

УДК 581.143.6:57.086.833

КАЛЮСОУТВОРЕННЯ ТА ОРГАНОГЕНЕЗ *IN VITRO* *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* E. DESV.

І. І. КОНВАЛЮК, Л. П. МОЖИЛЕВСЬКА, В. А. КУНАХ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150
e-mail: konvalyuk.i.i.@gmail.com

Мета. Підібрати умови отримання та проліферації культури тканин *Deschampsia antarctica* E. Desv. з різних локалітетів Морської Антарктики. **Методи.** Метод культури тканин та органів. **Результати.** Оптимальними для індукції калюсних тканин з різних типів експлантів були середовища: В5 доповнене 2 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП, В5 доповнене 10 мг/л 2,4-Д + 0,2 мг/л БАП та МС, доповнене 5 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л Кін. Найбільшою здатністю підтримувати ріст калюсних тканин в пасивованій культурі характеризувалися середовища із зменшенням вмістом ауксинів та цитокінінів порівняно з середовищами для індукції калюсоутворення: В5 +2 мг/л 2,4-Д + 0,1 БАП мг/л та МС +1 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л Кін. Тканини з ділянок точки росту пагона та з листових експлантів генотипів DAR12 та G/D12-2a на середовищах В5 з 2 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП та В5 з 10 мг/л 2,4-Д + 0,2 мг/л БАП характеризувались здатністю до спонтанного органогенезу та формували окремі пагони. **Висновки.** Розроблено умови для ініціації та проліферації калюсу з кореневих, листових, експлантів та точки росту пагона *D. antarctica*. Інтенсивність калюсоутворення залежала від мінерального складу живильного середовища, співвідношення і концентрації регуляторів росту, типу експланта, вихідного генотипу рослини-донора. Внаслідок спонтанного органогенезу отримано рослини-регенеранти, підібрано умови їх вкорінення *in vitro*. Запропоновані способи індукції та проліферації культури тканин *D. antarctica* в умовах *in vitro*, можуть бути використані для одержання достатньої кількості потрібного для різнопланових досліджень рослинного матеріалу.

Ключові слова. *Deschampsia antarctica* E. Desv., культура тканин, органогенез *in vitro*, ефективність калюсоутворення.

Вступ. Щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* E. Desv.) — злакова рослина-абориген, екстремофіл, який пристосувався до існування в умовах Антарктики. 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 (Parnikoza et al., 2011) робить цей вид унікальним об'єктом для вивчення механізмів, що відповідають за пристосування рослинного організму до жорсткого клімату.

Зважаючи на складність збору достатньої кількості рослинного матеріалу та несприятливість умов для проведення експериментальних досліджень, доцільним є введення *D. antarctica* в культуру *in vitro* для вивчення виду без нанесення шкоди природним екосистемам та порушення домовленостей, прописаних в Протоколі про охорону навколишнього середовища до Договору про Антарктику (http://www.ats.aq/r/ep_faflo.htm). Культура рослинних тканин є експериментальною моделлю для вивчення клітинного поділу, диференціації, морфогенезу та стрес-опосередкованої мінливості геному рослин (Кунах, 2005). Крім того, вирощування культури тканин щучника антарктичного дозволить отримувати у потрібній кількості біомасу рідкісних рослин, що зростають в екстремальних умовах.

Цю сировину в майбутньому можна буде вивчати біохімічно та в модельних дослідах на предмет її використання як можливого джерела біологічно активних речовин, перспективних для застосування як лікувальних, так і профілактичних засобів у медицині. Наприклад, відомо, що *D. antarctica* здатна у жорстких кліматичних умовах Антарктики продукувати високий вміст вторинних сполук, зокрема фенольних кислот та їх похідних і флавоноїдів (Ruhland et al., 2005; Пороннік та ін., 2014). Встановлено здатність вторинних метаболітів *D. antarctica*, зокрема сполук фенольної природи, інгібувати проліферацію клітин меланоми (Gidekel et al., 2010).

У літературі є небагато повідомлень, що стосуються культивування та дослідження *D. antarctica in vitro*. Зокрема, Суба із співавторами (2004) відпрацювали швидкий і зручний спосіб розмноження *D. antarctica* з використанням культури тканин *in vitro*. Загричук та ін. створено колекцію асептичних рослин *D. antarctica in vitro*, а також отримано культуру тканин генотипів з двох місць зростання Прибережної Антарктики (Загричук та ін., 2011).

Зважаючи на те, що розробка біотехнологічних підходів дасть можливість незалежно від сезону у контрольованих лабораторних умовах моделювати дію різних абіотичних стресових чинників і визначати їх вплив на фізіологічні, біохімічні та генетичні параметри, є актуальним введення щучника антарктичного у культуру *in vitro*.

Метою роботи було підібрати умови індукції та проліферації культури тканин *D. antarctica* з різних локалітетів Морської Антарктики.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом були рослини-донори експлантів *D. antarctica*, вирощені *in vitro* з насіння, зібраного з п'яти точок в регіоні Аргентинських островів (поблизу місця розташування Української антарктичної станції «Академік Вернадський»). Вихідні рослини раніше вивчені нами на цитогенетичному рівні. Це були диплоїди ($2n = 26$) з мису Расмусен (R35), острова Галіндез (G/D12-2a), о. Скуа (S22), диплоїд з додатковими 1-3 В-хромосомами ($2n = 26 + 1-3B$) з о. Дарбо (DAR12) та триплоїд з перебудованим каріотипом ($2n = 36 - 39$) з о. Великий Ялур (Y66) (Navrotska et al., 2014; Amosova et al., 2015)

Для індукції калюсоутворення використовували експланти завдовжки 5–8 мм ділянок коренів, листків та точки росту пагона, які інкубували в темряві при 16–20 °С.

Експланти висаджували на наступні живильні середовища: Мурасіге-Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962), Гамборга-Евелей (В5) (Gambourg, Eveleigh, 1968) та 5С (Кунах, Можилевська, 1997) з різними концентраціями фітогормонів — бензиламінопурину (БАП), кінетину (Кін), α -нафтилооцтової (НОК) та 2,4-дихлорфеноксоцтової (2,4-Д) кислот: середовище № 1 — В5 + 2 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП; № 2 — В5 + 10 мг/л 2,4-Д + 0,2 мг/л БАП; № 3 — МС + 5 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л Кін; № 4 — 5С + 2 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП; № 5 — 5С + 2 мг/л 2,4-Д + 2 мг/л НОК + 1 мг/л Кін. На кожен варіант середовища висаджували не менше 30 експлантів кожного генотипу. Ефективність калюсогенезу визначали через п'ять тижнів культивування за відношенням кількості експлантів з калюсом до їхньої загальної кількості.

При підборі оптимальних умов для проліферації культури тканин тестували живильні середовища В5 та МС з різними комбінаціями ауксинів і цитокінінів — БАП і 2,4-Д.

При появі ознак регенерації, калюсні інокулюми з утвореними органогенними структурами переносили в умови освітлення (2000–2500 лк). З метою отримання рослин-регенерантів зачатки пагонів переносили на середовище В5, доповнене 0,1 мг/л НОК.

Результати досліджень опрацьовували статистично (Лакин, 1980).

Результати та обговорення

Отримано калюси з кореневих, листкових експлантів та точки росту пагона, для генотипів *D. antarctica* з 5 локалітетів у регіоні Аргентинських островів Морської Антарктики.

Оптимальними для індукції калюсних тканин з різних типів експлантів були середовища В5 та МС (варіанти № 1, 2, 3) (табл.).

Відсоток калюсогенезу у деяких випадках досягав 100 %, калюс характеризувався пухкою консистенцією та світло-жовтим забарвленням. Слід зазначити, що при висадженні *D. antarctica* на середовище 5С експланти ослизнювались та темніли, відбувалось зараження. Індукція культури тканин з кореневих експлантів відбулась у двох випадках: DAR12 — 7,1 %, S22 — 6,7 % (середовище № 5 — 5С + 2 мг/л 2,4-Д + 2 мг/л НОК + 1 мг/л Кін). З листкових експлантів гено-

типу G/D 12-2a в 1 випадку утворився калюс (12,5 %) на середовищі № 4 — 5С + 2 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л БАП.

Окрім мінерального складу середовища, вплив на ефективність калюсоутворення мали співвідношення і концентрація регуляторів росту. Зокрема, середовище В5 із в 5 разів збільшеною концентрацією БАП та у 2 рази НОК, порівняно з варіантом №1, сприяло ефективності калюсоутворення з точки росту пагону Y66 100 %, у G/D12-2a 66,7 % відповідно, тоді як на інших варіантах середовищ утворення культури тканин з цих експлантів не відбувалась взагалі. З іншого боку, у випадку DAR12 із збільшенням концентрації цих самих фітогормонів, ефективність калюсоутворення зменшилась у 2,9 рази (від 71,4 до 25 %).

Основною особливістю середовищ для індукції і подальшого культивування калюсів у злаків, в тому числі *D. antarctica*, є високий вміст ауксинів, найчастіше 2,4-Д — до 10 мг/л. Наприклад, при тестуванні концентрацій 2,4-Д на середовищі МС з метою отримання та проліферації культури тканин різних сортів пшениці (*Triticum aestivum*) виявили, що найбільш ефективною концентрацією цього ауксину була 2,5–6 мг/л (Sarker and Biswas, 2002; Saja, 2018). Окрім того, показано, що незначні концентрації кінетину (0,1–0,5 мг/л) у поєднанні з 2,4-Д здатні позитивно впливати на утворення калюсу (Rashid et al., 2009; Saja, 2018).

У дослідженнях Cuba та ін. (2004) встановлено, що живильне середовище МС, доповнене різними комбінаціями регуляторів росту 2,4-Д і БАП, забезпечувало калюсоутворення з кореневих і стеблових експлантів *D. antarctica*. Найвищий відсоток калюсоутворення (100 %) спостерігали при додаванні лише 2,2 мкМ 2,4-Д або 2,2 мкМ 2,4-Д у поєднанні з 0,2 мкМ БАП. Із збільшенням концентрацій фітогормонів 2,4-Д від 2,2 до 9 мкМ та БАП від 0,2 до 4 мкМ ефективність калюсоутворення зменшувалась від 100 % до 58 % (Cuba et al., 2004). Загричук та ін. (2013) з метою індукції калюсу з кореневих і пагонових експлантів *D. antarctica* підібрано живильне середовище В5, доповнене 0,9–1 мг/л 2,4-Д і 0,09–0,1 мг/л БАП (Загричук та ін., 2013).

Ми виявили залежність ефективності калюсоутворення від типу експланту *D. antarctica*. Найбільша калюсогенна активність була у точок росту пагонів (наприклад, 100 % у триплоїда Y66). Калюс утворився на варіантах середовища В5 у всіх генотипів, окрім диплоїда S22 (МС),

його ефективність коливалася в межах 25–100 %.

Найвищий відсоток калюсоутворення з кореневих експлантів був у генотипа DAR12 з В-хромосомами (23,1 % та 20 % на середовищі № 3 та № 1 відповідно). Слід зазначити, що у G/D12-2a та Y66 формування калюсу з кореневих експлантів відбувалося лише на середовищі В5 з різними концентраціями 2,4-Д та БАП, у S22 — на середовищі № 3 і 5, у R35 на середовищах № 1, 2, 3, у DAR12 — на всіх варіантах, окрім № 4.

Найвищий показник ефективності калюсоутворення з листових експлантів спостерігали у S22 (37 %) та у Y66 (25 %) на середовищі № 1. У DAR12 формувался калюс з листових експлантів лише на середовищі МС (№ 3), а у випадку G/D12-2a — на № 3 і № 4.

Загалом, калюсогенна активність із точок росту пагона перевищувала таку з кореневих та стеблових експлантів у 2,1–4,3 рази. Поряд з цим, з літературних даних відомо, що калюсогенна активність із кореневих експлантів *D. antarctica* у 1,5–2 рази перевищувала таку з пагонових (Загричук та ін., 2013).

Ефективність калюсогенезу також залежала від вихідного генотипу рослини-донора експлантів. Загалом, калюс з різних типів експлантів генотипів диплоїда з додатковими 1-3 В-хромосомами DAR12 та диплоїда G/D12-2a отримано на 4 з 5 протестованих варіантах живильних середовищ, диплоїда S22 — на варіантах № 1, 3, 5, R35 — лише на середовищі В5 і МС, а триплоїда Y66 — виключно на середовищі В5 з різними концентраціями 2,4 Д та БАП (табл.).

Відомо, що одним із головних внутрішніх факторів здатності до дефіренціювання є генотип експланта (Кунах, 2005; Malini et al., 2015). Наприклад, для утворення морфогенних калюсів I і II типів для ліній кукурудзи (*Zea mays* L.) плазми Ланкастер показано, що вирішальною була сила впливу взаємодії генотипу з екологічними факторами вирощування донорних рослин (Деркач та ін., 2018).

Таблиця. Ефективність калюсоутворення з експлантів генотипів *D. antarctica*, зібраних з п'яти локалітетів у регіоні Аргентинських островів на живильних середовищах різного складу

Генотип та його місце зростання	Тип експланту	Ефективність калюсоутворення, %				
		Середовище № 1 (B5 + 2 мг/л 2,4Д + 0,1 мг/л БАП)	Середовище № 2 (B5 + 10 мг/л 2,4Д + 0,2 мг/л БАП)	Середовище № 3 (МС + 5 мг/л 2,4Д + 0,1 мг/л Кін)	Середовище № 4 (5С + 2 мг/л 2,4Д + 0,1 мг/л БАП)	Середовище № 5 (5С + 2 мг/л 2,4Д + 2 мг/л НОК + 1 мг/л Кін)
R35, диплоїд (2n = 26), мис Расмусен	корені	0	8,3 ± 0,4	11,5 ± 0,3	0	0
	точка росту пагона	0	40,0 ± 2,4	0	0	0
	листки	18,8 ± 0,9	0	0	0	0
DAR12, диплоїд з додатковими 1-3 В-хромосомами (2n = 26 + 1-3В), о. Дарбо	корені	20,0 ± 1,2	8,3 ± 0,4	23,1 ± 1,2	0	7,1 ± 0,3
	точка росту пагона	71,4 ± 3,6	25,0 ± 1,3	0	0	0
	листки	0	0	4,5 ± 0,2	0	0
S22, диплоїд (2n = 26), о. Скуа	корені	0	0	5,8 ± 0,3	0	6,7 ± 0,2
	точка росту пагона	10,0 ± 0,6	0	28,6 ± 1,7	0	0
	листки	3,7 ± 0,2	0	3,6 ± 0,2	0	0
Y66, триплоїд (2n = 36 – 39), о. В. Ялур	корені	7,7 ± 0,4	14,9 ± 0,8	0	0	0
	точка росту пагона	0	100	0	0	0
	листки	25,0 ± 1,1	0	0	0	0
G/D12-2a диплоїд (2n = 26), о. Галіндез	корені	15,0 ± 0,9	20 ± 1,2	0	0	0
	точка росту пагона	0	66,7 ± 4,0	0	0	0
	листки	0	0	8,3 ± 0,3	12,5 ± 0,8	0

Для проліферації калюсу ми відібрали найбільш ефективні для індукції середовища № 1, 2, 3 та на їх основі протестували живильні середовища В5 та МС із різним вмістом фітогормонів. Встановлено, що найбільшою здатністю підтримувати ріст калюсних тканин в пасивованій куль-

турі характеризувалися середовища із зменшеним вмістом ауксинів та цитокінінів порівняно з середовищами для індукції калюсоутворення: В5 +2 мг/л 2,4-Д мг/л + 0,1 БАП мг/л та МС +1 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л Кін (рис. 1).

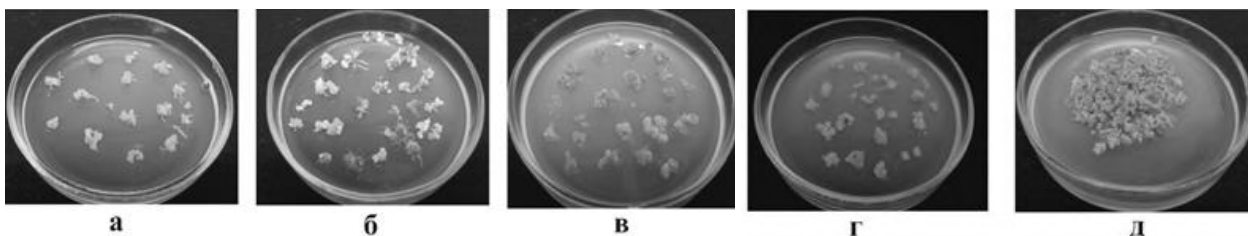


Рис 1. Культура тканин рослин *D. antarctica* різних генотипів: **а** — диплоїд ($2n = 26$) з мису Расмусен (R35), **б** — диплоїд ($2n = 26$) з острова Галіндез (G/D12-2а), **в** — диплоїд ($2n = 26$) з о. Скуа (S22), **г** — диплоїд з додатковими 1-3 В-хромосомами ($2n = 26 + 1-3В$) з о. Дарбо (DAR12) та **д** — триплоїд ($2n = 36 - 39$) з о. В. Ялур (Y66).

Окрім калюсоутворення, у культурі тканин *D. antarctica* подекуди відбувався спонтанний органогенез. Ознаки регенерації пагонів з експла-

нтів точок росту пагона генотипу з 1-3 В-хромосомами DAR12 на середовищі № 1 у першому пасажі спостерігали через 12–15 діб (рис. 2).

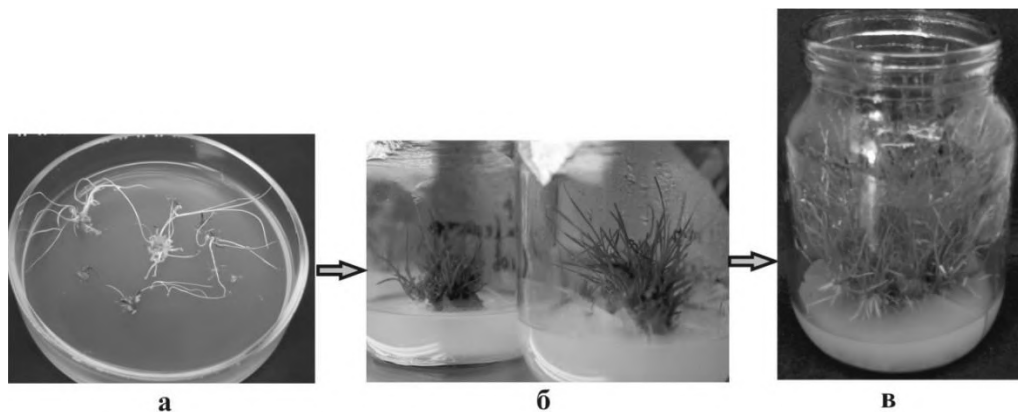


Рис 2. Різні етапи регенерації у культурі тканин *D. antarctica* генотипу DAR12 ($2n = 26 + 1-3В$): **а** — первинний калюс експлантів точок росту із зачатками пагонів, 12-15 діб; **б** — формування рослин-регенерантів, 4–6 тижнів; **в** — вкорінена рослина, 10–12 тижнів.

У випадку диплоїда G/D12-2а органогенез відбувся у 6-му пасажі тканин з листових експлантів (середовище № 2) через 15–18 діб після пересадки (рис. 3). В обох випадках у калюсі фор-

мувалися зачатки пагонів довжиною до 5–8 мм. За умови освітлення впродовж 6–8 діб вони набували зеленого забарвлення. Формування рослин-регенерантів відбувалося протягом 4–6 тижнів.

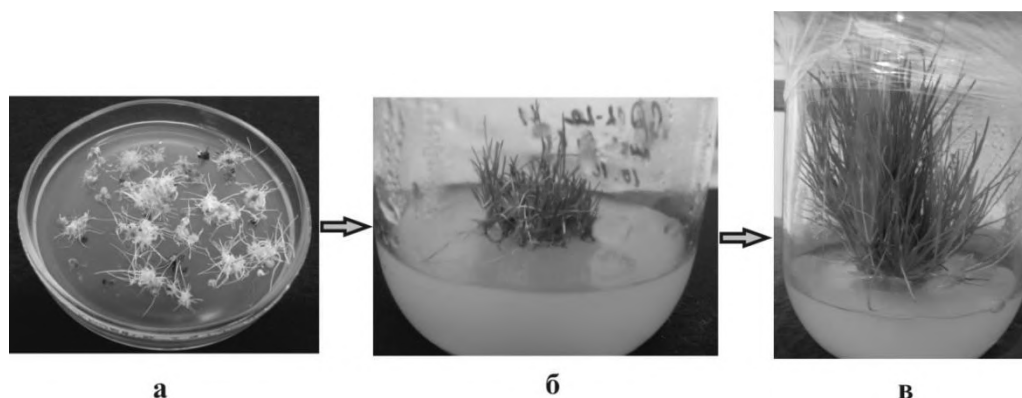


Рис 3. Різні етапи регенерації у культурі тканин *D. antarctica* генотипу G/D12-2a ($2n = 26$): **а** — морфогенний калюс з листових експлантів у 6-му пасажі із зачатками пагонів, 15–18 діб; **б** — формування рослин-регенерантів, 4–6 тижнів; **в** — вкорінена рослина, 10–12 тижнів.

Подібні результати отримані іншими дослідниками при індукції калюсоутворення з надземної частини й коренів *D. antarctica*. При цьому встановлено, що на середовищі МС, доповненому регуляторами росту 2,4-Д та БАП, із сформованого калюсу відбувалася регенерація пагонів. Низькі концентрації регуляторів росту більшою мірою сприяли непрямій регенерації (відсоток регенерації досягав 99%, середня кількість пагонів у розрахунку на калюсний інокулюм складала 25,4 (Cuba et al., 2004). Крім того, відомо, що окрім ініціації калюсоутворення із стеблових експлантів *D. antarctica* з о. Дарбо (середовище Шенка, Хільдебрандта), з о. Скуа (середовище МС + 1,0 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП) та о. Галіндез (середовище В5 + 0,9 мг/л 2,4-Д і 0,09 мг/л БАП) відбувалася спонтанна регенерація пагонів (Загричук та ін., 2013).

Висновки

Підібрано умови для індукції калюсоутворення і проліферації культури тканин з листових, кореневих експлантів та точок росту пагонів *D. antarctica* з п'яти локалітетів Морської Антарктики. Інтенсивність калюсоутворення залежала від мінерального складу живильного середовища, співвідношення і концентрації регуляторів росту, типу експланта та вихідного генотипу рослини-донора. Оптимальними для індукції калюсних тканин з різних типів експлантів були середовища з мінеральною основою В5 та МС. Встановлено, що найбільшою здатністю підтримувати ріст калюсних тканин у пасивованій культурі характеризувалися середовища із зменшеним вмістом ауксинів та цитокінінів порівняно з середовищами для індукції калюсоутворення: В5 +2 мг/л 2,4-Д мг/л +

0,1 БАП мг/л та МС +1 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л Кін. Внаслідок спонтанного органогенезу у пасивованих калюсних тканинах на 1-6 пасажах отримано рослини-регенеранти генотипів диплоїда з 1-3 В-хромосомами DAR12 та диплоїда G/D12-2a, підібрано умови *in vitro* для їх вкорінення.

Розроблені способи індукції та проліферації культури тканин *D. antarctica* в умовах *in vitro*, можуть бути використані для одержання достатньої кількості потрібного для різнопланових досліджень рослинного матеріалу.

Перелік літератури

1. Amosova A. V., Bolsheva N. L., Samatadze T. E., Twardovska M. O., Zoshchuk S. A., Andreev I. O., Badaeva E. D., Kunakh V. A., Muravenko O. V. Molecular Cytogenetic analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae), Maritime Antarctic. *PLoS ONE*. 2015. 10(9). e0138878. doi: 10.1371/journal.pone.0138878.
2. Cuba M., Gutierrez-Moraga A., Butendieck B. et al. Micropropagation of *Deschampsia antarctica* — a frost resistant Antarctic plant. *Antarctic science*. 2005. Vol. 17, No. 1. P. 69–70.
3. Day T. A., Ruhland C. T., Xiong F. S. Influence of solar ultraviolet-B radiation on Antarctic terrestrial plants: results from a 4-year field study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2001. Vol. 62. P. 78–87.
4. Gamburg O. L., Eveleigh D. E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem*. 1968. Vol. 46, No. 5. P. 417–421.
5. Gidekel M., Weber H., Cabrera G. et al. Pat. US 2010/0310686 A1 Extracts of *Deschampsia antarctica* Desv. with antineoplastic activity; this application claims priority of the U.S. provisional application № 61/003,058 filed on Nov. 14, 2007; date of publication 12.12.2010.

6. Malini N., Ananadakumar C. R., Hariramakrishnan S. Regeneration of Indian maize genotypes (*Zea mays* L.) from immature embryo culture through callus induction. *Journal of Applied and Natural Science*. 2015. Vol. 7, No. 1. P. 131–137.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Phys. Plant*. 1962. Vol. 15, No. 3. P. 473–497.
8. Parnikoza I., Kozeretska I., Kunakh V. Vascular plants of the maritime Antarctic: origin and adaptation. *Am. J. of Plant Sciences*. 2011. Vol. 2. P. 381–395. doi: 10.4236/ajps.2011.
9. Rashid U., Ali Sh., Ali Gh., Masood M. Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in Pakistani wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2009. Vol. 12 No. 3. P. 1–12. doi: 10.2225/vol12-issue3-fulltext-1.
10. Ruhland C., Xiong F., Clark W. Dey T. The influence of ultraviolet-B radiation on growth, hydroxycinnamic acids and flavonoids of *Deschampsia antarctica* during springtime ozone depletion in Antarctica. *Photochemistry and Photobiology*. 2005. Vol. 81, No. 5. P. 1086–1093. doi: 10.1562/2004-09-18-RA-321.
11. Saja J. Sh. In vitro study of the callus induction of two varieties of wheat seeds by plant growth regulators. *J. Biochem. Cell. Arch*. 2018. Vol. 18, No. 2, P. 2067–2071. doi: 10.3923/aj.2018.67.71.
12. Webby R., Markham K. 2"-O- β -arabinopyranoside and other flavone-C-glycosides from the Antarctic grass *Deschampsia antarctica*. *Phytochemistry*. 1994. Vol. 36, No. 5. P. 1323–1326.
13. Деркач К. В., Борисова В. В., Малецький В. О., Сатарова Т. М. Здатність до калюсогенезу ліній кукурудзи плазми Ланкастер за варіювання умов доквілля. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2018. Т. 22. С. 228–234.
14. Загречук О. М., Герц А. І., Дробик Н. М. Кунах В. А. Калюсогенез та регенерація рослин *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) в культурі *in vitro*. *Biotechnologia Acta*. 2013. Т. 6. С. 77–85.
15. Загречук О. М., Дробик Н. М., Козерецька І. А., Парнікоза І. Ю., Кунах В. А. Введення в культуру *in vitro* *Deschampsia antarctica* з двох районів Прибережної Антарктики. *Український антарктичний журнал*. 2011. № 10. С. 289–295.
16. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіологічно-біохімічні основи. Монографія. К.: Логос, 2005. 730 с.
17. Кунах В. А., Можилевська Л. П. Новая питательная среда для получения и выращивания клеточных культур-продуцентов биологически активных веществ. Международная конференция «Пути решения проблем и перспективы развития биотехнологии в декоративном садоводстве и плодоводстве». Ялта, Украина, 25–26 сентября, 1997. С. 19.
18. Лакин Г. Ф. Биометрия: Учебное пособие для биологических специальностей вузов. — М.: Высш. школа, 1980. 293 с.
19. Поронник О. О., Кузьменко А. В., Воловик А. В., Швачко Л. В., Войцехівська О. В., Мирюта Г. Ю., Рубан Т. А., Парнікоза І. Ю., Кунах В. А. Клоновані *in vitro* рослини роду *Deschampsia* як джерело фенольних сполук з протипухлинними властивостями. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2014. Т. 12, № 2. С. 200–204.
20. Navrotska D. O., Twardovska M. O., Andreev I. O., Parnikoza I. Yu., Betekhtin A. A., Zahrychuk O. M., Drobyk N. M., Hasterok R., Kunakh V. A. New forms of chromosome polymorphism in *Deschampsia antarctica* Desv. from the Argentine islands of the Maritime Antarctic region. *Український антарктичний журнал*. 2014. № 13. С. 185–191.

References

1. Amosova A. V., Bolsheva N. L., Samatadze T. E., Twardovska M. O., Zoshchuk S. A., Andreev I. O., Badaeva E. D., Kunakh V. A., Muravenko O. V. Molecular Cytogenetic Analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae), Maritime Antarctic. *PLoS ONE*. 2015. 10(9). e0138878. doi: 10.1371/journal.pone.0138878.
2. Cuba M., Gutierrez-Moraga A., Butendieck B. et al. Micropropagation of *Deschampsia antarctica* — a frost resistant Antarctic plant. *Antarctic science*. 2005. Vol. 17, No. 1. P. 69–70.
3. Day T. A., Ruhland C. T., Xiong F. S. Influence of solar ultraviolet-B radiation on Antarctic terrestrial plants: results from a 4-year field study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2001. Vol. 62. P. 78–87.
4. Gamborg O. L., Eveleigh D. E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem*. 1968. Vol. 46, No. 5. P. 417–421.
5. Gidekel M., Weber H., Cabrera G. et al. Pat. US 2010/0310686 A1 Extracts of *Deschampsia antarctica* Desv. with antineoplastic activity; this application claims priority of the U.S. provisional application № 61/003,058 filed on Nov. 14, 2007; date of publication 12.12.2010.
6. Malini N., Ananadakumar C. R., Hariramakrishnan S. Regeneration of Indian maize genotypes (*Zea mays* L.) from immature embryo culture through callus induction. *Journal of Applied and Natural Science*. 2015. Vol. 7, No. 1. P. 131–137.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Phys. Plant*. 1962. Vol. 15, No. 3. P. 473–497.
8. Parnikoza I., Kozeretska I., Kunakh V. Vascular plants of the maritime Antarctic: origin and adaptation. *Am. J. of Plant Sciences*. 2011. Vol. 2. P. 381–395. doi: 10.4236/ajps.2011.
9. Rashid U., Ali Sh., Ali Gh., Masood M. Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in Pakistani wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2009. Vol. 12. No. 3. P. 1–12. doi: 10.2225/vol12-issue3-fulltext-1.

10. Ruhland C., Xiong F., Clark W., Dey T. The influence of ultraviolet-B radiation on growth, hydroxycinnamic acids and flavonoids of *Deschampsia antarctica* during springtime ozone depletion in Antarctica. *Photochemistry and Photobiology*. 2005. Vol. 81, No. 5. P. 1086–1093. doi: 10.1562/2004-09-18-RA-321.
11. Saja. J Sh. In vitro study of the callus induction of two varieties of wheat seeds by plant growth regulators. *Biochem. Cell. Arch.* 2018. Vol. 18, No. 2, P. 2067–2071. doi: 10.3923/aj.2018.67.71.
12. Webby R., Markham K. Isoswertiajaponin 2"-O- β -arabinopyranoside and other flavone-C-glycosides from the Antarctic grass *Deschampsia antarctica*. *Phytochemistry*. 1994. Vol. 36, No. 5. P. 1323–1326.
13. Derkach K. V., Borysova V. V., Maletskyi V. O., Satarova T. M. The ability of maize Lancaster inbreds to callusogenesis *in vitro* under varying environmental conditions. *Fakt. eksp. evol. org.* 2018. Vol. 22. P. 228–234.
14. Zagrychuk O. M., Herts A. I., Drobyk N. M., Kunakh V. A. Callus formation and regeneration of *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) in culture *in vitro*. *Biotechnologia Acta*. 2013. Vol. 6. P. 77–85. (in Ukrainian).
15. Zagrychuk O. M., Drobyk N. M., Kozeretka I. A., Parnikoza I. Yu., Kunakh V. A. Introduction in culture *in vitro* of *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) from two regions of Maritime Antarctica. *Ukrainian antarctic journal*. 2011. Vol. 10. P. 289–295. (in Ukrainian).
16. Kunakh V. A. Biotechnology of medician plants. Genetic, physiological and biochemical basis. Kyiv: Logos, 2005. 730 p (in Ukrainian).
17. Kunakh V. A., Mozhylevskaia L. P. Novaia pitatel'naia sreda dlia polucheniia i vyrashchivaniia kletochnykh kult'ur-produtsentov biologicheskii aktivnykh veshchestv. Mezhdunarodnaia konferentsiia «Puti resheniia problem i perspektivy razvitiia biotekhnologii v dekorativnom sadovodstve i plodovodstve». Ialta, Ukraina, 25–26 sentiabria, 1997. S.19.
18. Lakin G.F. Biometriia: Uchebnoe posobie dlia biologicheskikh spetsial'nostey vuzov. — M.: Vyssh. shkola, 1980. 293 s.
19. Poronnik O. O., Kuzmenko A. V., Volovyk A. V., Shvachko L. V., Voytsevivska O. V., Myryuta G. U., Ruban T. A., Parnikoza I. J., Kunakh V. A. Plant clones of *Deschampsia* as a source phenolic compounds with antitumor properties. *Visn. Ukr. tov. genet. sel.* 2014. Vol. 12, No. 2. P. 200–204 (in Ukrainian).
20. Navrotska D. O., Twardovska M. O., Andreev I. O., Parnikoza I. Yu., Betekhtin A. A., Zahrychuk O. M., Drobyk N. M., Hasterok R., Kunakh V. A. New forms of chromosome polymorphism in *Deschampsia antarctica* Desv. from the Argentine islands of the Maritime Antarctic region. *Ukrainian Antarctic Journal*. 2014. No. 13. P. 185-191.

Представлено В. М. Мельником
Надійшла 29.05.2019

CALLUS INITIATION AND ORGANOGENESIS IN VITRO IN *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* E. DESV.

I. I. Konvalyuk, L. P. Mozhylevs'ka, V. A. Kunakh

Institute of Molecular Biology and Genetics
of National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, Kyiv; Akademika Zabolotnogo street, 150
e-mail: konvalyuk.I.I@gmail.com

Aim. The aim of the work was to determine the optimal conditions for induction and proliferation of tissue culture obtained from *D. antarctica* plants from various localities of the Maritime Antarctica. **Methods.** Tissue and organ culture techniques. **Results.** The media B5 supplemented with 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BAP, B5 supplemented with 10 mg/l 2,4-D + 0,2 mg/l BAP and MC, supplemented with 5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l Kin were optimal for callus induction from different types of explants. The media with a reduced concentrations of auxins and cytokinins were the most effective for maintenance of continuous tissue culture compared to the media for callus induction: B5 + 2 mg/l 2,4-D mg/l + 0,1 mg/l BAP and MC + 1 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l Kin. Tissues from shoot growth point and leaf explants of genotypes DAR12a and G/D12-2a on medium B5 with 2 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l BAP and B5 with 10 mg/l 2,4-D + 0,2 mg/l BAP demonstrated the ability to spontaneous organogenesis and formed separate shoots. **Conclusions.** Conditions have been determined for the induction and proliferation of tissue culture from leaf, root, and shoot growth point explants of *D. antarctica*. The frequency of callus formation depended on the mineral composition of medium, ratios and concentrations of growth regulators, type of explant, and genotype of a donor-plant. As a result of spontaneous organogenesis, regenerated plants were obtained, conditions for their rooting *in vitro* were elaborated. The proposed methods for induction and proliferation tissue culture of *D. antarctica in vitro*, can be used to produce the plant material useful for a various investigations.

Keywords: *Deschampsia antarctica* E. Desv., tissue culture, organogenesis *in vitro*, frequency of callusogenesis.