

УДК [582.542.11+57.086.23]:575.22

ГЕНЕТИЧНА СТАБІЛЬНІСТЬ ОТРИМАНИХ МІКРОКЛОНАЛЬНИМ РОЗМНОЖЕННЯМ РОСЛИН *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* DESV. ЗА ТРИВАЛОГО КУЛЬТИВУВАННЯ IN VITRO

К.В. СПІРІДОНОВА¹, І.О. АНДРЕЄВ¹, О.М. ЗАГРИЧУК², Д.О. НАВРОЦЬКА¹,
М.О. ТВАРДОВСЬКА¹, Н.М. ДРОБИК², В.А. КУНАХ¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України
03680 Київ, вул. Академіка Заболотного, 150
e-mail: navrotska.daria@gmail.com

²Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка
46027 Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2
e-mail: zagrichuk_oks@mail.ru

З метою встановлення придатності розробленої раніше методики мікроклонального розмноження для отримання генетично однорідного рослинного матеріалу *D. antarctica* з використанням ПЛР-аналізу й цитогенетичного аналізу досліджено генетичну мінливість рослин у процесі розмноження та культивування in vitro. Вивчено клональне потомство рослин, які відрізнялися за молекулярно-генетичними маркерами й цитогенетичними характеристиками. Порівняльним аналізом рослин на початкових етапах розмноження (1–6-й пасажі) та за тривалого культивування in vitro (24–26-й пасажі і більше) не виявлено генетичних відмінностей між клонами спільного походження й вихідним генотипом за ISSR-маркерами. За допомогою аналізу тривало культивованих рослин (49–79-й пасажі) встановлено також збереження цитогенетичних характеристик рослин. У цілому отримані результати підтвердили, 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.

Ключові слова: *Deschampsia antarctica*, мікроклональне розмноження, геномна мінливість, ПЛР-аналіз, цитогенетичний аналіз.

Deschampsia antarctica Desv. — унікальна рослина, яка адаптувалася до умов Антарктичної екосистеми, однієї з найсуворіших для рослинності за кліматичними показниками [4, 8]. Через наявність особливих механізмів і систем стійкості до несприятливих умов довкілля ця рослина є цінним об'єктом для фундаментальних та біотехнологічних досліджень, зокрема як потенційне джерело господарсько-цінних генів. Вузкий ареал поширення *D. antarctica*, його віддаленість і важкодоступність потребують створення банку цінних генотипів зі стабільними генетичними ознаками. Більшість досліджень *D. antarctica* проведено на рослинах, привезених з Антарктики.

Система вирощування рослин в асептичних умовах на штучних поживних середовищах найпридатніша для розмноження матеріалу в контрольованих умовах, забезпечує його захист від впливу чинників чужорідного середовища і створює умови для дотримання вимог

біобезпеки. *D. antarctica* — кушковий злак, багаторічна рослина, яка хоча й не має спеціальних пристосувань для вегетативного розмноження, може давати початок новим особинам у результаті партикуляції або розчленування існуючих дернин. Припускають також, що для цього виду головним способом колонізації нових територій в Антарктиці є вегетативне розмноження шляхом перенесення частин рослин птахами, що використовують їх як гніздовий матеріал [5, 15]. Унаслідок таких біологічних особливостей *D. antarctica* вирощування рослин на штучних поживних середовищах та їх розмноження поділом дернини може стати оптимальним способом для отримання необхідного об'єму рослинного матеріалу в лабораторних умовах.

Водночас культивування на штучних поживних середовищах створює значний стрес для рослини, який впливає на організм у цілому і може спричинювати певні зміни його спадкового матеріалу [2]. Такі зміни виявляються в формі метилування ДНК, хромосомних перебудов, точкових мутацій тощо. Крім того, вегетативне розмноження призводить до накопичення соматичних мутацій [11]. Розроблено методику отримання регенерантів із калюсної культури та показано незначну генетичну мінливість таких рослин [13]. Проте цілеспрямованих досліджень генетичної мінливості *D. antarctica* за тривалого вегетативного розмноження *in vitro* не проводили.

Раніше ми підбрали умови для пророщування насіння і запропонували методику мікроклонального розмноження *D. antarctica in vitro* [1]. У цій роботі з використанням ПЛР-аналізу й цитогенетичного аналізу досліджено генетичну мінливість рослин *D. antarctica* за мікроклонального розмноження з метою з'ясування можливості використання розробленої раніше методики для отримання генетично однорідного рослинного матеріалу цього виду.

Методика

У роботі використано п'ять рослин *D. antarctica*, отриманих у лабораторних умовах із насіння, зібраного в Антарктиці в 2008 р. Насіння зібране в трьох природних популяціях з островів Дарбо ($n = 2$), Галіндез ($n = 2$) та Скуа ($n = 1$) в районі розміщення Української антарктичної станції «Академік Вернадський». Насіння пророщували на агаризованому поживному середовищі МС без регуляторів росту [1]. Отримані рослини культивували на агаризованому середовищі Гамборга—Евелейг (B_5), доповненому 0,1 мг/л кінетину, за освітлення 2—2,5 клк, 16-годинного світлового дня, температури $+20 \pm 0,5$ °C і вологості повітря 70—80 %. Мікроклональне розмноження рослин проводили поділом дернин на фрагменти та їх перенесенням в окремі посудини на свіже поживне середовище з подальшим культивуванням. Дернини ділили залежно від швидкості наростання біомаси. Тривалість пасажу становила в середньому близько 1,5 місяця. На окремих етапах культивування рослин клонів відбирали матеріал для аналізу ДНК, решту рослин продовжували культивувати й розмножувати в тих самих умовах.

ДНК виділяли з листкової тканини, висушеної за температури 37 °C, з використанням цетавлону (СТАВ), як описано в публікації [14].

Генетичні зміни визначали методом ПЛР-аналізу з використанням 10 ISSR-праймерів, підібраних раніше при дослідженні популяційно-

ТАБЛИЦЯ 1. Характеристика використаних ISSR-праймерів та отриманих ПЛР-продуктів

Номер праймера	Назва праймера	Послідовність нуклеотидів	Кількість ПЛР-фрагментів	
			загальна	поліморфних*
1	UBC#03	(AC) ₈ TT	10	3
2	UBC#04	(AC) ₈ AG	8	0
3	UBC#05	(AC) ₈ TG	12	4
4	UBC#23	(AC) ₈ TA	17	10
5	UBC#59	(AG) ₈ GC	8	2
6	UBC#807	(AG) ₈ T	8	1
7	UBC#810	(GA) ₈ T	9	0
8	UBC#811	(GA) ₈ C	12	7
9	UBC#836	(AG) ₈ YC	12	9
10	UBC#840	(AG) ₈ YA	10	3
Разом			106	39

*Праймери, які виявили поліморфізм у порівняльному генетичному аналізі вихідних рослин.

генетичного різноманіття *D. antarctica* в Прибережній Антарктиці (табл. 1). Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в суміші 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 мінерального масла для запобігання випаровуванню. Як негативний контроль використовували стандартну реакційну суміш без ДНК. ПЛР проводили в термоциклері «Терцик МС2» («Біотехнологія», Росія) за такого температурного режиму: 94 °С — 2 хв, 35 × (94 °С — 20 с, 53 °С — 30 с, 72 °С — 90 с), 72 °С — 5 хв.

Продукти ПЛР фракціонували електрофорезом в 1,5 %-му агарозному гелі в 1 × SB буфері (5 мМ Na₂B₄O₇, рН 8,5) з наступною візуалізацією в УФ-світлі після забарвлення бромистим етидієм.

Кожну реакцію проводили у двох повтореннях, враховували лише чіткі й відтворювані амплікони. Результати подавали у вигляді бінарних матриць, наявність або відсутність однакових за розміром фрагментів у спектрі ампліфікації позначали в матриці відповідно як «1» або «0». Парні генетичні відстані між рослинами розраховували за Жаккардом у програмі FAMD 1.3 [26].

Для цитогенетичного аналізу використовували корінці рослин, культивованих *in vitro*, завдовжки 1—1,5 см. Для накопичення та синхронізації мітозів перед фіксацією зразки витримували в крижаній воді протягом 24 год. Матеріал фіксували в суміші етанол : льодяна оцтова кислота у співвідношенні 3 : 1 протягом 24 год за кімнатної температури. Через 1 добу фіксатор замінювали на свіжий. Зафіксований матеріал зберігали при —20 °С. Зразки фарбували 1 %-м розчином ацетоорсеїну, після чого робили давлені препарати.

У роботі використано мікроскоп «NU-2E Carl Zeiss» із цифровим фотоапаратом «Canon 1000D». На кожному препараті аналізували лише ті метафазні пластинки, в яких можна було достовірно підрахувати кількість хромосом.

Результати та обговорення

Для визначення генетичної стабільності рослин *D. antarctica*, культивованих *in vitro*, провели порівняльний генетичний аналіз рослин, отриманих мікроклональним розмноженням, які культивували на поживному середовищі впродовж різного часу (від 1 до 26 пасажів). Загалом було досліджено клональне потомство 5 рослин, вирощених із насіння, яке походило з островів Дарбо (генотипи #12, #15), Галіндез (генотипи #2а, #20) та Скуа (генотип #7) і складалося з 23 зразків.

Для первинної характеристики рослинного матеріалу проведено молекулярно-генетичний і цитогенетичний аналізи вихідних рослин *D. antarctica*, отриманих із насіння. Генетичний поліморфізм оцінювали методом ISSR-аналізу з використанням 10 праймерів, назви та послідовності яких наведено в табл. 1. Застосовані праймери були підібрані раніше при дослідженні популяційно-генетичного різноманіття *D. antarctica* в Прибережній Антарктиці на основі оцінки показників інформативності за методикою, описаною в праці [21]. Загалом для цих зразків враховано 106 ампліконів, 39 (35 %) з яких були поліморфними. Встановлено, що рослини відрізняються між собою за спектрами ПЛР-продуктів. Спектри ПЛР-продуктів вихідних рослин із деякими праймерами наведено на рис. 1.

Значення попарних генетичних відстаней Жаккарда між різними генотипами, розраховані на основі результатів ISSR-аналізу, знаходилися в межах 0,145–0,277 (табл. 2).

Згідно з даними цитогенетичного аналізу деяких із досліджених у роботі рослин, обидва зразки з о. Галіндез (генотипи #2а, #20) мають типовий для цієї рослини диплоїдний набір хромосом $2n = 26$. Водночас в одній із рослин з о. Дарбо (генотип #12) у кореневій меристемі поряд із клітинами з типовим набором хромосом знайдено клітини, які мали додаткові В-хромосоми, з числом хромосом $2n = 26 + 1–2В$ (табл. 3, рис. 2).

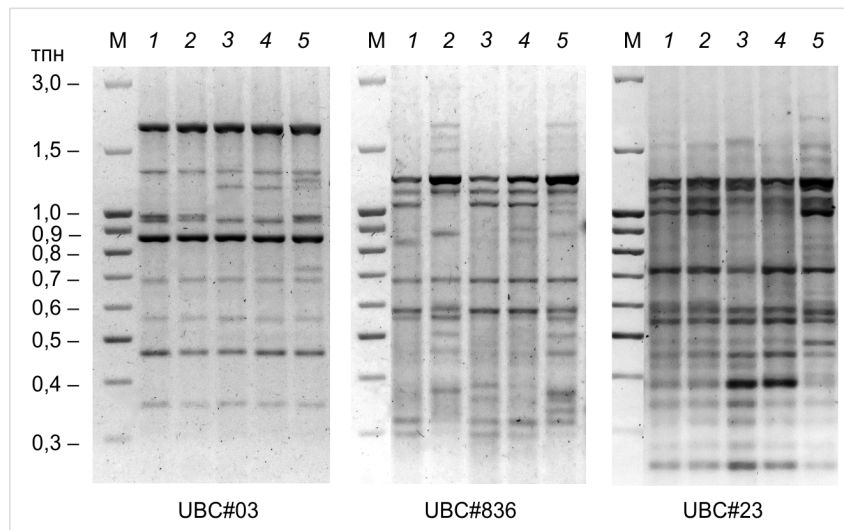


Рис. 1. Електрофоретичні спектри ПЛР-продуктів, які демонструють відмінності між дослідженими рослинами *Deschampsia antarctica*:

1, 2 — генотипи відповідно #20, #2а (о. Галіндез); 3, 4 — генотипи #15, #12 (о. Дарбо); 5 — генотип #7 (о. Скуа); М — маркер молекулярних розмірів ДНК (назви ISSR-праймерів наведено під електрофореграмами)

ТАБЛИЦЯ 2. Генетичні відстані Жаккарда між рослинами *D. antarctica*, використаними для мікроклонального розмноження, розраховані за результатами ISSR-аналізу

Генотип	#2a (о. Галіндез)	#20 (о. Галіндез)	#15 (о. Дарбо)	#12 (о. Дарбо)	#7 (о. Скуа)
#2a	—				
#20	0,1446	—			
#15	0,1818	0,2553	—		
#12	0,1765	0,2135	0,1667	—	
#7	0,2577	0,2347	0,2451	0,2772	—

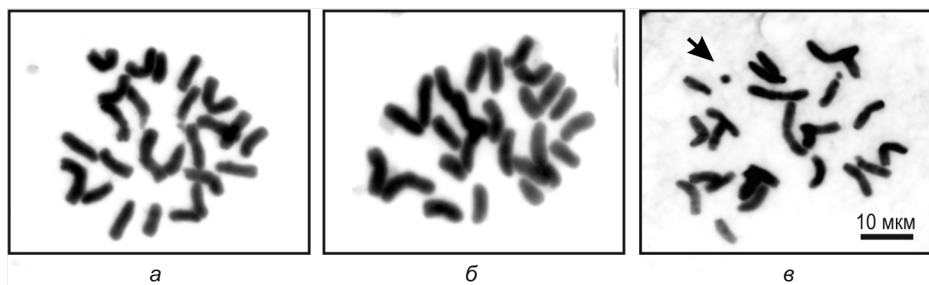


Рис. 2. Метафазні пластинки клітин апікальної меристеми кореня рослин *D. antarctica*: а — генотип #2 (о. Галіндез) — типовий набір хромосом ($2n = 26$); б, в — генотип #12 (о. Дарбо) — відповідно типовий набір хромосом ($2n = 26$) та набір із додатковою В-хромосомою ($2n = 26 + 1B$); стрілкою вказано В-хромосому

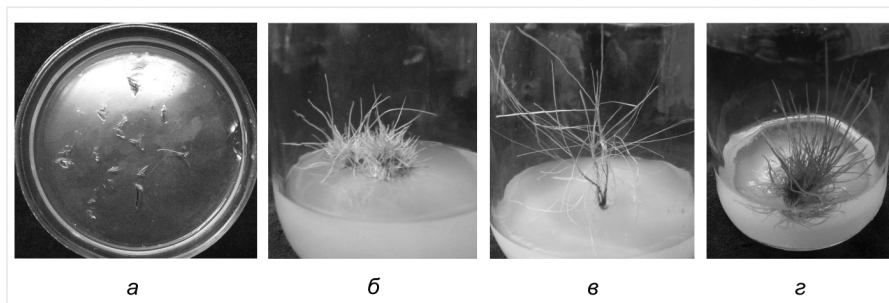


Рис. 3. Вигляд проростків і клонованих рослин *D. antarctica*, культивованих in vitro на агаризованому середовищі:

а — пророщені насіння; б — дернина материнської рослини, отримана з насіння; в, г — рослини, отримані мікроклональним розмноженням

Факт, що це саме В-хромосоми, а не фрагменти хромосоми, підтверджено в спеціально проведених дослідженнях [9].

Для оцінювання впливу стресу, зумовленого культивуванням in vitro, на геном *D. antarctica* вивчали рослини, отримані мікроклональним розмноженням (рис. 3). Оскільки найбільший стрес при культивуванні рослин і рослинних тканин in vitro зазвичай припадає саме на початковий етап, коли відбувається адаптація до нових умов існування, ми насамперед дослідили генетичну мінливість рослин у динаміці впродовж перших 6—8 пасажів, відбираючи матеріал кожні 1—2 пасажі. Загалом проведено молекулярно-генетичний аналіз 16 зразків (рослин) трьох

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ

ТАБЛИЦЯ 3. Результати цитогенетичного аналізу рослин *D. antarctica*, культивованих *in vitro*

Місце зростання вихідних рослин	Генотип	Досліджені корінці, шт.	Кількість корінців, шт.		Число хромосом $2n^*$	Метафази з диплоїдним набором хромосом, %
			диплоїдних	із додатковими хромосомами		
о.Галіндез	#20	6	6	—	26(19)	100
	#2a	1	1	—	26(8)	100
о.Дарбо	#12	5	4	1	26(12), 26+1B(1), 26+2B(1)	85,7±9,2

*Тут і в табл. 4 у дужках наведено кількість вивчених метафаз.

генотипів (#7 — у 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 8-му пасажах, #15 — у 1-, 2-, 4-, 6-му пасажах та #20 — у 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-му пасажах). Нам не вдалося виявити жодних відмінностей між зразками (клонами) одного генотипу, що може свідчити про відсутність помітних генетичних змін на початкових етапах мікроклонального розмноження.

Для одного з генотипів (#12), який характеризувався наявністю клітин з додатковими В-хромосомами, досліджено клональні варіанти рослин, отримані після 8-го пасажу, які продовжили культивувати окремо впродовж подальших 9 пасажів. Порівняльним дослідженням 5 клонів між собою та з матеріалом, відібраним у 8-му пасажі, за допомогою ПЛР-аналізу також не виявлено генетичних відмінностей ані між культивованими клонами, ані між клональними варіантами та вихідною рослиною.

З метою вивчення наслідків тривалого культивування *in vitro* для геному рослин провели порівняльний аналіз вихідних рослин *D. antarctica* трьох різних генотипів (#2a, #12, #20), отриманих із насіння, та рослин-потомків, які культивували впродовж 24—26-го пасажів. Однак навіть після такого тривалого культивування ми не виявили змін у спектрах ПЛР-продуктів мікроклонально розмножених рослин як із нормальним каріотипом, так і тих, що мали анеуплоїдні клітини або клітини з додатковими В-хромосомами.

Разом із молекулярно-генетичним дослідженням мінливості рослин, отриманих мікроклональним розмноженням, вивчено цитогенетичні характеристики рослин двох генотипів, які відрізняються між собою за кількістю хромосом (табл. 4). Одна з них (генотип #2a) походженням з о. Галіндез має клітини з типовим диплоїдним набором хромосом ($2n = 26$), в іншій (генотип #12) з о. Дарбо разом із типовими диплоїдними клітинами в невеликій кількості трапляються клітини, каріотип яких містить 1—2 додаткові В-хромосоми. У клональних рослин генотипу #2a, які культивували *in vitro* впродовж 57, 66 і 79 пасажів, не виявлено відмінностей за числом хромосом між собою, а також від предкової рослини — всі вони мали 26 хромосом. У рослин генотипу #12, відібраних для аналізу в 49-, 57- й 70-му пасажах, крім клітин із додатковими В-хромосомами виявлено певну кількість анеуплоїдних клітин із числом хромосом 27 і 28, а також мінливість за відсотком

ТАБЛИЦЯ 4. Результати цитогенетичного аналізу клітин кореневої меристеми рослин *D. antarctica*, отриманих мікроклональним розмноженням *in vitro* і культивованих тривалий час *in vitro*

Місце зростання вихідних рослин	Гено-тип	Но-мер па-сажу	Кількість корінців, шт.			Число хромосом, $2n$	Метафази з диплоїдним набором хромосом, %
			дослід-жених	із диплоїдними клітинами	з анеуплоїдними клітинами		
о.Галіндез	#2a	57	6	6	—	26(16)	100
		66	6	6	—	26(19)	100
		79	6	6	—	26(26)	100
о.Дарбо	#12	49	12	3	9	26(26), 26+1В(15), 27(5)	56,5±7,3
		57	5	4	1	26(13), 26+1В(1)	92,8±7,1
		70	5	1	4	26(30), 26+1В(1), 27(2), 28(1)	88,2±5,5

корінців з анеуплоїдними клітинами та за відсотком клітин з анеуплоїдією або В-хромосомами.

Таким чином, у результаті проведеної роботи методами молекулярно-генетичного й цитогенетичного аналізів вивчено генетичну мінливість культивованих *in vitro* рослин *D. antarctica*, отриманих мікроклональним розмноженням.

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

Згідно з результатами аналізу вихідних рослин, деякі з них відрізнялись за цитогенетичними параметрами. Два генотипи (#2a, #20) містили типовий для виду набір хромосом $2n = 26$, тоді як у рослин генотипу #12 у кореневій меристемі виявлено анеуплоїдні клітини та клітини з додатковими В-хромосомами. В-хромосоми трапляються в каріотипі багатьох покритонасінних рослин [3, 20]. Вважають, що варіабельність числа В-хромосом може відігравати значну роль в еволюційно значущій мінливості кількості гетерохроматину [19]. Встановлено, що наявність В-хромосом асоційована з підвищеною частотою мутацій в А-хромосомах [25] і може зумовлювати міжклітинні хромосомні міграції (цитоміксіс), що призводить до зміни числа хромосом у клітинах [23]. Роль додаткових хромосом остаточно не з'ясована, однак припускають, що в певних

випадках, а саме за несприятливих умов за дії різноманітних стресових чинників, вони можуть мати адаптивне значення, оскільки здатні підвищувати мінливість геному й відповідно поліморфізм популяції рослин. На користь цього припущення свідчать такі факти: рослини з додатковими В-хромосомами частіше виявляють у субоптимальних чи екстремальних умовах зростання [3, 12]; такі рослини характеризуються підвищеною стійкістю до посухи і низьких температур [6, 7].

Порівнянням цитогенетичних параметрів клональних рослин двох генотипів (#2а, #20), які культивували *in vitro* впродовж 49—79-го пасажів, встановлено, що на відміну від рослин із типовим для виду хромосомним набором $2n = 26$, у яких за тривалого культивування й вегетативного розмноження число хромосом не змінювалось, у рослин із додатковими В-хромосомами виявлено хромосомну мінливість, а саме зміни відсотка клітин із В-хромосомами, а також анеуплоїдних клітин із числом хромосом $2n = 27$ і 28. Досліджень, які б дали змогу з'ясувати вплив на рівень хромосомної мінливості початкових етапів культивування, ми, на жаль, не проводили, однак очевидно, що рослини з додатковими хромосомами мають підвищену мінливість геному. Водночас за тривалого культивування *in vitro* відсоток клітин із типовим числом хромосом у таких рослин варіює в певних межах і залишається порівнюваним із вихідними рослинами. Отже, це дає підставу зробити висновок, що застосована методика мікроклонального розмноження забезпечує збереження цитогенетичних характеристик рослин.

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших досліджень генетичної мінливості рослин, отриманих мікроклональним розмноженням. Зокрема, за допомогою молекулярно-генетичного аналізу рослин *Gerbera jamesonii* Bolus [10], *Swertia chirayita* [18], *Allium ampeloprasum* L. [17], трьох сортів банана (*Musa* spp.) [24], п'яти високорослих сортів чорниці, двох брусниці і шести малини [16], *Trichodesma indicum* (L.) [28] встановлено ідентичність профілів ПЛР-продуктів, отриманих із використанням RAPD- та ISSR-праймерів для клонів, мікроклонально розмножених *in vitro*, і вихідної рослини. При дослідженні клонованих *in vitro* рослин цінного лікарського виду *Viola pilosa* за допомогою RAPD- і ISSR-маркерів соматоклональної мінливості у них не виявлено [27]. Не виявлено також мінливості за даними RAPD-аналізу і серед мікроклонів лікарської рослини *Satureja avromanica*, яка знаходиться під загрозою зникнення в Ірані, що дало авторам підставу рекомендувати розроблені протоколи мікроклонування для масштабного розмноження і збереження виду [22].

Отже, з використанням ISSR-аналізу й цитогенетичного аналізу показано збереження молекулярно-генетичних і цитогенетичних характеристик у клонального потомства *D. antarctica* в процесі тривалого культивування *in vitro* згідно із запропонованою нами раніше методикою. Ці результати підтвердили можливість і доцільність використання розробленого нами способу отримання рослин *D. antarctica* мікроклональним розмноженням *in vitro*. За відсутності достатньої кількості рослинного матеріалу через віддаленість Антарктики цей спосіб дає можливість клонувати рослини зі стабільними генетичними характеристиками для подальшого їх використання в модельних експериментах, спрямованих на вивчення фізіолого-біохімічних параметрів рослини *D. antarctica* за дії різноманітних стресових чинників.

Автори статті щиро вдячні за наданий насінневий матеріал Національному науковому антарктичному центру України та особисто зимівнику І.В. Дикому, який збирав рослинний матеріал.

1. 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.
2. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
3. Кунах В.А. Додаткові або В-хромосоми рослин. Походження і біологічне значення // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2010. — 8, № 1. — С. 99—139.
4. Ожередова І.Р., Парнікоза І.Ю., Пороннік О.О. та ін. Механізм адаптації судинних рослин Антарктиди до абіотичних факторів довкілля // Цитология и генетика. — 2015. — 49, № 2. — С. 72—79.
5. Парнікоза І.Ю., Абакумов Е.В., Дикий И.В. и др. Орнитогенные локалитеты *Deschampsia antarctica* в районе Аргентинских островов (Прибрежная Антарктика) // Рус. орнитол. журн. — 2014. — 23, № 1056. — С. 3095—3107.
6. Соловьева Л.В., Плеханова Н.М. О добавочных хромосомах у жимолости // Цитология и генетика. — 1992. — 26, № 3. — С. 21—25.
7. Цитленок С.И., Пулькина С.В. Хромосомный полиморфизм *Crepis sibirica* (Asteraceae) // Ботан. журн. — 1991. — 76, № 11. — С. 1538—1544.
8. Alberdi M., Bravo L.A., Gutierrez A. et al. Ecophysiology of Antarctic vascular plants // *Physiol. Plant.* — 2002. — 115, N 4. — P. 479—486. DOI: 10.1034/j.1399—3054.2002.1150401.x
9. Amosova A.V., Bolsheva N.L., Samatadze T.E. et al. Molecular cytogenetic analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae), Maritime Antarctic // *PLoS One.* — 2015. — 10, N 9. — e0138878. doi: 10.1371/journal.pone.0138878
10. Bhatia R., Singh K.P., Sharma T.R. et al. Evaluation of the genetic fidelity of in vitro-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers // *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* — 2011. — 104. — P. 131—135.
11. Caetano-Anolles G. High genome-wide mutation rates in vegetatively propagated bermuda-grass // *Mol. Ecol.* — 1999. — N 8. — P. 1211—1221. DOI:10.1046/j.1365-294x.1999.00702.x
12. Chiavarino A.M., Rosato M., Rosi P. et al. Localization of the genes controlling B chromosome transmission rate in maize (*Zea mays* ssp. *mays*, Poaceae) // *Amer. J. Bot.* — 1998. — 85, N 11. — P. 1581—1585.
13. Cuba M., Gutierrez-Moraga A., Butendieck B., Giedekel M. Micropropagation of *Deschampsia antarctica* — a frost-resistant Antarctic plant // *Antarct. Sci.* — 2005. — 17, N 1. — P. 69—70.
14. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation of fresh leaf tissue // *Phytochem. Bull.* — 1987. — N 19. — P. 11—15.
15. Edwards J.A. Studies in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. and *Deschampsia antarctica* Desv. V. Distribution, ecology and vegetative performance on Signy Island // *British. Antarct. Surv. B.* — 1972. — N 28. — P. 11—28.
16. Gajdosova A., Ostrolucka M.G., Libiakiva G. et al. Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture in vitro // *J. Fruit Orn. Plant Res.* — 2006. — N 14 (Suppl. 1). — P. 103—119.
17. Gantait S., Mandal N., Bhattacharyya S. et al. Determination of genetic integrity in long-term micropropagated plantlets of *Allium ampeloprasum* L. using ISSR markers // *Biotechnology.* — 2010. — 9, N 2. — P. 218—223.
18. Joshi P., Dhawan V. Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay // *Biol. Plant.* — 2007. — 51, N 1. — P. 22—26.
19. Lepinasse R. Genese des chromosomes B el leur avenir evolutif // *Actes Colloq. biol. populat.* — Lyon, 1987. — P. 427—432.
20. Levin D.A., Palestis B.G., Jones R.N., Trivers R. Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms // *Evolution.* — 2005. — N 59. — P. 962—969.
21. Mosula M.Z., Andreev I.O., Bublyk O.M. et al. Molecular markers to assess genetic diversity of *Gentiana lutea* L. from the Ukrainian Carpathians // *Plant Genet. Res.* — 2015. — N 13. — P. 266—273. doi:10.1017/S147926211400104X.
22. Mozafari A.A., Vafaei Y., Karami E. In vitro propagation and conservation of *Satureja avromanica* Maroofi — an indigenous threatened medicinal plant of Iran // *Physiol. Mol. Biol. Plant.* — 2015. — 21, N 3. — P. 433—439.
23. Patra N.K., Srivastava H.K., Shauhan S.P. B chromosomes in spontaneous and induced intercellular chromosome migration of *Papaver somniferum* // *Indian. J. Genet. Plant Breed.* — 1988. — 48, N 1. — P. 31—42.
24. Ray T., Dutta I., Saha P. et al. Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers // *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* — 2006. — 85. — P. 11—21.
25. Saralva L.S., de Carvalho C.B. Genetic evidence of an internal deletion induced by B chromosomes in maize (*Zea mays* L.) // *Rev. Bras. Genet.* — 1993. — 6, N 1. — P. 107—113.
26. Schluter P.M., Harris S.A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data // *Mol. Ecol. Notes.* — 2006. — 6, N 2. — P. 569—572.

27. *Soni M., Kaur R.* Rapid in vitro propagation, conservation and analysis of genetic stability of *Viola pilosa* // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* — 2014. — **20**, N 1. — P. 95–101. DOI: 10.1007/s12298-013-0200-8.
28. *Verma N., Koche V., Tiwari K.L. et al.* Random amplified polymorphic DNA analysis detects variation in a micropropagated clone of *Trichodesma indicum* (L.) R. Br. // *Afr. J. Biotechnol.* — 2010. — **9**, N 28. — P. 4322–4325.

Отримано 02.06.2016

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ ПОЛУЧЕННЫХ МИКРОКЛОНАЛЬНЫМ
РАЗМНОЖЕНИЕМ РАСТЕНИЙ *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* DESV. ПРИ
ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VITRO

*Е.В. Спиридонова¹, И.О. Андреев¹, О.М. Загрчук², Д.А. Навроцкая¹, М.О. Твардовская¹,
Н.М. Дробык², В.А. Кунах¹*

¹Институт молекулярной биологии и генетики Национальной академии наук Украины,
Киев

²Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка

С целью установления пригодности разработанной ранее методики микроклонального размножения для получения генетически однородного растительного материала *D. antarctica* с использованием ПЦР-анализа и цитогенетического анализа исследована генетическая изменчивость растений в процессе размножения и культивирования in vitro. Изучено клональное потомство растений, отличавшихся по молекулярно-генетическим маркерам и цитогенетическим характеристикам. Сравнительным анализом растений на начальных этапах размножения (1–6-й пассажи) и при длительном культивировании in vitro (24–26-й пассажи и более) не выявлены генетические различия между клонами общего происхождения и исходным генотипом по ISSR-маркерам. С помощью анализа длительно культивируемых растений (49–79-й пассажи) установлено также сохранение цитогенетических характеристик растений. В целом полученные результаты подтвердили, что разработанная методика обеспечивает сохранение генетических характеристик *D. antarctica* в процессе длительного культивирования in vitro и может быть использована для получения генетически однородного растительного материала.

GENETIC STABILITY OF MICROPROPAGATED PLANTS OF *DESCHAMPSIA*
ANTARCTICA DESV. DURING LONG-TERM IN VITRO CULTURE

*K.V. Spiridonova¹, I.O. Andreev¹, O.M. Zagrichuk², D.O. Navrotska¹, M.O. Twardovska¹,
N.M. Droblyk², V.A. Kunakh¹*

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
150 Akad. Zabolotnogo St., Kyiv, 03680, Ukraine

²Volodymyr Hnatyuk Ternopil National Pedagogical University
2 M. Kryvonosa St., Ternopil, 46027, Ukraine

In order to establish the suitability of previously developed micropropagation protocol to get genetically uniform plants of *D. antarctica* the genetic variation of the plants in the process of propagation and maintenance in vitro was examined using PCR analysis and cytogenetic analysis. The clonal progeny was evaluated for the plants that differed by the molecular-genetic markers and cytogenetic characteristics. Comparative analysis of plants at the initial stages (1–6 passages) of propagation and after a long-term maintenance in vitro (24–26 passages and more) does not reveal genetic differentiation among the clones of common origin and their original genotype by ISSR-markers. Analysis of long-term cultured plants (49–79 passages) also showed maintenance of initial cytogenetic characteristics in the micropropagated plants. In general, the results prove that the developed technique provides the preservation of genetic characteristics of *D. antarctica* during long-term maintenance in vitro and can be used to produce genetically uniform plant material.

Key words: *Deschampsia antarctica*, micropropagation, genome variation, PCR-analysis, cytogenetic analysis.