. Antarctic hairgrass expansion in the South Shetland archipelago and Antarctic Peninsula revisited / G.A. Torres-Mellado, R. Jaña, M.A. Casanova-Katny // Polar Biology. – 2011. – Vol. 34, № 11. – P. 1679–1688.

278. Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead / I. Kovalchuk, V. Titov, B. Hohn [et al.] // Mutation. Research. – 2005. – Vol. 570. – P. 149–161.

279. Upson R. Nitrogen form influences the response of *Deschampsia antarctica* to dark septate root endophytes / R. Upson, D.J. Read, K.K. Newsham // Mycorrhiza. – 2009. – Vol. 20, № 1. – P. 1–11.

280. Use of *Deschampsia antarctica* for nest building by the kelp gull in the Argentine Island area (Maritime Antarctica) and its possible role in plant dispersal / I. Parnikoza, I. Dykyy, V. Ivanets [et al.] / Polar Biol. – 2012. – Vol. 35, № 11. – P. 1753–1758.

281. Valverde M. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA–metal interaction? / M. Valverde, C. Trejo, E. Rojas // Mutagenesis. – 2001. – Vol. 16. – P. 265–270.

282. van der Wouw M. Regional genetic diversity patterns in Antarctic hairgrass (*Deschampsia antarctica* Desv.) / M. van der Wouw, P.J. Van Dijk, A.H.L. Huiskes // J. Biogeogr. – 2008. – Vol. 35, № 2. – P. 365–376.

283. Vascular plant success in a warming Antarctic may be due to efficient nitrogen acquisition / P.W. Hill, J. Farrar, P. Roberts [et al.] // Nature Climate Change 1. – 2011. – P. 50–53.

284. Vegetation patterns around penguin rookeries at Admiralty Bay, King George Island, Maritime Antarctic: preliminary results / J. Smykla, J. Wołek, A. Barcikowski [et al.] // Polish Botanical Studies. – 2006. – Vol. 22 – P. 449–459.

285. Vera M.L. Colonization and demographic structure of *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis* along an altitudinal gradient on Livingston Island, South Shetland Islands, Antarctica / M.L. Vera // Polar Research. – 2011. – Vol. 30. – P. 1–10.

286. Wang Z. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from *Gynostemma pentaphyllum* Makino / Z. Wang, D. Luo // Carbohydrate Polymers. – 2007. – Vol. 68, № 1. – P. 54–58.

287. Webby R. Isoswertiajaponin 2''-O-β-arabinopyranoside and other flavone-C-glycosides from the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* / R. Webby, K. Markham // Phytochemistry. – 1994. – Vol. 36, № 5. – P. 1323–1326.

288. Weber M. Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd²⁺ hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri* / M. Weber, A. Trampczynska, S. Clemens // Plant Cell Environ. – 2006. – Vol. 29. – P. 950–963.

289. Web-сайт «ukrmap» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://ukrmap.su/ru-g7/400.html>.

290. Xiong F. Effect of solar ultraviolet-B radiation during 1 springtime ozone 2 depletion on photosynthesis and biomass production of Antarctic vascular 3 plants / F. Xiong, T. Day // Plant Physiology. – 2001. – Vol. 125, № 2. – P. 738–751.

291. Yi H. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba* / H. Yi, Z. Meng // Mutat. Res. – 2003. – Vol. 537. – P.109–114.

ДОДАТКИ

Додаток 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Введення в культуру *in vitro* *Deschampsia antarctica* з двох районів Прибережної Антарктики / **О.М. Загричук**, Н.М. Дробик, І.А. Козерецька, І.Ю. Панікоза, В.А. Кунах // Український антарктичний журнал – 2011/2012. – № 10–11. – С. 289–295.
2. Калюсогенез та регенерація рослин *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) в культурі *in vitro* / **О.М. Загричук**, А.І. Герц, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // Biotechnologia Acta. – 2013. – Vol. 6. – P. 77–85.
3. Цитогенетичний аналіз рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з Прибережної Антарктики / Д.О. Навроцька, М.О. Твардовська, І.О. Андреев, **О.М. Загричук**, І.Ю. Парнікоза, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 184–190.
4. New forms of chromosome polymorphism in *Deschampsia antarctica* Desv. from the argentine islands of the maritime antarctic region / D.O. Navrotska, M.O. Twardovska, I.O. Andreev, I.Yu. Parnikoza, A.A. Betekhtin, **О.М. Zahrychuk**, N.M. Drobyk, R. Hasterok, V.A. Kunakh // Український антарктичний журнал – 2014. – № 13. – С. 185–191.
5. Генетична стабільність отриманих мікроклональним розмноженням рослин *Deschampsia antarctica* Desv. за тривалого культивування *in vitro* / К.В. Спірідонова, І.О. Андреев, **О.М. Загричук**, Д.О. Навроцька, М.О. Твардовська, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // Фізіологія рослин і генетика. – 2016. – Т.48, № 6. – С. 498–507.
6. Підвищена стійкість *Deschampsia antarctica* Desv. до мутагенної дії іонів кадмію / К.В. Спірідонова, І.О. Андреев, **О.М. Загричук**, Н.М. Дробик,

В.А. Кунах // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2016. – Т. 14, № 1. – С. 63–71.

7. **Загричук О.М.** *Deschampsia antarctica* Desv.: характеристика виду, його поширення та особливості адаптації до існування в умовах Антарктики / **О.М. Загричук**, Н.М. Дробик // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. – 2016. – № 1 (65). – С. 135–145.

8. Особливості накопичення кадмію в культивованих *in vitro* рослинах *Deschampsia antarctica* Desv. / **О.М. Загричук**, В.О. Хоменчук, Г.Б. Гуменюк, Н.М. Дробик // XXVIII Всеукраїнська наукова інтернет-конференція «Вітчизняна наука на зламі епох: проблеми та перспективи розвитку». – Переяслав-Хмельницький. – 2016. – С. 9–11.

9. Введення в культуру *in vitro* *Deschampsia antarctica* з двох районів Прибережної Антарктики / **О.М. Загричук**, Н.М. Дробик, І.А. Козерецька І.Ю. Панікоза, В.А. Кунах // Матеріали V Міжнародної Антарктичної конференції Антарктика і глобальні системи Землі: нові виклики та перспективи, 17–19 травня 2011. – Київ, 2011. – С. 209–211.

10. Дослідження впливу йонів кадмію на ріст рослин *Deschampsia antarctica* Desv. *in vitro* / **О.М. Загричук**, Т.В. Гарбуз, В.Б. Чеховська, Н.М. Дробик // Сучасні досягнення екології та їх імплементація у природничу освіту: матеріали науково-методичного семінару, 24 квітня 2014 року. – Тернопіль, 2014. – С. 18.

11. Особенности культивирования *in vitro* *Deschampsia antarctica* Desv. с разных мест произрастания в прибрежной Антарктике / **О.М. Загричук**, Н.М. Дробик, И.Ю. Парникоза, И.А. Козерецкая, В.А. Кунах // Материалы VI Международной научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)», 12 – 17 октября 2014 г.: тезисы докл. – Ялта, 2014. – С. 26–27.

12. Особливості введення в культуру *in vitro* рослин *Deschampsia antarctica* Desv. та вплив різних концентрацій йонів кадмію на їх ріст //

О.М. Загричук, Г.Б. Гуменюк, Т.В. Гарбуз, В.Б. Чеховська, Н.М. Дробик // Концепція сталого розвитку та її реалізація в освіті: матеріали науково-практичної конференції, присвяченої 75-річчю ТНПУ імені Володимира Гнатюка та хіміко-біологічного факультету, 16–18 квітня 2015 р. – Тернопіль, 2015. – С. 36–37.

13. **Загричук О.М.** Оценка влияния ионов Кадмия на рост и развитие растений *Deschampsia antarctica* Desv. *in vitro* / **О.М. Загричук**, И.Ю. Парникоза, Н.М. Дробик // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: VIII съезд общества физиологов растений России (Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых), 21–26 сентября 2015 г.: тезисы докл. – Петрозаводск, 2015. – С. 199.

14. **Загричук О.М.** Особливості прямого та непрямого органогенезу *Deschampsia antarctica* Desv. *in vitro* / **О.М. Загричук**, Д.М. Семенюк, Н. М. Дробик // Тернопільські біологічні читання – Ternopil bioscience – 2017: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 20-річчю заснування наукового фахового видання України «Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія Біологія», 20–22 квітня 2017 р. – Тернопіль, 2017. – С. 250–254.

15. Цито- та молекулярно-генетичні дослідження отриманих мікроклональним розмноженням рослин *Deschampsia antarctica* Desv. за тривалого культивування *in vitro* / К.В. Спірідонова, І.О. Андреев, Д.О. Навроцька, **О.М. Загричук**, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // VIII Міжнародна Антарктична Конференція, присвячена 25-ій річниці приєднання України до Договору про Антарктику (17 вересня 1992 р.), 16–18 травня 2017 р. – Київ, 2017. – С. 98–99.

16. Генотоксичні концентрації кадмію для антарктичного екстремофіла *Deschampsia antarctica* É. Desv. / **О.М. Загричук**, К.В. Спірідонова, І.О. Андреев, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // VIII Міжнародна Антарктична

Конференція, присвячена 25-ій річниці приєднання України до Договору про Антарктику (17 вересня 1992 р.), 16–18 травня 2017 р. – Київ, 2017. – С. 56–58.

Апробація результатів дисертації:

V Міжнародна Антарктична конференція «Антарктика і глобальні системи Землі: нові виклики та перспективи», Київ, 17–19 травня 2011 р. – Секційна доповідь.

Науково-методичний семінар «Сучасні досягнення екології та їх імплементація у природничу освіту», Тернопіль, 24 квітня 2014 р. – Секційна доповідь.

Международная научно-практическая конференция «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)», Ялта, 12–17 октября 2014 г. – Заочна участь.

Всеукраїнська науково-практична конференція «Концепція сталого розвитку та її реалізація в освіті», Тернопіль, 2015 р. – Секційна доповідь.

VIII съезд общества физиологов растений России (Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых), Петрозаводск, 21–26 сентября 2015 г. – Заочна участь.

Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, присвяченій 20-річчю заснування наукового фахового видання України «Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія Біологія», Тернопіль, 20–22 квітня 2017 р. – Секційна доповідь.

VIII Міжнародна Антарктична конференція, присвячена 25-ій річниці приєднання України до Договору про Антарктику (17 вересня 1992 р.). – Київ, 16–18 травня 2017 р. – Секційна доповідь.