

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

ЗАГРИЧУК ОКСАНА МИХАЙЛІВНА

УДК 575.17:574.1:582.923.1+57.088.7

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

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Тернопільському національному педагогічному університеті імені Володимира Гнатюка та Інституті молекулярної біології і генетики НАН України

Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор,
Дробик Надія Михайлівна,
Тернопільський національний педагогічний
університет імені Володимира Гнатюка,
декан хіміко-біологічного факультету

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий
співробітник
Матвєєва Надія Анатоліївна
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
НАН України, завідувач лабораторії адаптаційної
біотехнології

доктор біологічних наук, старший науковий
співробітник
Дубровна Оксана Василівна
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
старший науковий співробітник відділу генетичного
поліпшення рослин

Захист відбудеться «16» листопада 2017 р. об 11-й годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 26.202.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: вул. Академіка Заболотного, 148, м. Київ – 143, Україна, 03143.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148.

Автореферат розісланий «13» жовтня 2017 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради К 26.202.01
кандидат біологічних наук

К.В. Листван

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Антарктида – найхолодніша і важко доступна полярна область Землі. Близько 98 % материка знаходиться під товстим шаром льоду (Convey, 2003; Smith et al., 2003; Convey et al., 2008; Giełwanowska, 2013). Прибережні антарктичні екосистеми функціонують за домінування сильно обмежуючих факторів навколишнього середовища (шквальні вітри, низька температура та вологість повітря, високий рівень сонячної радіації) (Alberdi et al., 2002; Giełwanowska, 2013; Матвеева, 2013).

Щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae)) – один з двох видів судинних рослин, що ростуть на західному узбережжі Антарктичного півострова та прилеглих до нього островах (Komárkova et al., 1990; Parnikoza et al., 2011; Александров и др. 2012; Парникоза и др., 2013). 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 (Moore, 1970; Alberdi, 2002; Кир'яченко, 2005; Giełwanowska, 2013; Ozheredova et al., 2015). 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 (Mosyakin et al., 2007; Van der Putten et al., 2010; Parnikoza et al., 2011; Парникоза и др., 2013).

Вид *D. antarctica* цікавий і тим, що є природним джерелом антиоксидантів (Ververidis et al., 2007), що можуть використовуватися у фармацевтичній промисловості, косметології – у сонцезахисних кремах, у харчовій промисловості – як харчові добавки тощо (Wang, Luo et al., 2007; Bayoumi et al., 2008; Marques, Farah, 2009). Вченими встановлено здатність вторинних метаболітів *D. antarctica*, зокрема сполук фенольної природи, інгібувати проліферацію клітин меланоми (Gidekel et al., 2009; Пороннік та ін., 2014).

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 (Матвеева, 2013). 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 (Андреев та ін., 2011/2012; Матвеева, 2013).

D. antarctica не лише виживає у жорстких кліматичних умовах Антарктики, але й у деяких регіонах розширює свій ареал (Gerighausen et al., 2003; Александров и др., 2012). 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 розмнужених 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: культивування рослинних об'єктів *in vitro*; біометричні, метод атомно-абсорбційної спектроскопії, СТАБ-метод виділення ДНК, ПЛР з різними типами ДНК-праймерів (ISSR, IRAP), електрофорез ДНК в агарозному гелі, методи статистики.

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 ім. В. 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 Загричук 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.

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.

Структура роботи. Дисертація складається з переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, трьох експериментальних розділів, аналізу і узагальнення результатів дослідження, висновків та списку літератури. Її обсяг – 171 сторінка друкованого тексту, враховуючи 27 рисунків та 7 таблиць. Перелік цитованої літератури містить 291 найменування, у т.ч. 188 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У розділі узагальнено інформацію про біологічні та екологічні особливості антарктичного екстремофіла *D. antarctica*. Розглянуто ареал та фактори поширення виду. Описано основні адаптаційні механізми рослин до існування в екстремальних умовах: фізіолого-біохімічні, цито- та молекулярно-генетичні. Особливу увагу приділено актуальності введення в культуру *in vitro* *D. antarctica* як модельного об'єкта для дослідження впливу стресових факторів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вихідним матеріалом для досліджень було насіння *D. antarctica* семи популяцій, 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.

Для отримання асептичних рослин, що використовувалися в експериментах, насіння поверхнево стерилізували і пророщували на безгормональному агаризованому середовищі Мурасіге і Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) у чашках Петрі при освітленні (2500–3000 лк), температурі $+20 - +22^{\circ}\text{C}$ та вологості 70–80 %.

При підборі умов для вегетативного розмноження використовували отримані з насіння асептичні 1,5–2 місячні рослини, які висаджували у живильні середовища МС та Гамборга, Евелейг (В5) (Gamborg, Eveleigh, 1968), доповнені різним концентраціями регуляторів росту: 1-нафтилоцтової кислоти (НОК) або кінетину (Кін). Мікроклонування проводили шляхом відокремлення утворених на дернині пагонів.

Для індукції калюсоутворення використовували пагонові та кореневі експланти, які культивували на агаризованих живильних середовищах: МС, Шенка, Хільдебрандта (ШХ) (Schenk, Hildebrandt, 1972), В5, та МС і В5 з половинним вмістом макро- та мікросолей –МС/2 і В5/2, доповнені різними концентраціями цитокініну 6-бензиламінопурина (БАП) і ауксинів 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) або НОК. У кожному варіанті досліду використовували експланти чотирьох–п'яти рослин. При підборі умов для проліферації калюсоутворення тестували живильні середовища МС, ШХ, В5, МС/2 і В5/2, доповнені різними концентраціями БАП, 2,4-Д або НОК.

Експланти рослин, які використовували для індукції калюсоутворення, та отримані калюсні культури інкубували в темряві при $+20 - +22^{\circ}\text{C}$, субкультивування проводили через кожні 3–4 тижні. При появі ознак регенерації калюсні інокулюми з утвореними органогенними структурами переносили в умови освітлення (2500–3000 лк).

Рослини культивували у живильному середовищі В5, доповненому 0,1 мг/л Кін, рН 5,5, у яке 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. Індекс росту (ІР) сирої та сухої маси рослин визначали через 4–8 тижнів культивування залежно від концентрації Cd^{2+} :
$$IP = \frac{m - m_0}{m_0},$$
 де: m_0 – маса

початкова, мг; m – маса кінцева, мг.

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 (Методические указания, 1992).

ДНК виділяли із матеріалу, висушеного при температурі 37 °C, за використання цетавлону (СТАБ) як описано в (Doyle, Doyle, 1987).

Для виявлення генетичних змін мікроклонально розмножених рослин у процесі тривалого культивування *in vitro* застосовували метод ПЛР-аналізу із використанням 10 ISSR-праймерів. Для вивчення мутагенного впливу йонів Кадмію на культивовані *in vitro* рослини *D. antarctica* використовували один IRAP-та 7 ISSR-праймерів.

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 (Амплісенс, Росія), 1 × (NH₄)₂SO₄ буфер (Fermentas, Литва), 1 мкМ праймера. На реакційну суміш нашаровували 15 мкл мінеральної олії для запобігання випаровуванню. Як негативний контроль використовували стандартну реакційну суміш без ДНК. 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.

Фракціонування продуктів ПЛР електрофорезом проводили в 1,5 % агарозному гелі в 1×SB буфері (5 мМ Na₂B₄O₇, рН 8.5) з наступною візуалізацією в УФ-світлі після забарвлення бромистим етидієм. Як маркер молекулярних мас використовували 100 bp+1.5Kb+3Kb ДНК маркер (Fermentas, Литва). Кожну реакцію проводили у двох повторях, враховували лише чіткі і відтворювані амплікони. Результати представляли у вигляді бінарних матриць, у яких наявність або відсутність у спектрі ампліфікації однакових за розміром фрагментів позначали відповідно як стан "1" або "0". Розрахунок генетичних відстаней за Жакардом проводили з використанням програми FAMD 1.3 (Schluter, Harris, 2006).

Для цитогенетичного аналізу використовували корінці культивованих *in vitro* рослин довжиною 1–1,5 см. Для накопичення та синхронізації мітозів, перед фіксацією зразки витримували в крижаній воді впродовж 24 годин. 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.

Результати біотехнологічних, фізіолого-біохімічних та цитогенетичних досліджень опрацьовували статистично (Лакин, 1980).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ КУЛЬТИВУВАННЯ *D. ANTARCTICA IN VITRO*

Індукція проростання насіння. У результаті проведених досліджень вивчено сезонну періодичність проростання насіння, його схожість та залежність цих процесів від різних чинників. Поряд із виявленими відмінностями, для рослин усіх популяцій встановлено спільні ознаки: доцільність використання як стерилента перексиду гідрогену (ефективність стерилізації складала 98–100 %); порушення спокою насіння стратифікацією (низькими позитивними температурами +2–+4°C) та обробкою гібереловою кислотою (ГК₃); проростання насіння на світлі. Нами встановлено, що насіння фрагментарно проростало впродовж усього року (за винятком травня), найбільш сприятливим для схожості виявився саме осінньо-зимовий період (період астрального літа в Антарктиці) (рис. 1). Насіння зберігає схожість навіть після 5–6-ти років з часу збору.

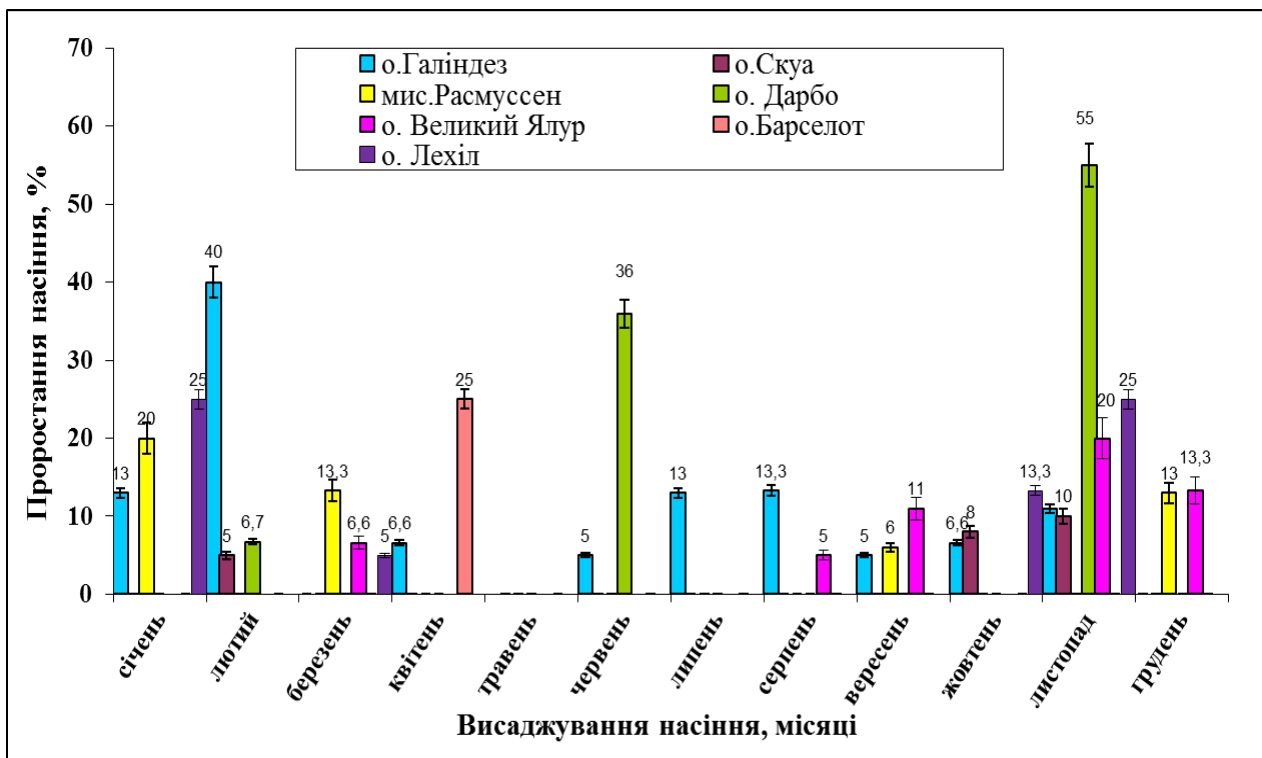


Рис. 1. Річна динаміка проростання насіння *D. antarctica in vitro* з різних локалітетів Прибережної Антарктики

Мікроклональне розмноження. З'ясовано, що оптимальним для мікроклонування було середовище В5, доповнене 0,1–0,2 мг/л Кін або 0,1 мг/л НОК. Через 3–4 місяці з часу висаджування фрагментів дернини (2–3 пагони) на це середовище рослини формували дернину з 12–15 пагонів висотою 8,5–10 см та розгалуженою кореневою системою; через 5–6 місяців висота пагонів досягала 14–16 см (рис. 2). Ефективність вкорінення сформованих пагонів була найвищою (до 95 %) у живильному середовищі В5 з 0,2 мг/л Кін. Мікроклонування проводили шляхом відокремлення утворених на дернині пагонів.

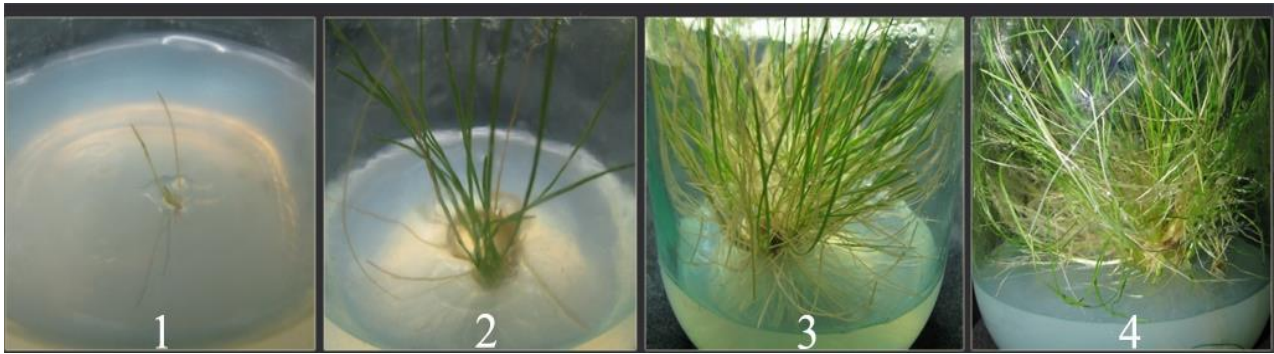


Рис. 2. Динаміка росту рослини *D. antarctica* в умовах *in vitro* у живильному середовищі B5 з 0,2 мг/л Кін: 1 – двотижнева рослина; 2 – 1,5-місячна рослина; 3 – 3–4 місячна рослина; 4 – 6-місячна рослина. Масштаб – 1 : 2,5

Індукція та проліферація калюсу. Нами підібрано умови для індукції, проліферації калюсу та отримано тривало вирощувану культуру тканин із експлантів рослин шести локалітетів. Процес формування калюсу відбувався з корневих і пагонових експлантів на живильних середовищах МС, МС/2, B5, B5/2 та ШХ, доповнених комбінаціями різних концентрацій ауксинів (2,4-Д або НОК) та цитокініну (БАП) (рис. 3). Інтенсивність калюсогенезу залежала від мінерального складу живильного середовища, співвідношення і концентрації регуляторів росту, місця зростання рослини-донора та типу експланта.

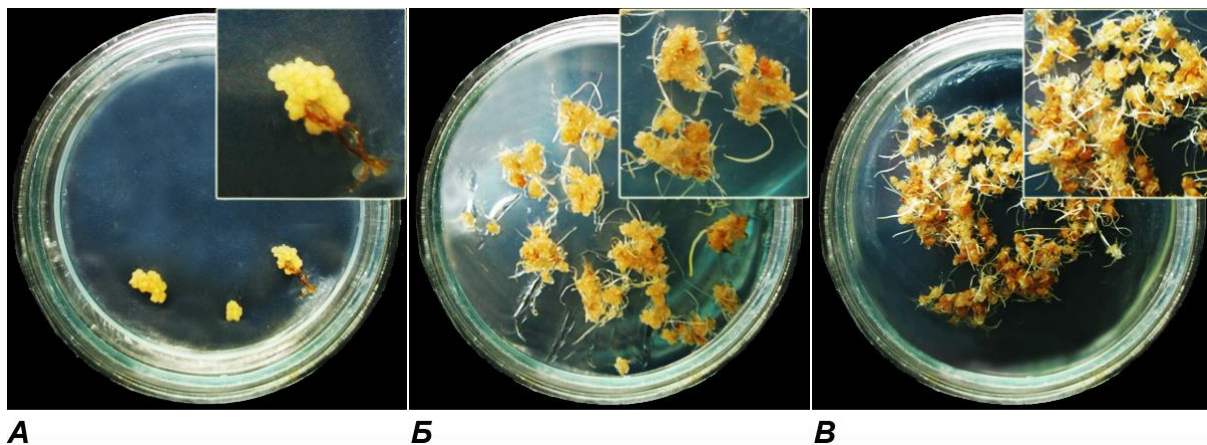


Рис. 3. Утворення та ріст калюсу з корневих експлантів рослин *D. antarctica* (о. Галіндез): А – калюсогенез через 7–10 діб (середовище B5 з 1 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП); ріст калюсу на 13–14-ту (Б) та 24–25-ту(В) добу (B5 з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП). Масштаб – 1 : 2,3

Встановлено, що найбільшою підтримуючою здатністю для калюсогенезу з корневих та пагонових експлантів характеризувалося середовище B5, доповнене 0,9–1 мг/л 2,4-Д і 0,09–0,1 мг/л БАП. Калюсогенна активність із корневих експлантів перевищувала таку з пагонових у 1,5–2 рази. Серед протестованих рослин з різних місць зростання найбільш ефективно калюсоутворення відбувалося на експлантах рослин з о. Галіндез та о. Великий Ялур.

Регенерація рослин. При проведенні досліджень, спрямованих на індукцію калюсоутворення, виявлено, що з утвореного калюсу пагонового та

кореневого походження від рослин з островів Дарбо, Галіндез, Скуа, Великий Ялур, Лехіл та мису Расмуссен, відбувалася спонтанна регенерація пагонів (рис. 4). Органогенез відбувався не лише одразу після індукції калюсної тканини, але й при тривалому її культивуванні. 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 на 30–40 % вищою порівняно з іншими зразками. У результаті одержані нами пагони вкорінено та підібрано умови для росту рослин-регенерантів. Виявлено на порядок більший приріст біомаси регенерованих з калюсу рослин *D. antarctica*, порівняно з рослинами, отриманими шляхом пророщування насіння в умовах *in vitro*.

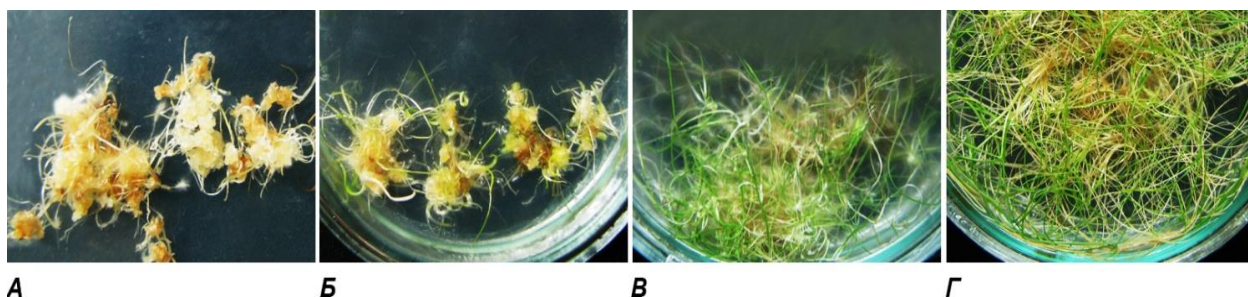


Рис. 4. Спонтанна регенерація пагонів із калюсу кореневого походження від рослин *D. antarctica* (о. Дарбо) на середовищі В5, доповненому 1,0 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л БАП: А – початок регенерації пагонів із калюсу (через 7–8 діб з часу індукції калюсоутворення); Б – ріст регенерантів в умовах освітлення (4–5 тижнів); В – формування рослин-регенерантів (6–8 тижнів); Г – розростання рослин-регенерантів. Масштаб – 1 : 2,3

ГЕНЕТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ОТРИМАНИХ МІКРОКЛОНАЛЬНИМ РОЗМНОЖЕННЯМ РОСЛИН *D. ANTARCTICA*

З метою з'ясування можливості використання розробленої методики мікроклонування для отримання генетично однорідного рослинного матеріалу *D. antarctica* нами досліджено генетичну мінливість мікроклонально розмножених рослин цього виду із використанням ПЛР-аналізу та цитогенетичного аналізу. Вивчено клональне потомство 5 отриманих із насіння рослин, які походили з островів Дарбо (генотипи DAR12, DAR15), Галіндез (генотип G/D12-2а, G/D 20) та Скуа (генотип S7). Для первинної характеристики використаного для досліджень рослинного матеріалу було проведено молекулярно-генетичний та цитогенетичний аналіз вихідних рослин *D. antarctica*, отриманих із насіння. Загалом для цих зразків було враховано 106 ампліконів, 39 (35 %) з яких були поліморфними. Встановлено, що рослини відрізняються між собою за спектрами ПЛР-продуктів (рис. 5). Значення попарних генетичних відстаней Жакарда між різними генотипами знаходилися в межах 0,145–0,277.

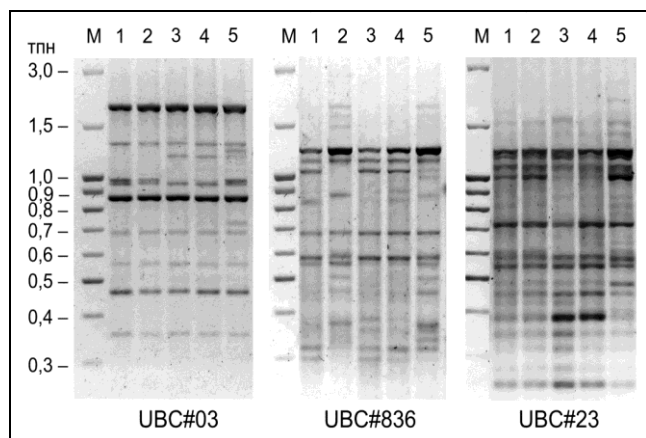


Рис. 5. Електрофоретичні спектри ПЛР-продуктів, які демонструють відмінності між дослідженими рослинами *D. antarctica*: 1, 2 – генотипи G/D 20 і G/D12-2a (о. Галіндез); 3, 4 – генотипи, DAR15 та DAR12 (о. Дарбо), відповідно; 5 – генотип S7 (о. Скуа), М – маркер молекулярної маси ДНК

Цитогенетичний аналіз використаних у роботі рослин показав, що обидва зразки з о. Галіндез (генотипи G/D12-2a та G/D 20) мають типовий для цієї рослини диплоїдний набір хромосом $2n = 26$. Водночас, в однієї із рослин з о. Дарбо (генотип DAR12) у кореневій меристемі, поряд із клітинами з типовим набором хромосом, знайдено клітини, які мали додаткові В-хромосоми, з числом хромосом $2n = 26+1(2)B$ (рис. 6).

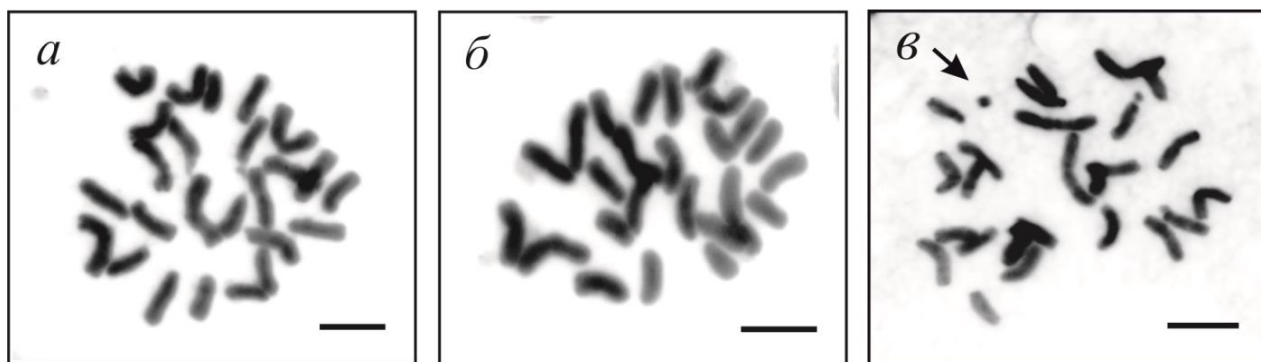


Рис 6. Метафазні пластинки клітин апікальної меристеми кореня рослин *D. antarctica*: а – генотип G/D12-2a (о. Галіндез) – типовий набір хромосом ($2n=26$); б, в – генотип DAR12 (о. Дарбо): (б) – типовий набір хромосом ($2n=26$), (в) – набір з додатковою В-хромосомою ($2n=26+1B$). Стрілкою вказано В-хромосому. Масштаб – 10 мкм

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) також показав збереження цитогенетичних характеристик рослин.

Отже, 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.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЙОНІВ КАДМІЮ НА РОСЛИНИ *D. ANTARCTICA IN VITRO*.

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. Останнім часом увагу дослідників привертає здатність рослин Антарктики, зокрема *D. antarctica*, зростати в умовах доволі високих концентрацій важких металів (ВМ). Виходячи з цього, у роботі ми досліджували вплив різних концентрацій йонів кадмію, на ріст і розвиток культивованих *in vitro* рослин *D. antarctica* та з'ясовували особливості його накопичення у рослинах цього виду.

Вплив йонів Кадмію на ріст рослин. У результаті дослідження впливу йонів Кадмію (0,1–20 мМ) на *D. antarctica* виявлено, що концентрації 1,5–20 мМ призводять до зупинки росту та наступної загибелі рослин. Про це свідчили морфологічні зміни у дослідних рослинах (пагони мали світліше, порівняно з контролем, забарвлення, частина з них була згорнута в трубочку, ріст рослин не відбувався; молоді пагони та корені не формувалися), які проявлялася вже через 7 діб культивування. При вирощуванні *D. antarctica* у живильному середовищі з концентраціями Cd^{2+} 1,5–20 мМ упродовж 3–4 тижнів відбувалося зменшення біомаси рослин від 20 % до 70 % (рис. 7). За присутності у живильному середовищі 5–20 мМ Cd^{2+} рослини гинули через 3 тижні, 1,5–5 мМ Cd^{2+} – через 4–6 тижнів культивування.

Встановлено, що *D. antarctica* зберігає здатність виживати за умови, коли концентрація Cd^{2+} у живильному середовищі не перевищує 1 мМ. Адаптація рослин до росту в присутності ВМ у концентраціях 0,1 мМ–1 мМ відбувається впродовж 3–4 тижнів (приріст сирої та сухої біомаси дослідних рослин становив ≈ 10 –25 %). Упродовж наступних 4 тижнів приріст сирої та сухої біомаси збільшився на 25–75 %. За морфологічними ознаками рослини, які культивували на середовищі з металом упродовж восьми тижнів, не відрізнялися від контрольних.

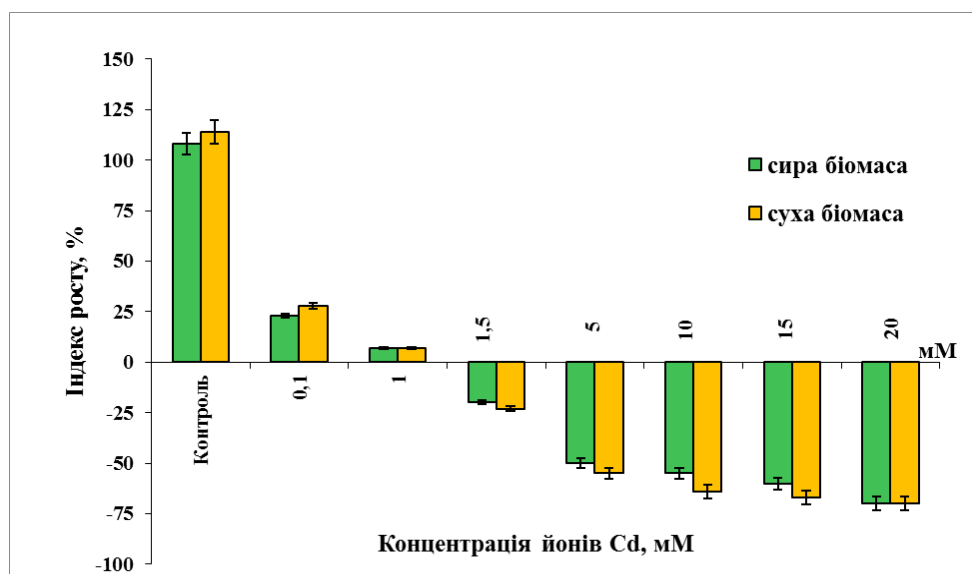


Рис. 7. Індекс росту сирої та сухої біомаси *D. antarctica* за культивування впродовж 4 тижнів у живильному середовищі з різними концентраціями Cd^{2+}

Накопичення кадмію у рослинах з різних локалітетів. Вивчено накопичення йонів Кадмію в рослинах *D. antarctica* з островів Галіндез (G/D12-2a) та Великий Ялур (Y66), культивованих *in vitro* в присутності різних концентрацій токсиканта (0,2 мМ, 0,5 мМ та 1 мМ) упродовж 7, 14, 21, 28 та 35 діб. Суттєвих відмінностей щодо його акумулювання рослинами з цих локалітетів не виявлено. Основна кількість Cd^{2+} за різних концентрацій у живильному середовищі накопичується рослинами впродовж перших семи діб культивування (рис. 8). 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.

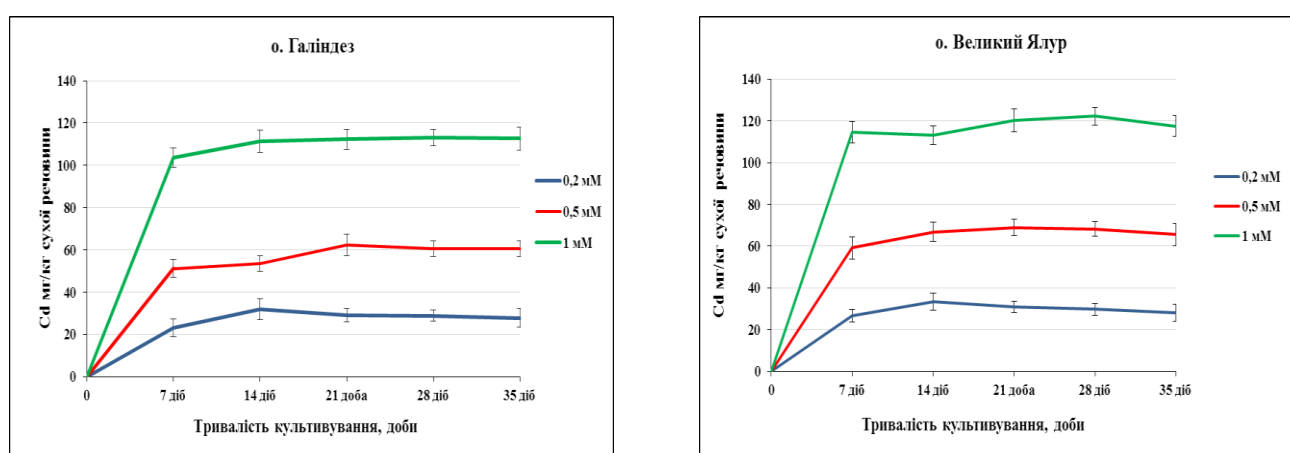


Рис. 8. Динаміка накопичення кадмію (мг/кг сухої речовини) у рослинах *D. antarctica* з о. Галіндез (G/D12-2a) та о. Великий Ялур (Y66) упродовж 35 діб культивування за присутності у живильному середовищі 0,2 мМ, 0,5 мМ та 1 мМ Cd^{2+}

Мутагенна дія йонів Кадмію на отримані мікроклональним розмноженням рослини. Для аналізу мутагенного впливу йонів Кадмію на *D. antarctica* використовували генетично ідентичні рослини (генотип G/D12-2a), отримані мікроклональним розмноженням. Для дослідження було обрано концентрації Cd^{2+} у живильному 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. 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.

У першому варіанті дослідів, *D. antarctica* вирощували за широкого спектру концентрацій Cd^{2+} (0,1–10 мМ) упродовж 63 діб. Встановлено, що у рослин, культивованих при 0,1 або 0,2 мМ Cd^{2+} , у порівнянні з контрольними, 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+} у концентраціях вище 1 мМ, спостерігали

зменшення інтенсивності спектру ПЛР-продуктів із втратою фрагментів переважно у зоні 700–2000 п.н. (рис. 9).

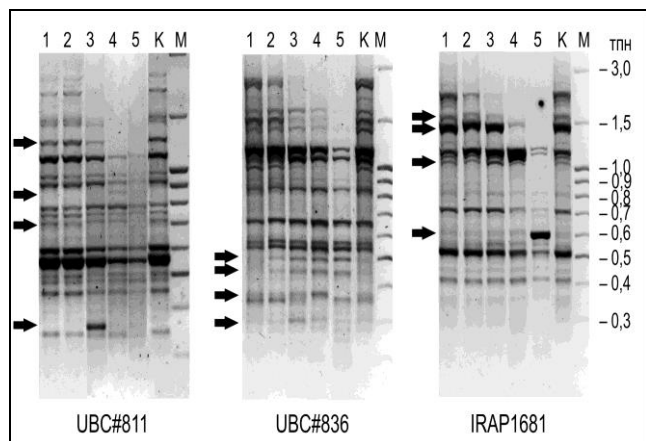


Рис. 9. Електрофоретичні спектри ПЛР-продуктів рослин *D. antarctica*, культивованих у присутності Cd^{2+} упродовж 63 діб: 1 – 0,1 мМ, 2 – 0,2 мМ, 3 – 1 мМ, 4 – 1,5 мМ, 5 – 2 мМ, К – контрольні рослини, М – маркер молекулярної маси ДНК. Стрілками позначено перебудовані фрагменти

У другому варіанті дослідження для вивчення гострої дії важкого металу на генетичний апарат *D. antarctica*, рослини культивували 17 діб у присутності йонів Кадмію від 0,2 до 1 мМ, після чого переносили на середовище без ВМ і продовжували культивувати ще впродовж 17-ти діб. Зміни в спектрах були виявлені лише за вмісту Cd^{2+} вище 0,4 мМ. Вони проявлялися у вигляді зміни копійності фрагментів та у появі нових (додаткових) фрагментів (рис. 10). Значення генетичних дистанцій між рослинами зростали із збільшенням концентрації йонів Кадмію в живильному середовищі від 3,5 до 11,4 %.

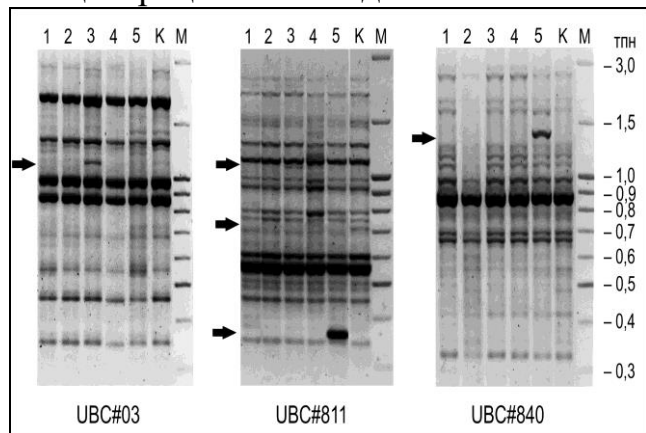


Рис. 10. Електрофоретичні спектри ПЛР-продуктів рослин *D. antarctica*, культивованих у присутності Cd^{2+} упродовж 17 діб: 1 – 0,2 мМ, 2 – 0,4 мМ, 3 – 0,6 мМ, 4 – 0,8 мМ, 5 – 1 мМ, К – контрольні рослини, М – маркер молекулярної маси ДНК. Стрілками позначено перебудовані фрагменти

Третій варіант дослідження був спрямований на вивчення хронічної дії йонів Кадмію на геном *D. antarctica*. Дослід передбачав тривале культивування рослин (96–265 діб) за порівняно невисоких концентрацій (0,1 мМ та 0,4 мМ) кадмію. Тривалість культивування з 0,1 мМ становила 265 діб; у варіанті з наступним вирощуванням у контрольному середовищі рослини піддавали впливу 0,1 мМ Cd^{2+} 165 діб і ще 100 діб культивували без ВМ. При концентрації 0,4 мМ тривалість культивування у середовищі з Cd^{2+} складала 140 діб, а у варіанті із дорощуванням у контрольних умовах – 96 діб за присутності йонів Кадмію і 44 доби – на контрольному середовищі. ПЛР-аналіз ДНК цих рослин, не виявив відмінностей від контрольних рослин. Встановлено, що у рослин, які після культивування на середовищі з кадмієм, упродовж

тривалого часу росли у живильному середовищі без важкого металу, також не виявлено відмінностей від контрольних рослин.

Отже, отримані нами результати свідчать про стійкість *D. antarctica* до йонів Кадмію, порівняно із іншими вищими судинними рослинами. Пригнічення росту відбувається за концентрацій Cd^{2+} від 0,1 мМ і вище, а припинення росту та загибель рослин – за концентрацій вище 1 мМ. Суттєвих відмінностей щодо акумулювання Cd^{2+} рослинами з різних локалітетів не виявлено. За впливу різних концентрацій йонів металу основна його кількість накопичується впродовж перших семи діб культивування. Мутагенний вплив на *D. antarctica* проявлявся при концентраціях Cd^{2+} вище 0,4 мМ. За тривалого вирощування рослини (упродовж 3–8 місяців) у присутності 0,1–0,4 мМ йонів Кадмію генетичних змін не виявлено.

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 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 в процесі тривалого культивування *in vitro*. 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 мМ–20 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 мМ. За тривалого вирощування рослини (упродовж 3–8 місяців) у присутності 0,1–0,4 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 НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ 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. Парнікоза, В.А. Кунах // Український антарктичний журнал – 2011/2012. – № 10–11. – С. 289–295. (Здобувачем виконано експеримент із введення в

культуру *in vitro* *D. antarctica*, проведено статистичну обробку експериментальних даних, взято участь у обговоренні та аналізі отриманих результатів, написано основну частину статті).

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. (Здобувачем розроблено спосіб вирощування калюсної тканини та рослин-регенерантів *D. antarctica*, здійснено експериментальні дослідження, статистичну обробку результатів і написання основної частини статті).

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. (Здобувачем спільно із співавторами проведено планування експерименту, підготовку експериментальних зразків, взято участь в аналізі отриманих результатів і написанні статті).

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. (Здобувачем підготовлено експериментальні зразки, взято участь у плануванні експериментальних досліджень, обговоренні отриманих результатів та написанні статті).

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. (Здобувачем взято участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, в опрацюванні, обговоренні результатів експерименту та написанні статті).

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. (Здобувачем взято участь у плануванні експерименту, підготовлено зразки рослин, проведено частину експериментальних досліджень, обговорено та проаналізовано отримані результати, написано частину статті).

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. (Здобувачем проведено пошук, опрацювання та критичний аналіз літературних джерел, написано основну частину статті).

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. – Режим доступу до журн.:

<http://confscience.webnode.ru> (Здобувачем проведено основну частину експериментальних досліджень, статистичну обробку результатів, порівняльний аналіз власних результатів та результатів досліджень інших авторів, написання основної частини статті).

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.: тези. – 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» – наукометрична база даних Index Copernicus, 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. / 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.

АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2017.

Розроблено та науково обґрунтовано технологію культивування антарктичного виду *Deschampsia antarctica* Desv *in vitro* на основі комплексних фізіолого-генетичних досліджень.

Відпрацьовано умови проростання насіння, мікроклонального розмноження *D. antarctica* та отримано життєздатні, морфологічно нормальні рослини. Підібрано умови індукції калюсоутворення з різних типів експлантів. Виявлено здатність до спонтанного непрямого органогенезу; отримані пагони вкорінено та підібрано умови для росту рослин-регенерантів. Встановлено на порядок більшу інтенсивність росту регенерованих з калюсу рослин, порівняно з рослинами, одержаними з насіння. З використанням ISSR-аналізу та цитогенетичного аналізу показано збереження генетичних характеристик у клонального потомства *D. antarctica* у процесі тривалого культивування *in vitro*. Виявлено підвищену, порівняно з іншими судинними рослинами, стійкість *D. antarctica* до йонів Кадмію. Суттєвих відмінностей щодо накопичення йонів Кадмію у рослинах з різних локалітетів (о. Галіндез і о. Великий Ялур) не виявлено. Із застосуванням ПЛР-аналізу з ISSR- та IRAP-праймерами виявлено мутагенний вплив кадмію на культивовані *in vitro* рослини *D. antarctica* за концентрацій вище 0,4 мМ. За тривалого вирощування рослин при низькому вмісті (упродовж 3–8 місяців) у присутності 0,1–0,4 мМ йонів Кадмію генетичних змін не знайдено. Запропоновано використання розробленої модельної системи культивування *D. antarctica in vitro* для вивчення впливу різних стресових чинників.

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.

АННОТАЦИЯ

Загричук А.Н. Получение культуры *in vitro* *Deschampsia antarctica* Desv. и ее физиолого-генетическое изучение. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 2017.

Разработана и научно обоснована технология культивирования антарктического вида *Deschampsia antarctica* Desv *in vitro* на основании комплексных физиолого-генетических исследований.

Разработаны условия произрастания семян, микроклонального размножения *D. antarctica* и получены жизнеспособные, морфологически нормальные растения. Подобраны условия индукции каллусообразования с различных типов эксплантов. Обнаружена способность к спонтанному непрямоу органогенезу; полученные побеги укоренены и подобраны условия для роста растений–регенерантов. Установлена на порядок выше интенсивность роста регенерированных с каллуса растений по сравнению с полученными из семян растениями. С использованием ISSR-анализа и цитогенетического анализа показано сохранение генетических характеристик в клонального потомства *D. antarctica* в процессе длительного культивирования *in vitro*. Обнаружена повышенная, по сравнению с другими сосудистыми растениями, устойчивость *D. antarctica* к кадмию. Существенных отличий накопления ионов Кадмия в растениях с разных локалитетов (о. Галиндез и о. Большой Ялур) не обнаружено. С применением ПЦР-анализа с ISSR- и IRAP-праймерами выявлено мутагенное воздействие кадмия на культивируемые *in vitro* растения *D. antarctica* при концентрациях выше 0,4 мМ. При длительном выращивании (в течение 3–8 месяцев) при низких концентрациях ионов Кадмия (0,1–0,4 мМ) генетических изменений в растениях *D. antarctica* не обнаружено. Предложено использование разработанной модельной системы культивирования *D. antarctica in vitro* для изучения влияния различных стрессовых факторов.

Ключевые слова: *Deschampsia antarctica* Desv., культивирование *in vitro*, микроклональное размножения, каллусные культуры, регенерация *in vitro*, цитогенетический анализ, ПЦР-анализ, геномная изменчивость, ионы Кадмия, накопление, мутагенный эффект.

ANNOTATION

Zahrychuk O.M. Production and Physiogenetic Study of *in vitro* *Deschampsia antarctica* Desv. Culture – 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.

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.

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. 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*, 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.

On the whole, our findings indicate that newly-developed methods 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^{2+} (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. 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. Cd²⁺ 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 Cd²⁺ 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* plants 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 CdCl₂ concentration, changes in PCR-products' specters were observed at the toxicant concentration above 0.4 mM. 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.

Thus, on the basis of our research we have developed efficient techniques of *D. antarctica* cultivation *in vitro*: 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*. 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.

Підписано до друку 11.10.2017 р.
Формат 60х84/16.
Папір друк. Друк офсетний.
Ум. друк. арк. 0,9. Обл.-вид. арк. 0,9.
Наклад 100 прим. Зам. № 10/17/2-45

Віддруковано у видавничому центрі "Вектор"
46018, м. Тернопіль, вул. Львівська, 12,
Тел. 8 (0352) 40-08-12

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи
до державного реєстру видавців, виготівників
і розповсюджувачів видавничої продукції
серія ТР № 46 від 07 березня 2013р.
ФОП Осадца Ю.В.