

УДК [575.22 : 582.542.11] (292.3)

## ОСОБЛИВОСТІ ХРОМОСОМНОЇ МІНЛИВОСТІ В КУЛЬТУРІ ТКАНИН РОСЛИН *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* DESV. З РІЗНИМ ЧИСЛОМ ХРОМОСОМ

В.А. КУНАХ, Д.О. НАВРОЦЬКА, М.О. ТВАРДОВСЬКА, І.О. АНДРЕЄВ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150  
e-mail: navrotska.daria@gmail.com

**Мета.** З'ясувати особливості хромосомної мінливості в калюсних тканинах *D. antarctica* на перших пасажах вирощування *in vitro*. **Методи.** Отримання калюсів з корневих експлантів асептичних рослин, вирощених з насіння, та подальше субкультивування калюсних тканин. Цитогенетичний аналіз давлених препаратів, забарвлених ацетоорсеїном, визначення числа хромосом у метафазах мітозів. **Результати.** Проведено аналіз культивованих тканин, отриманих від рослин *D. antarctica* з різним числом хромосом: диплоїдів ( $2n=26$ ), міксоплоїда з диплоїдним модальним класом і наявністю В-хромосом ( $2n=26+1-3B$ ), міксоплоїда з білятриплоїдним модальним класом ( $2n=36, 38$ ). В 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 біядиплоїдним набором хромосом. 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. **Висновки.** В культурі тканин *D. antarctica* на перших етапах її культивування незалежно від стану каріотипу вихідної рослини (диплоїд, міксоплоїд, поліплоїд) модальний клас складали диплоїдні клітини та клітини з біядиплоїдним числом хромосом.

**Ключові слова:** *Deschampsia antarctica* Desv., культура тканин, хромосомна мінливість *in vitro*, міксоплоїдія.

**Вступ.** Культура рослинних тканин і клітин є експериментальною моделлю для вивчення клітинного поділу, диференціації та морфогенезу, які є ключовими в процесах розвитку (формування меристеми та ембріогенезу) [1] та стрес-опосередкованої пластичності геному рослин [2, 3]. Згідно з Барбарою МакКлінток, культура тканин *in vitro*, подібно до впливу біотичних та абіотичних стресорних факторів та міжвидової гібридизації, є видом стресу, що спричиняє широкомасштабну реорганізацію геному [4–6].

Як відомо, у процесі дедиференціації та проліферації клітин в ізолюваних умовах відбувається дестабілізація генетичних та епігенетичних програм розвитку тканин, що призводить до морфологічних, фізіологічних, біохімічних і молекулярних змін. На хромосомному рівні спостерігаються зміна кількості (анеу- та поліплоїдія) і морфології хромосом, структурні перебудови каріотипу [2, 3, 7].

Результати досліджень хромосомної мінливості при калюсоутворенні досить суперечливі. З одних публікацій відомо, що вже серед перших мітозів після індукції дедиференціювання спостерігається міксоплоїдія з широким розмахом за кількістю хромосом та наявністю різних аномалій мітозу. Водночас інші автори стверджують, що серед перших клітинних поділів рівень порушень невеликий і лише при подальшому субкультивуванні відбувається збільшення хромосомних аномалій. Істотний, можливо, навіть визначальний вплив на наявність і рівень таких порушень серед перших мітозів *in vitro* справляє генотип вихідної рос-

лини. Проте досліджень, спеціально присвячених вивченню можливого впливу стану каріотипу вихідної рослини (експланту) на особливості хромосомної мінливості на перших етапах культивування *in vitro*, проведено мало; дані такого характеру проаналізовано у книзі [2, с. 201–203].

Щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* Desv.) – вид, що зростає в Антарктиці, є зручною моделлю для вивчення регуляції активності та змін у геномі, зумовлених впливом як природних, так і штучно-змодельованих стресових чинників. Припускають, що цей вид має специфічні механізми адаптації, які забезпечують життєздатність в екстремальних кліматичних умовах Прибережної Антарктики (світлового стресу, низьких температур, посухи, засолення ґрунтів, високого рівня УФ-опромінення) [8–11]. Наші попередні дослідження вперше встановили, що серед проростків *D. antarctica*, отриманих з насіння, зібраного на різних островах Аргентинського архіпелагу (Прибережна Антарктика), зустрічаються різні форми хромосомного поліморфізму. Зокрема, поряд з рослинами з диплоїдним числом хромосом, було виявлено поліплоїдні та міксоплоїдні рослини, а також особини, каріотип яких містить 1–3 додаткові В-хромосоми. Ми припускаємо, що поява таких хромосомних форм є реакцією геному рослин *D. antarctica* на стресові умови зростання і, можливо, такі геномні зміни є адаптивними [12–14]. Проте це питання потребує додаткових досліджень.

Важливим є збереження подібних генотипів, та й у цілому генофонду *D. antarctica*, рідкісного й унікального злаку, методами культури *in vitro* як за допомогою клонального мікророзмноження, так і у вигляді культури тканин, як це описано в роботах [15–16]. Проте досі не досліджено генетичну реакцію рослин *D. antarctica* з різним каріотипом на введення в культуру *in vitro*, особливо при індукції калюсоутворення.

Метою роботи було з'ясувати особливості хромосомної мінливості в калюсних тканинах *D. antarctica*, отриманих від рослин з різним числом хромосом – диплоїдних, диплоїдної з В-хромосомами і міксоплоїдної з білятриплоїдним модальним класом.

#### Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були калюсні культури, отримані від фрагментів коренів рослин

*D. antarctica* з різним числом хромосом (табл. 1). Вихідні рослини були вирощені *in vitro* з насіння, зібраного на Аргентинських островах Прибережної Антарктики (поблизу Української антарктичної станції «Академік Вернадський»), а саме – на островах Великий Ялур (S65°14.039', W64°9.761'), Галіндез (S65°14.955', W64°15.181'), Дарбо (S65°23.707', W64°12.905'), Скуа (S65°15.302', W64°16.486') та мисі Расмуссен (S65°14.819', W64°5.156') під час X (сезон 2004/2005 рр.), XI (сезон 2006/2007 рр.) та XIV (сезон 2009/2010 рр.) Українських антарктичних експедицій. Детальні результати цитогенетичного аналізу цих рослин наведено в роботах [12–14].

Калюсні культури отримували і вирощували на агаризованому живильному середовищі Гамборга-Евелейг (B5) [17], доповненому 0,1 мг/л 6-бензил-амінопурина (БАП) і 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д). Детально умови отримання та вирощування калюсів *D. antarctica* описано в роботах [15, 16]. Тривалість пасажу для всіх досліджених калюсів становила 4 тижні.

Для цитологічного дослідження використовували калюсні тканини 2, 3 та 4-го пасажу, відібрані на 7-му добу росту. Зразки витримували протягом доби у крижаній воді при 0°C, після чого фіксували у суміші етанол:льодяна оцтова кислота (3:1) протягом доби. Зафіксований матеріал зберігали у 70° етанолі. Зразки фарбували 1 %-ацетоорсеїном і робили давлені препарати за методикою [18]. Кількість хромосом підраховували у 100 метафазах у кожній точці фіксації.

Для аналізу цитологічних препаратів 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. Отримані дані аналізували статистично [19].

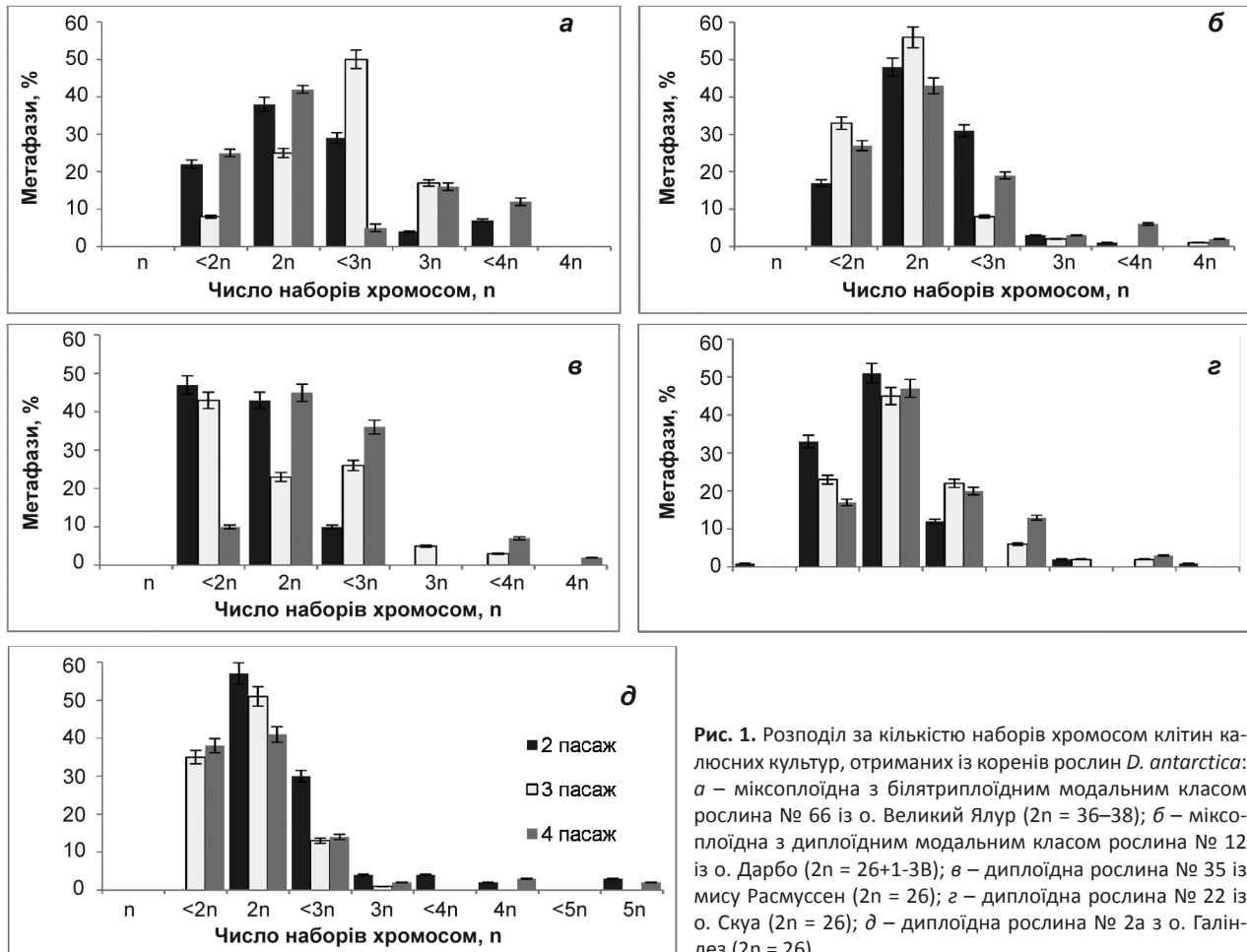
#### Результати та обговорення

Вивчення числа хромосом у культивованих клітинах, отриманих від усіх п'яти рослин, що відрізняються за числом хромосом, показало нестабільність калюсних культур за цією ознакою: частка клітин з будь-яким рівнем плоїдності змінювалась від пасажу до пасажу у кожному дослідженому калюсі (табл. 1, рис. 1).

Процес адаптації клітинних популяцій до ізолятованих умов *in vitro* поділяють на три періоди: пер-

**Таблиця 1.** Динаміка змін кількості клітин різних рівнів плоїдності у калюсних тканинах *D. antarctica*, отриманих від коренів рослин з різним каріотипом (%)

Походження рослини	Номер рослини та її плоїдність	Номер пасажу	Кількість наборів хромосом, n								
			1	<2	2	>2	3	>3	4	>4	5
о. Галіндез	№ 2а, диплоїд (2n = 26)	2	–	–	57±5,0	30±4,6	4±2,0	4±2,0	2±1,4	–	3±1,7
		3	–	35±4,8	51±5,0	13±3,4	1±1,0	–	–	–	
		4	–	38±4,9	41±4,9	14±3,5	2±1,4	–	3±1,7	–	2±1,4
о. Великий Ялур	№ 66, міксоплоїд (2n = 36, 38)	2	–	22±4,1	38±4,9	29±4,5	4±2,0	7±2,6	–	–	–
		3	–	8±2,7	25±4,3	50±5,0	17±3,8	–	–	–	
		4	–	25±4,3	42±4,9	5±2,1	16±3,6	12±3,2	–	–	–
о. Дарбо	№ 12, міксоплоїд (2n = 26+1-3В)	2	–	17±3,8	48±5,0	31±4,6	3±1,7	1±1,0	–	–	–
		3	–	33±4,7	56±5,0	8±2,7	2±1,4	–	1±1,0	–	–
		4	–	27±4,4	43±5,0	19±3,9	3±1,7	6±2,4	2±1,4	–	–
м. Расмуссен	№ 35, диплоїд (2n = 26)	2	–	47±5,0	43±5,0	10±3,0	–	–	–	–	–
		3	–	43±5,0	23±4,2	26±4,4	5±2,2	3±1,7	–	–	–
		4	–	10±3,0	45±5,0	36±4,8	–	7±2,6	2±1,4	–	–
о. Скуа	№ 22, диплоїд (2n = 26)	2	1±1,0	33±4,7	51±5,0	12±3,2	–	2±1,4	–	1±1,0	–
		3	–	23±4,2	45±5,0	22±4,1	6±2,4	2±1,4	1±1,4	–	–
		4	–	17±3,8	47±5,0	20±4,0	13±3,4	–	3±1,7	–	–



**Рис. 1.** Розподіл за кількістю наборів хромосом клітин калюсних культур, отриманих із коренів рослин *D. antarctica*: а – міксоплоїдна з біятриплоїдним модальним класом рослина № 66 із о. Великий Ялур (2n = 36–38); б – міксоплоїдна з диплоїдним модальним класом рослина № 12 із о. Дарбо (2n = 26+1-3В); в – диплоїдна рослина № 35 із мису Расмуссен (2n = 26); г – диплоїдна рослина № 22 із о. Скуа (2n = 26); д – диплоїдна рослина № 2а з о. Галіндез (2n = 26)

винної популяції, становлення та сформованого штаму. Клітини, що перебувають на стадії первинної популяції ізольованих клітин (первинний калюс і перші 1–2, інколи до 4-го пасажу) загалом характеризуються незначними генетичними змінами. Більш істотні зміни, у тому числі зміни числа хромосом, відбуваються пізніше, у періоді становлення штаму [2, 20]. Аналіз даних, наведених у табл. 1 і на рис. 1, свідчить про нестабільність вивчених нами калюсних культур, а тому дозволяє припустити, що вони знаходяться в періоді становлення.

Цитогенетичні особливості вихідних рослин впливали на число хромосом у досліджуваних калюсних клітинах. Калюс міксоплоїдної рослини з білятриплоїдним модальним класом з о. Великий Ялур (рослина № 66,  $2n = 36, 38$ ) характеризувався наявністю більшої кількості клітин з білятриплоїдним набором хромосом (табл. 1, рис. 1а); у клітинах калюсу міксоплоїдної рослини з диплоїдним модальним класом і наявністю В-хромосом з

о. Дарбо (рослина № 12,  $2n = 26+1-3B$ ) відмічали наявність метафаз, що містили В-хромосоми (рис. 2а, 2б). Слід підкреслити, що появу малих за розмірами хромосом, морфологічно подібних до В-хромосом, детально описаних раніше для рослини № 12 з о. Дарбо [14], відмічали також у калюсних тканинах, отриманих як від диплоїда з о. Галіндез (рослина № 2а,  $2n = 26$ ) (рис. 2в), так і в калюсі міксоплоїдної рослини з білятриплоїдним модальним класом № 66 з о. Великий Ялур (рослина № 66,  $2n = 36, 38$ ).

У табл. 2 та на рис. 3 наведено усереднені дані вивчення числа хромосом впродовж 2–4-го пасажів. Аналіз узагальнених даних показав, що розмах мінливості за числом хромосом у калюсних тканинах, отриманих від диплоїдної рослини № 2а із популяції о. Галіндез, був найбільшим серед досліджених калюсів і становив від 18 до 63 хромосом з середнім значенням на метафазу 24,9. Модальний клас формували клітини з диплоїдним та

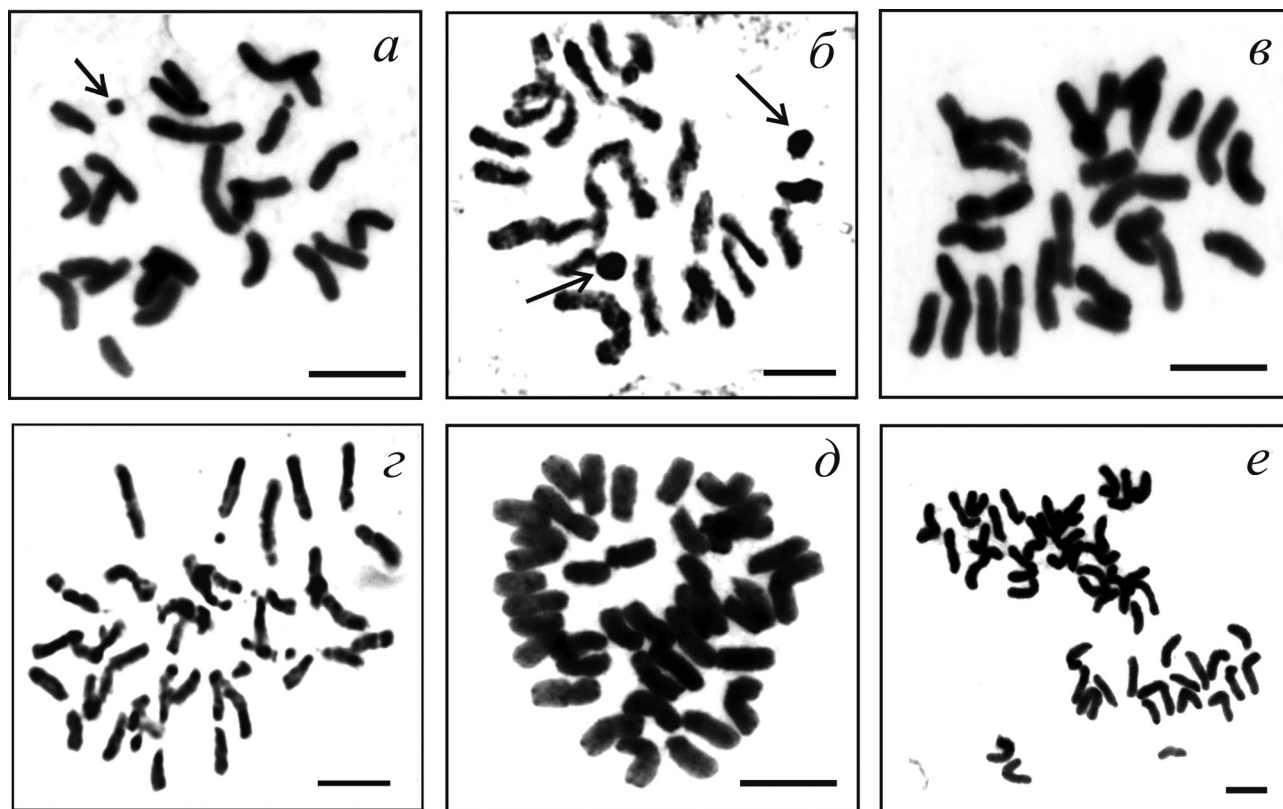


Рис. 2. Метафазні пластинки з різними числами хромосом у клітинах калюсних культур *D. antarctica*. Вихідні рослини вирощені з насіння, зібраного з: а – о. Дарбо,  $2n = 26+1B$ ; б – о. Дарбо,  $2n = 26+2B$ ; в – о. Галіндез,  $2n=26$ ; г – о. Галіндез,  $2n = 36$ ; д – о. Великий Ялур,  $2n = 38$ ; е – м. Расмуссен,  $2n = 52$  хромосоми. В-хромосоми та мікрохромосоми вказано стрілками. Масштаб – 10 мкм

**Таблиця 2.** Кількість клітин різних рівнів плоїдності в культивованих калюсних тканинах *D. antarctica*, отриманих від коренів рослин (усереднені дані 2–4-го пасажів)

Походження та число хромосом вихідної рослини	Кількість вивчених метафаз, шт.	Кількість наборів хромосом, n (%)								
		1	<2	2	>2	3	>3	4	>4	5
о. Галіндез, рослина № 2а (диплоїд, 2n = 26)	300	–	24,3±2,5	49,6±2,9	19±2,3	2,3±0,9	1,3±0,7	1,7±0,7	–	1,7±0,7
о. Великий Ялур, рослина № 66 (міксоплоїд, 2n = 36, 38)	300	–	18,3±2,2	35±2,8	28±2,6	12,3±1,9	6,3±1,4	–	–	–
о. Дарбо, рослина № 12 (міксоплоїд з В-хромосомами, 2n = 26+1-3В)	300	–	25,6±2,5	49±2,9	19,3±2,3	2,7±0,9	2,3±0,9	1±0,6	–	–
м. Расмуссен рослина № 35 (диплоїд, 2n = 26)	300	–	33,3±2,7	37±2,8	24±2,5	1,7±0,7	3,3±1,0	0,7±0,5	–	–
о. Скуа, рослина № 22 (диплоїд, 2n = 26)	300	0,3±0,3	24,3±2,5	47,7±2,9	18±2,2	6,3±1,4	1,3±0,6	1,7±0,7	0,3±0,3	–

біядиплоїдним числами хромосом (92,9 ± 1,5 %). Частка поліплоїдних клітин становила 5,6 %, тоді як анеуплоїдних – 44,6 % (табл. 2, рис. 3а).

Культура тканин, отримана від коренів рослини № 12 із о. Дарбо, каріотип якої має додаткові 1–3 В-хромосоми, характеризувалась розмахом мінливості за числом хромосом від 18 до 52 із середнім значенням на метафазу 25,7. Модальний клас так само складала диплоїдні клітини та клітини з біядиплоїдним числом хромосом (93,9 ± 1,4 %). Відсоток поліплоїдних клітин був низьким – 3,6 %, анеуплоїдні клітини складала майже половину (47,6 %) загального проліферативного пулу (табл. 2, рис. 3б).

Розмах мінливості за числом хромосом у калюсній культурі диплоїдної рослини № 35 з м. Расмуссен (2n = 26) становив 16 – 52 хромосом із середнім значенням на метафазу 25,7. Модальний клас так само складався із диплоїдних та біядиплоїдних клітин, частка яких становила 94,3 ± 1,3 %. Частка поліплоїдних клітин була найнижчою серед усіх досліджуваних калюсів (2,3 %). Поряд із цим, кількість анеуплоїдних клітин у цій культурі тканин була найбільшою (60,6 %) з-поміж аналізованих (табл. 2, рис. 3г).

У культурі тканин рослини № 22 з диплоїдним набором хромосом (2n = 26) із популяції о. Скуа встановлено наявність клітин із кількістю хромосом від 15 до 55 із середнім числом хромосом на

метафазу 24,6. Модальний клас складала диплоїдні клітини та клітини з біядиплоїдним числом хромосом (90 ± 1,7 %). Відсоток поліплоїдних клітин становив 8 %, частка анеуплоїдних клітин – 44 % (табл. 2, рис. 3д).

Калюсна культура міксоплоїдної рослини № 66 з біятриплоїдним набором хромосом (2n=36, 38) із о. Великий Ялур характеризувалась найменшим розмахом мінливості за числом хромосом від 18 до 46, проте найвищим середнім значенням хромосом на метафазу – 31,2. Модальний клас і тут формували диплоїдні та біядиплоїдні клітини, частка яких становила понад 50 %. У цій культурі був найвищий серед усіх досліджених калюсів відсоток поліплоїдних клітин – 12,3 %, а також частка анеуплоїдних клітин – 52,7 % (табл. 2, рис. 3в).

Як відомо, сукупна дія стресових впливів при культивуванні рослинних клітин *in vitro* часто перевищує межі норми реакції клітини і призводить до істотного збільшення мінливості геному [2, 5]. Ступінь прояву геномної нестабільності в клітинах калюсних культур залежить від генотипових особливостей рослини, типу експланта, розміру геному, віку культури та впливу зовнішніх гормональних чинників [2, 7, 20]. Причинами змін і перебудов геному за індукції калюсогенезу і під час перших пасажів вважають ендоредуплікацію, інсерції, делеції, інверсії та транспозиції мобільних генетич-



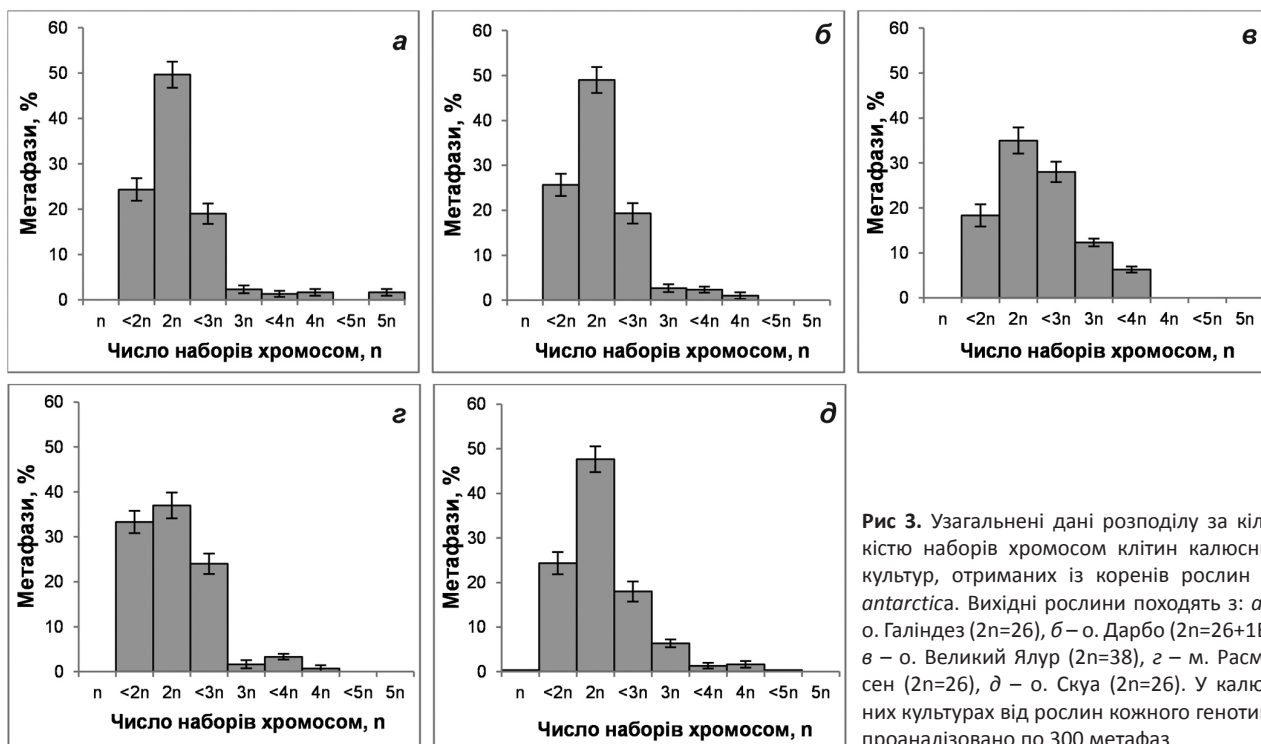


Рис 3. Узагальнені дані розподілу за кількістю наборів хромосом клітин калюсних культур, отриманих із коренів рослин *D. antarctica*. Вихідні рослини походять з: а – о. Галіндез (2n=26), б – о. Дарбо (2n=26+1В), в – о. Великий Ялур (2n=38), г – м. Расмуссен (2n=26), д – о. Скуа (2n=26). У калюсних культурах від рослин кожного генотипу проаналізовано по 300 метафаз

них елементів, зміну кількості гетерохроматину та його розподілу по хромосомах, появу та варіювання кількості В-хромосом, зміну числа і морфології хромосом внаслідок порушень та відхилень від нормального перебігу мітозу тощо [2, 6, 7].

Рівень гетерогенності калюсів значною мірою залежить від рівня плідності вихідної рослини та первинного експланта. Наприклад, у клітинах калюсу томату *Lycopersicon esculentum*, отриманих від гаплоїдної, диплоїдної і тетраплоїдної рослин, відмінності за числом хромосом спостерігали лише у первинному калюсі. За подальшого культивування у результаті процесів як поліплоїдизації, так і редукції числа хромосом ці калюси сформували практично однакові мікспоїдні калюсні тканини з переважанням поліплоїдних (тетраплоїдних) клітин [21]. Дослідження калюсних культур, отриманих від диплоїдних (2n=10) та ауотетраплоїдних (2n=40) проростків *Arabidopsis thaliana*, демонстрували високий рівень поліплоїдизації протягом калюсогенезу і їх подальшого культивування, незважаючи на походження [22]. У клітинах первинного калюсу виду *Carex capillaris*, отриманого від гаплоїдної рослини, рівень поліплоїдії був набагато вищим, ніж у тих, що були отримані від ди-

плоїдних рослин [2]. А у гороху трьох сортів, при вивченні первинного калюсу, отриманого із сегментів коренів проростків (гетерогенної за рівнем плідності тканини), модальний клас в усіх випадках складала диплоїдні клітини [2]. Інші приклади і деталі наведено у оглядових роботах [2, 20].

Очевидно, що у випадку, коли клітини вихідного експланта мали відмінне від диплоїдного число хромосом, мінливість культивованих клітин була вищою, особливо це характерне для клітин у період становлення штаму.

У нашому дослідженні, у культурі тканин рослини *D. antarctica* з білятриплоїдним набором хромосом (рослина № 66, о. Великий Ялур, 2n=36, 38), відмічено високу частоту як анеуплоїдних (52,6%), так і поліплоїдних клітин (18,6%). А у калюсах, отриманих із рослини з додатковою В-хромосомою (№ 12, о. Дарбо, 2n=26+1-3В), спостерігали збільшене, порівняно з іншими аналізованими культурами диплоїдного походження, число анеуплоїдних клітин (47%). Розмах мінливості за числом хромосом у обох досліджуваних калюсних культурах не виходив за межі середніх значень порівняно із іншими аналізованими генотипами.

Отримані експериментальні дані свідчать про наявність хромосомної мінливості в клітинах калюсних культур *D. antarctica* на початкових етапах субкультивування та підтверджують явище збереження цитогенетичних особливостей для диплоїдних рослин № 2а, № 12, № 22 (походженням із островів Галіндез, Дарбо, Скуа, відповідно). Для решти культур тканин (отриманих від рослин № 6б та № 35, походженням з о. Великий Ялур та м. Расмуссен, відповідно) характерне явище хромосомної нестабільності. Відмінності можливо пояснити тим, що останні калюсні культури, очевидно, знаходяться на стадії становлення штаму і не є сформованими, а тому все ще зазнають змін у процесі культивування, на відміну від сформованих штамів [2, 20].

### Висновки

Аналіз калюсних тканин, отриманих від п'яти відмінних за числом хромосом рослин *D. antarctica*, вирощених з насіння, зібраного в районі Аргентинських островів Прибережної Антарктики, дозволив вперше з'ясувати цитогенетичну структуру калюсних культур цього виду, виявити міксоплоїдію та появу В-хромосом в калюсах від деяких рослин. Ступінь прояву хромосомного поліморфізму клітин *in vitro* залежить від особливостей каріотипу вихідних рослин. Найбільший розмах мінливості числа хромосом (18 – 63) виявлено у калюсі, отриманому від диплоїдної рослини № 2а (2n=26) походженням із о. Галіндез. Менший розмах мінливості за числом хромосом виявлено у культурах тканин рослин *D. antarctica* походженням із островів Дарбо, Великий Ялур та Скуа. Найменша мінливість числа хромосом була виявлена у калюсі диплоїдної рослини із м. Расмуссен (16 – 52 хромосом). Однак модальний клас в усіх досліджуваних калюсах складала клітина з диплоїдним набором хромосом.

Поліплоїдні клітини були знайдені в культурі тканин усіх аналізованих рослин. Найвищий відсоток їх був у калюсній культурі поліплоїдної рослини з о. Великий Ялур (близько 47 %), а найменший – у культурі тканин рослини з м. Расмуссен (близько 30 %). Виявлено значну кількість анеуплоїдних клітин. Найбільше їх було у калюсних культурах рослин із м. Расмуссен та о. Великий Ялур (60,6 % та 52,7 %, відповідно).

**Подяки.** Висловлюємо подяку за допомогу Національному антарктичному науковому центру Міністерства освіти і науки України. Дослідження виконано в рамках Державної цільової науково-технічної програми проведення досліджень в Антарктиці на 2011–2020 рр.

Дякуємо за рослинний матеріал *D. antarctica* к.б.н, с.н.с відділу генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України І.Ю. Парнікозі; за збір насіння д.б.н., професору В.П. Поліщук (Х українська антарктична експедиція, сезон 2005 р.) та зимівнику к.б.н. І.В. Дикому (ХІ українська антарктична експедиція 2006/2007 рр. та ХІV українська антарктична експедиція 2009/2010 рр.).

### Перелік літератури

1. Zimmerman L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants // *Plant Cell*. – 1993. – No. 5. – P. 1411–1423.
2. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
3. Кунах В.А. Онтогенетическая пластичность генома как основа адаптивности растений. Жебраковские чтения. III. Преобразование геномов. – Минск: Право и экономика, 2011. – 56 с.
4. McClintock B. The states of a gene locus in maize // *Carnegie Institute of Washington Yearbook*. – 1968. – № 66. – P. 20–28.
5. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge // *Science*. – 1984. – No. 226 – P. 792–801.
6. Madlung A., Comai L. The effect of stress on genome regulation and structure // *Ann. Bot.* – 2004. – No. 94 – P. 481–495.
7. Neelakandan A. K., Wang K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications // *Plant Cell Rep.* – 2012. – Vol. 31 – P. 597–620.
8. Bravo L.A., Ullloa N., Zuniga G.E., Casanova A., Corcuera L.J., Alberdi M. Cold resistance in Antarctic angiosperms // *Physiol. Plant.* – 2001. – No. 111 – P. 55–65.
9. John U.P., Polotnianka R.M., Sivakumaran K.A., et al. Ice recrystallization inhibition proteins (IRIPs) and freeze tolerance in the cryophilic Antarctic hair grass *Deschampsia antarctica* E. Desv // *Plant Cell Environ.* – 2009. – Vol. 32 – P. 336–348.
10. Parnikoza I., Kozeretska I., Kunakh V. Vascular plants of the Maritime Antarctic: origin and adaptation // *Am. J. Plant Sci.* – 2011. – Vol. 2, No. 3 – P. 381–395.
11. Chew O., Lelean S., John U.P., Spangenberg G.C. Cold acclimation induces rapid and dynamic changes in freeze tolerance mechanisms in the cryophile *Deschampsia antarctica* E. Desv. // *Plant Cell Environ.* – 2012. – Vol. 35 – P. 829–837.
12. Навроцька Д.О., Твардовська М.О., Андрєєв І.О., Загрчук О.М., Парнікоза І.Ю., Дробик Н.М., Кунах В.А. Хромосомний поліморфізм рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з району Аргентинських островів (Прибережна Антарктика) // *Вісн. Укр. тов. генет. сел.* – 2014. – Т. 12, № 2 – P. 184–190.
13. Navrotska D.O., Twardovska M.O., Andreev I.O., Parnikoza I.Y., Betekhtin A.A., Zahrychuk O.M., Kunakh V.A. New forms of chromosome polymorphism in *Deschampsia antarctica* Desv.

- from the Argentine islands of the Maritime Antarctic region // Укр. антаркт. журн. – 2014. – No. 13. – С. 185–191.
14. *Atosova A.V., Bolsheva N.L., Samatadze T.E. et al.* Molecular cytogenetic analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae), Maritime Antarctic // PLOS ONE. – 2015. – Vol. 10, No. 9. – e0138878. DOI: 10.1371/journal.pone.0138877
  15. *Загричук О.М., Герц А.І., Дробик Н.М., Кунах В.А.* Калюсогенез та регенерація рослин *Deschampsia antarctica* Desv. у культурі *in vitro* // Biotechnol. Acta. – 2013. – Т. 6, No. 6 – P. 77–86.
  16. *Загричук О.М., Дробик Н.М., Козерецька І.А. та ін.* Введення в культуру *in vitro* *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) з двох районів Прибережної Антарктики // Укр. антаркт. журн. – 2011–2012. – № 10–11. – С. 289–295.
  17. *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.
  18. *Кунах В.А., Левенко Б.А.* Модифікація метода давлених препаратів для изучения хромосом в клетках культури тканин рослин // Цитол. генет. – 1975. – Т.9, No. 1 – С. 56–58.
  19. *Плохинский Н.А.* Биометрия. Изд. 2-е. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – 367 с.
  20. *Kunakh V.A.* Evolution of cell populations *in vitro*: peculiarities, driving forces, mechanisms and consequences // Biopolim. Cell. – 2013. – Т. 29, No. 4 – С. 295–310.
  21. *Зосимович В.П., Левенко Б.А., Кунах В.А., Юркова Г.Н.* Цитогенетическое изучение каллусных тканей томата от растений различной пloidности / В кн.: Культура клеток растений. – Киев: Наук. думка, 1978. – С. 97–104.
  22. *Fras A., Maluszynska J.* Regeneration of diploid and tetraploid plants of *Arabidopsis thaliana* via callus // Acta Biol. Crac. Ser. Bot. – 2003. – Vol. 45, No. 2. – P. 145–152.

Представлено О.В. Дубровною  
Надійшла 09.03.2016

#### ОСОБЕННОСТИ ХРОМОСОМНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* DESV. С РАЗНЫМ ЧИСЛОМ ХРОМОСОМ

В.А. Кунах, Д.А. Навроцкая, М.О. Твардовская, И.О. Андреев

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Украина, 03680, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 150  
e-mail: navrotska.daria@gmail.com

**Цель.** Определить особенности хромосомной изменчивости в каллусных тканях *D. antarctica* на первых этапах культивирования *in vitro*. **Методы.** Получение каллусов из корневых эксплантов асептических растений, выращенных из семян, и дальнейшее культивирование каллусных тканей. Цитогенетический анализ давлених препаратів, окрашенных ацетоорсеином, определение числа хромосом в метафазах митозов. **Результаты.** Проведён анализ культивируемых тканей, полученных от растений *D. antarctica* с разным числом хромосом: диплоидных ( $2n=26$ ), миксоплоида с диплоидным модальным классом и наличием В-хромосом ( $2n=26+1-3B$ ), миксоплоида с околотриплоидным модальным классом ( $2n=36, 38$ ). В каллусных тканях всех растений 2–4-го пассажей обнаружена миксоплоидия, наличие полиплоидных и анеуплоидных клеток. Модальный класс во всех исследованных каллусах формировали диплоидные клетки и анеуплоидные клетки с околоти-

плоидным набором хромосом. Установлена зависимость цитогенетической структуры клеточных популяций каллусных тканей от особенностей кариотипа растения-донора. Наибольший размах изменчивости по числу хромосом (от 18 до 63 хромосом) обнаружен в каллусе, полученном от диплоидного растения ( $2n = 26$ ) происхождением с о. Галиндез, а наивысшая частота полиплоидных (около 47 %) и анеуплоидных клеток – в культуре тканей миксоплоидного растения с околотриплоидным модальным классом с о. Большой Ялур. **Выводы.** В культуре тканей *D. antarctica* на первых этапах культивирования независимо от состояния кариотипа исходного растения (диплоид, миксоплоид, полиплоид) модальный класс составляли диплоидные клетки и клетки с околотиплоидным числом хромосом.

**Ключевые слова:** *Deschampsia antarctica* Desv., культура тканей, хромосомная изменчивость *in vitro*, миксоплоидия.

#### PECULIARITIES OF CHROMOSOMAL VARIABILITY IN CULTURED TISSUES OF *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* DESV. PLANTS WITH DIFFERENT CHROMOSOME NUMBERS

V.A. Kunakh, D.O. Navrotska, M.O. Twardovska, I.O. Andreev

Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine  
Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 150  
e-mail: navrotska.daria@gmail.com

**Aim.** To clarify the details of chromosome variation in calli derived from *D. antarctica* plants in the initial passages of the culture *in vitro*. **Methods.** Induction of callus from root explants of plants, which were grown from seeds, and consequent subcultivation of tissue cultures. Cytogenetic analysis of squashed slides stained by aceto-orcein and counting the number of chromosomes in mitotic metaphase plates. **Results.** There were analyzed the cultured tissues derived from *D. antarctica* plants with different chromosome numbers: diploid plants ( $2n=26$ ), mixoploid plant with B-chromosomes ( $2n=26+1-3B$ ), and mixoploid plant with near-triploid modal class ( $2n=36, 38$ ). Analysis of callus tissues of all plants at 2-4 passages revealed mixoploidy, presence of polyploid and aneuploid cells. The modal class in all studied calli was composed of diploid and aneuploid cells with near-diploid chromosome number. The cytogenetic structure of cell population of cultured tissues was found to vary with characteristics of the karyotype of donor plant. The largest range of variation in the number of chromosomes (from 18 to 63 chromosomes) was found in tissue culture of diploid plant ( $2n=26$ ) from the Galindez Island, and the highest frequencies of polyploid (47 %) and aneuploid cells were in the culture of mixoploid plant with near-triploid modal class from Big Yalour Island. **Conclusions.** In different *D. antarctica* cultured tissues at the early stages of the culture, the modal class was composed of diploid cells and cells with near-diploid chromosome number irrespective of karyotype of donor plant (diploid, mixoploid poliploid).

**Keywords:** *Deschampsia antarctica* Desv., plant tissue culture, chromosomal variability *in vitro*, mixoploidy.