

УДК 582.542.11:57.086.83

ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* *DESCHAMPSIA ANTARTCTICA* DESV. (POACEAE) З ДВОХ РАЙОНІВ ПРИБЕРЕЖНОЇ АНТАРКТИКИ

О.М. Загричук¹, Н.М. Дробик¹, І.А. Козерецька², І.Ю. Парнікоза³, В.А. Кунах³

¹ Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, 46027, м. Тернопіль, М. Кривоноса 2, e-mail: zagrichuk_oks@mail.ru

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64, e-mail: iryna.kozeretska@gmail.com

³ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: kunakh@imbg.org.ua

Реферат. Розроблено умови проростання насіння, мікроклонального розмноження, а також індукції калусоутворення з корневих і стеблових експлантів та тривалого вирощування культури тканин *Deschampsia antarctica* Desv. Для мікроклонування рослин оптимальним було живильне середовище В₅, що містило 0,2 мг/л кінетину, для калусогенезу з обох типів експлантів – це ж середовище, доповнене 0,9 мг/л 2,4-Д і 0,09 мг/л БАП. Калусогенна активність із корневих експлантів значно перевищувала (у 2-2,6 разів) таку ж із стеблових.

Введення в культуру *in vitro* *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) из двух районов Прибрежной Антарктики. О.М. Загричук, Н.М. Дробик, И.А. Козерецкая, И.Ю. Парникоза, В.А. Кунах

Реферат. Разработаны условия прорастания семян, микроклонального размножения, а также индукции каллусообразования с корневых и стеблевых эксплантов и длительного выращивания культуры тканей *Deschampsia antarctica* Desv. Для микроклонирования вида оптимальной была питательная среда В₅ с 0,2 мг/л Кин., для каллусогенеза с обоих типов эксплантов – эта же среда, дополненная 0,9 мг/л 2,4-Д и 0,09 мг/л БАП. Каллусогенная активность с корневых эксплантов значительно превышала (в 2-2,6 раз) таковую со стеблевых.

Introduction in culture *in vitro* of *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) from two regions of Maritime Antarctica. O.M. Zahrychuk, N.M. Drobyk, I.A. Kozeretska, I.Yu. Parnikoza, V.A. Kunakh

Abstract. There were developed conditions for seeds germination, micropropagation as well as for induction of callus formation from root and stem explants for a long-term *Deschampsia antarctica* Desv. tissue culture growing. Optimal for micropropagation of the species was nutrient medium В₅ with 0,2 mg/l Kin; for callusogenesis of both explants types – the same medium supplemented with 0,9 mg/l 2,4-D and 0,09 mg/l BAP. Callusogenesis from the root explants considerably exceeded (2-2,6 times) that from the stem one.

Key words: *Deschampsia antarctica* Desv., seeds germination, micropropagation, callus formation, tissue culture

1. Вступ

Щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae)) – один із двох видів судинних рослин, поширених в Антарктиці – унікальному регіоні з особливо суворими умовами існування біологічних об'єктів. Влітку температура повітря у Прибережній Антарктиці лише зрідка піднімається вище +5°C (Alberdi et al, 2002). Через тонкий озоновий шар у цій частині земної кулі місцеві організми піддаються опроміненню підвищеними дозами ультрафіолету. 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 згаданий вид надзвичайно цікавим об'єктом дослідження (Кир'яченко та ін., 2005). Рослина не лише вегетує, а й вільно розмножується в цих екстремальних умовах (Convey, 1996).

Зважаючи на складність збору достатньої кількості рослинного матеріалу та несприятливість умов для проведення експериментальних досліджень, доцільним є введення цієї рослини в культуру *in vitro*. Наявність рослин *D. antarctica* в колекції *in vitro* дасть можливість при потребі завжди мати матеріал для вивчення цього виду без нанесення шкоди його природним популяціям.

Тому важливим і актуальним є отримання достатньої кількості рослинного матеріалу шляхом мікроклонування, а також підбір умов для росту культури тканин *D. antarctica*, що й було метою цієї роботи.

2. Матеріали та методи досліджень

Вихідним матеріалом для досліджень було насіння *D. antarctica*, зібране в 2005–2008 рр. на західному узбережжі Антарктичного півострова – в оазі Пойнт Томас острова Короля Георга (Південні-Шетлендські острови) і віддаленому на 330 км на південь від них регіоні Аргентинських островів (о-ви Галіндес, Скуа, Берселот, Дарбо, Ялур) та місі Расмуссен. Насіння *D. antarctica* було зібране під час експедицій, організованих Національним Антарктичним Науковим Центром України, і надане зимівником І.В. Диким.

Для отримання асептичних проростків насіння *D. antarctica* стерилізували у розчині пероксиду водню за наступною схемою: обробка розчином детергенту протягом 30 хв.; промивання проточною водою протягом 30 хв.; 2-3-кратне промивання дистильованою водою; поверхнева стерилізація 96%-ним етанолом протягом 10 с.; витримання у 3-5%-ному розчині H_2O_2 ; 2-3-кратне промивання стерильною дистильованою водою.

Асептичне насіння висаджували в чашки Петрі на агаризоване живильне середовище МС (Murashige, Skoog, 1962) з половинним вмістом макро- та мікросолей (МС/2) без фітогормонів. Насіння пророщували на світлі (3000 лк) при температурі 20–22°C, вологості 80 %.

Для мікроклонального розмноження використовували асептичні 1,5–2-місячні рослини, які висаджували на живильні середовища МС та Гамборга, Евелейг (B_5) (Gamborg, Eveleigh, 1968), доповнені різними концентраціями регуляторів росту: 1-нафтилоцтової кислоти (НОК), індолілоцтової кислоти (ІОК) та кінетину (Кін). Мікроклонування проводили шляхом поділу отриманих дернин на фрагменти.

Для індукції калусоутворення використовували кореневі та стеблові експланти *D. antarctica*, висаджуючи їх на живильні середовища: МС, МС/2, Шенка, Хільдебрандта (ШХ) (Schenk, Hildebrandt, 1972), B_5 та середовище $B_5/2$ (B_5 з половинним вмістом макро- та мікросолей), доповнені різними концентраціями 6-бензиламінопурину (БАП) і 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д). Частоту калусогенезу визначали через три тижні культивування за відношенням кількості експлантів з калусом до їхньої загальної кількості.

При підборі оптимальних умов для проліферації тестували живильні середовища B_5 та МС з різними комбінаціями ауксинів і цитокінінів – БАП і 2,4-Д.

Культури інкубували в умовах темряви при 22–22,5°C, субкультивування проводили через кожні три тижні.

Результати досліджень опрацьовували статистично (Лакин, 1980).

3. Результати та обговорення

Відомо, що ефективним методом введення в культуру *in vitro* є отримання асептичних рослин шляхом пророщування простерилізованого насіння. Перешкодою цьому може бути стан органічного спокою насіння, на глибину якого нерідко значно впливають умови, за

яких проходить формування насіння, а також ступінь його дозрівання, тривалість та умови зберігання. Тому в деяких випадках фактори, які впливають на порушення спокою насіння одних видів, виявляються неефективними щодо інших з подібним типом спокою. Часто різняться умови пророщування навіть різних партій одного й того ж виду (Николаева и др., 1985). Дослідження сезонної періодичності проростання насіння, його схожості та залежності цих процесів від різних чинників дозволяє в контрольованих умовах цілеспрямовано стимулювати проростання насіння у різні пори року та отримувати життєздатні проростки (Страшнюк та ін., 2004).

У результаті нами встановлено, що ефективність стерилізації насіння *D. antarctica* була найвищою (100%) при його обробці 3%-ним розчином перексиду водню протягом 20 хв.

Для стимулювання проростання насіння *D. antarctica* використали два фактори: дію низькими позитивними температурами (протягом 1–40 місяців) та гібереловою кислотою (ГК₃). Виявлено, що холодова обробка протягом 21 місяця сприяла підвищенню схожості насіння до 55 % (острів Дарбо). Гіберелова кислота також забезпечувала збільшення відсотка проростання. Серед протестованих варіантів (концентрації – 100, 300, 400 та 600 мг/л ГК₃, час обробки – від 12 до 24 год.) оптимальним було витримування насіння у ГК₃ концентрацією 600 мг/л протягом 22 годин.

Нами встановлено, що насіння *D. antarctica* фрагментарно проростало протягом усього року (за винятком березня, травня та вересня) (рис. 1.) (Рис.1, 2, 4, 6 див. на кольоровій вклейці між 294 і 295 стор.). Для насіння від рослин з усіх досліджених популяцій найбільш сприятливим для схожості виявився саме осінньо-зимовий період (період астрального літа в Антарктиці) (Загречук та ін., 2011). У цей час насіння проростало з частотою до 55% (рис. 1).

Виявлено відмінності щодо періодичності проростання та схожості насіння *D. antarctica* з різних місць зростання (рис. 1). Насіння з о. Галіндез, на відміну від інших місць збору, проростало найчастіше протягом року (не проростало лише у березні та грудні). Його відсоток схожості лежав у межах від 5 до 13,3. Порівняно високим (6,7–55%) був цей показник для насіння з о. Дарбо, однак воно проростало лише у лютому, червні та листопаді (рис. 1). Насіння, зібране від рослин з інших досліджених популяцій, проростало лише в окремі місяці; його схожість при цьому була доволі низькою (5-6%).

Незважаючи на виявлені відмінності, для проростання насіння рослин *D. antarctica* з різних місць зростання встановлено спільні ознаки: доцільність використання як стерилента перексиду водню, відсоток асептичного насіння у всіх випадках складав 98–100%; ефективність порушення спокою насіння дією низьких позитивних температур (2–5°C) та обробкою гіберелової кислоти; проростання насіння в умовах освітлення.

Метод мікроклонування як один із методів біоконсервації *in vitro* можна з успіхом використовувати для масового розмноження різних груп рослин, для відновлення рідкісних, зникаючих і господарсько-цінних видів у природних умовах їхнього зростання, а також для отримання достатньої кількості рослинного матеріалу (Левенко, 2005, Шиша и др., 2008).

Нами встановлено, що для мікроклонального розмноження *D. antarctica* доцільним було доповнення живильних середовищ МС та В₅ кінетином. Отримані мікроклони на середовищі МС з 0,1 мг/л Кін вкорінювалися на 16–20 добу; ефективність вкорінення складала 80%. Оптимальним серед протестованих виявилось середовище В₅ з 0,2 мг/л Кін, на якому спостерігали інтенсивніший ріст рослин, а їхнє вкорінення відбувалося на 6–10 діб швидше і становило до 95% (рис. 2).

При дослідженні особливостей росту рослин *D. antarctica* в умовах *in vitro* (рис. 2), встановлено, що за два тижні культивування висота висаджених мікроклонів складала 9–12 мм, ще за місяць цей показник збільшився в 7–7,5 раза і становив 7–9 см. Через 3–4 місяці спостерігали формування дернини; при цьому висота рослини досягала 11–12 см, а через 5–6 місяців відбувалося її розростання та заповнення вегетативною масою усієї культивативної посудини (висота рослин досягала 16–18 см, а діаметр дернини – 10–12 см). Висота рослин у природних умовах становить від 3 до 20 см (Zuloaga et al., 1994).

У результаті встановлено, що стеблові та кореневі експланти *D. antarctica* здатні до формування калюсу на середовищах B₅, B₅/2, МС, МС/2 та ШХ, доповнених комбінаціями різних концентрацій 2,4-Д (0,5-1 мг/л) та БАП (0,09-2 мг/л). Проте інтенсивність калюсоутворення залежала від мінерального і фітогормонального складу живильного середовища, від типу експланта та популяційної приналежності рослини-донора експланта. Серед усіх протестованих зразків процес формування калюсу відбувався лише на експлантах рослин з островів Дарбо, Галіндез (рис. 3, рис. 4) та Скуа (рис. 5). Перші ознаки індукції калюсоутворення спостерігали через 12–25 діб з часу закладання експериментів. Спроби індукувати калюс з рослин інших місць зростання не принесли позитивних результатів.

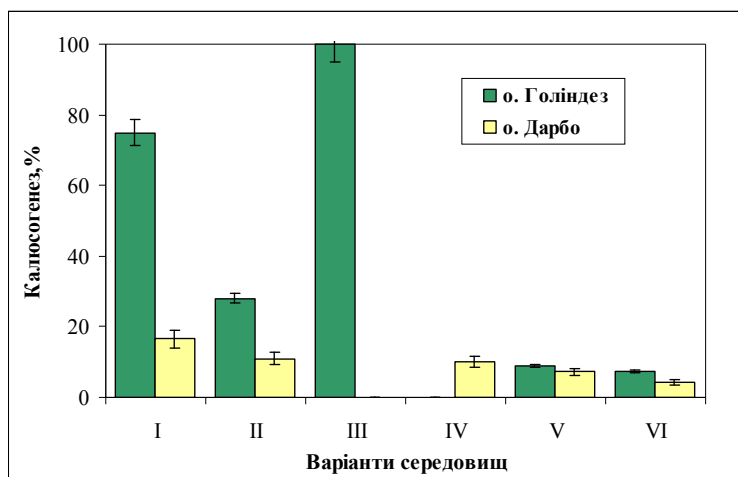


Рис. 3. Індукція калюсоутворення з корневих експлантів рослин *D. antarctica* з островів Галіндез і Дарбо на різних варіантах живильних середовищ: **I** – B₅/2 з 0,9 мг/л 2,4-Д і 0,09 мг/л БАП; **II** – B₅/2 з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП; **III** – B₅ з 1 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП; **IV** – B₅ з 1 мг/л 2,4-Д і 0,2 мг/л БАП; **V** – B₅ з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,2 мг/л БАП; **VI** – B₅ з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП

Fig. 3. Induction of callus formation in root explants of *D. antarctica* plants from Galindes and Darbo islands in various variants of nutrient media: **I** – B₅/2 with 0,9 mg/l 2,4-D and 0,09 mg/l BAP; **II** – B₅/2 with 0,5 mg/l 2,4-D and 0,1 mg/l BAP; **III** – B₅ with 1 mg/l 2,4-D and 0,1 mg/l BAP; **IV** – B₅ with 1 mg/l 2,4-D and 0,2 mg/l BAP; **V** – B₅ with 0,5 mg/l 2,4-D and 0,2 mg/l BAP; **VI** – B₅ with 0,5 mg/l 2,4-D and 0,1 mg/l BAP.

Інтенсивність калюсоутворення залежала від мінерального складу живильного середовища. При цьому використання для індукції калюсоутворення середовища B₅ виявилось найбільш ефективним: відсоток калюсогенезу у деяких випадках досягав 100, калюс характеризувався пухкою консистенцією та світло-жовтим забарвленням (рис. 4) (Загрчук та ін., 2011).

Зменшення концентрації макро- та мікросолей удвічі (середовище B₅/2) забезпечувало формування калюсу лише з корневих експлантів рослин о. Дарбо та о. Галіндез. Відсоток калюсоутворення варіював у межах 11–75 % (рис. 3). Сформований калюс був світло-жовтого забарвлення та пухкої консистенції. При наступних пересаджуваннях на свіжоприготовані живильні середовища аналогічного складу проліферативна активність калюсу сповільнювалась. На середовищі ШХ формування калюсу було результативним лише на корневих і стеблових експлантах рослин з о. Скуа. Процес наростання калюсу повільний. Відсоток калюсоутворення коливався у межах 6,5–52 (рис. 4). Сформований калюс компактний, темно-жовтого кольору.

Суттєвий вплив на калюсогенну активність мало і співвідношення регуляторів росту 2,4-Д і БАП у живильному середовищі. Серед усіх протестованих варіантів оптимальною виявилась комбінація 0,9-1,0 мг/л 2,4-Д та 0,09-0,1 мг/л БАП. За таких умов відбувалося формування калюсу як на корневих, так і на стеблових експлантах. При цьому відсоток калюсогенезу всіх досліджених зразків *D. antarctica* становив від 16,5 до 100 (рис. 3, рис. 5).

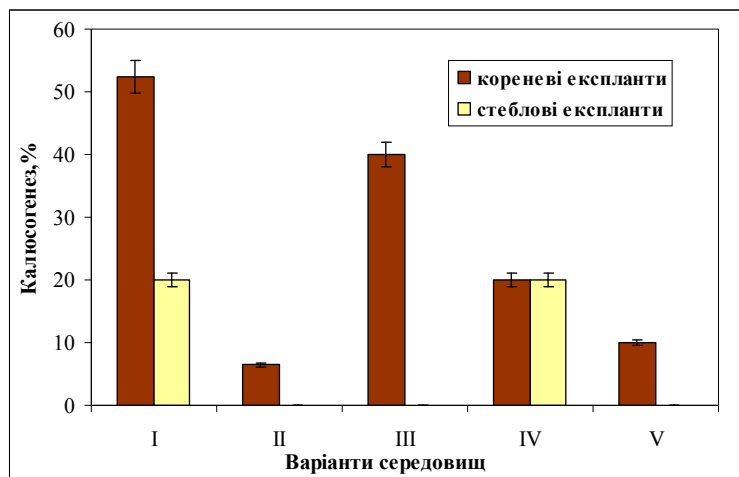


Рис. 5. Індукція калюсоутворення з корневих та стеблових експлантів рослин *D. antarctica* (о. Скуа) на різних варіантах живильних середовищ: **I** – ШХ з 0,9 мг/л 2,4-Д і 0,09 мг/л БАП; **II** –ШХ з 0,5 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП; **III** – В₅ з 0,9 мг/л 2,4-Д і 0,09 мг/л БАП; **IV** – В₅ з 1 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП; **V** – В₅ з 1 мг/л 2,4-Д і 0,2 мг/л БАП

Fig. 5. Induction of callus formation in root and stem explants of *D. antarctica* plants (Skua island) in various variants of nutrient media: **I** – SH with 0,9 mg/l 2,4-D and 0,09 mg/l BAP; **II** – SH with 0,5 mg/l 2,4-D and 0,1 mg/l BAP; **III** – В₅ with 0,9 mg/l 2,4-D and 0,09 mg/l BAP; **IV** – В₅ with 1 mg/l 2,4-D and 0,1 mg/l BAP; **V** – В₅ with 1 mg/l 2,4-D and 0,2 mg/l BAP.

Доповнення живильних середовищ 0,5 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л БАП забезпечувало калюсоутворення з корневих експлантів рослин з островів Дарбо, Галіндез та Скуа. Збільшення концентрації ауксину вдвічі без змін цитокініну сприяло дедиференціації з корневих експлантів рослин з о. Галіндез та з корневих і стеблових – з о. Скуа. При цьому відсотки калюсоутворення становили 100, 20 і 20 відповідно. При підвищенні концентрації 2,4-Д і БАП удвічі (1 мг/л 2,4-Д та 0,2 мг/л БАП) калюсогенез із стеблових експлантів не відбувався, а його інтенсивність із корневих експлантів знижувалась до 10% (рис. 3, рис. 5).

Здатність до калюсогенезу та його інтенсивність залежали й від типу експланта. Встановлено, що із всіх протестованих варіантів формування калюсу на обох типах експлантів відбувалася лише у випадку рослин з о. Скуа. При цьому відсоток калюсогенезу з корневих і стеблових експлантів не відрізнявся і становив 20% за умови використання середовища В₅ з 1 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП. На інших варіантах середовищ інтенсивність калюсоутворення із стеблових експлантів була меншою (у 2–2,6 раза) або ж формування калюсу не відбувалося (рис. 5).

Іншими авторами встановлено, що живильне середовище МС, доповнене різними комбінаціями регуляторів росту 2,4-Д і БАП, забезпечувало калюсоутворення з корневих і стеблових експлантів *D. antarctica*. Відсоток калюсогенезу при збільшенні концентрації 2,4-Д від 2,2 до 9 мкМ та БАП – від 0,2 до 4 мкМ зменшувався від 100% до 58% (Cuba et al., 2004).

При проведенні досліджень, спрямованих на індукцію калюсоутворення з експлантів стеблових походження рослин з островів Дарбо, Галіндез та Скуа, із утвореного калюсу

відбувалася спонтанна регенерація пагонів (рис. 6). Так, на середовищі ШХ ознаки індукції калюсу на стеблових експлантах *D. antarctica* з о. Дарбо проявлялися вже на 10-12 добу. Через тиждень з калюсу відбувалося формування пагонів, які протягом наступних 5-6 тижнів доростали до 2-2,5 см. Перші ознаки регенерації з калюсу на стеблових експлантах рослин з о. Галіндез, що культивувалися на середовищі В₅, доповненому 0,9 мг/л 2,4-Д і 0,09 мг/л БАП, спостерігались через 12-14 діб. Протягом 20 діб з калюсу формувалися опушені багаточисельні (15–35) пагони довжиною до 5 мм. За умови освітлення впродовж 6-8 діб вони набували зеленого забарвлення. За такий же час відбувалося утворення регенерантів на калюсі із стеблових експлантів *D. antarctica* з о. Скуа, що були висаджені на живильне середовище МС, доповнене 1,0 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л БАП.

Формування рослин-регенерантів у всіх наведених вище випадках відбувалося протягом 7-8 тижнів, після чого їх висаджували на живильне середовище В₅, доповнене 0,2 мг/л Кін. Для дальшого росту і розмноження отриманих рослин концентрацію цитокініну в живильному середовищі зменшували вдвічі.

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 найбільшою мірою сприяли непрямої регенерації (відсоток регенерації досягав 99, середня кількість пагонів у розрахунку на калюсний інокулюм складала 25,4 (Cuba et al., 2004)).

4. Висновки

З'ясовано особливості і розроблено умови проростання насіння, мікроклонального розмноження, а також індукції калюсоутворення з різних типів експлантів та тривалого вирощування культури тканин *D. antarctica*. Досліджено періодичність проростання насіння, його схожість, залежність цих процесів від різних чинників; в умовах *in vitro* отримано життєздатні морфологічно нормальні рослини, використані як вихідний матеріал для подальших досліджень.

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 поділ отриманих дернин на фрагменти.

Виявлено, що ефективність калюсоутворення залежала від мінерального і фітогормонального складу живильного середовища, типу експланта та місця зростання рослини-донора експланта. Найбільшою підтримуючою здатністю для калюсогенезу з корневих та стеблових експлантів характеризувалося середовище В₅ з додаванням 0,9-1 мг/л 2,4-Д і 0,09-0,1 мг/л БАП (відсоток калюсоутворення складав 16,5–100). Калюсогенна активність із корневих експлантів перевищувала таку із стеблових.

В умовах освітлення на живильних середовищах В₅, МС і ШХ, доповнених регуляторами росту 2,4-Д та БАП, із калюсу відбувалася спонтанна регенерація пагонів з наступним формуванням життєздатних рослин та їхнім укоріненням.

Запропоновані способи отримання рослин *D. antarctica* шляхом пророщування насіння *in vitro*, мікроклонального розмноження та калюсоутворення можуть бути використані для одержання достатньої кількості потрібного для різнопланових досліджень рослинного матеріалу.

Дослідження виконане за підтримки Національного Антарктичного Наукового Центру України в рамках договору між Українським антарктичним центром та Інститутом молекулярної біології та генетики НАН України № Н/3-2011 «Розробка системи біоіндикації кліматичних змін в Прибережній Антарктиці за параметрами динаміки наземних рослинних ценозів» (2011-2012 рр.) та в рамках договору про

співпрацю між Інститутом молекулярної біології та генетики НАН України і Тернопільським національним педагогічним університетом імені Володимира Гнатюка. Дякуємо за сприяння також відділу Біології Антарктики Польської академії наук і особисто проф. S.Rakusa-Suszczewski. Висловлюємо подяку зимівнику І.В. Дикому за збір насіння.

Список літератури

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

Кир'яченко С.С., Козерецька І.А., Ракуса-Сушевські С. *Deschampsia antarctica*: генетичні та молекулярно-біологічні аспекти поширення в Антарктиці // Цитология и генетика. – 2005. – № 4. – С. 75–80.

Лакін Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биологических специальностей вузов. – М.: Высш. школа, 1980. – 293 с.

Левенко Б.А. Генетические основы интродукции растений // Интродукция растений. – 2005. – №2. – С. 10–16.

Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Л.: Наука, 1985. – 347 с.

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

Шиша Е.Н., Сикура И.И., Кучук Н.В. Сохранение *in vitro* биоразнообразия видов рода *Allium* L. // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія біологія. – 2008. – Вип. 24. – С. 244–254.

Alberdi M., Bravo L.A., Gutierrez A. *et al.* Ecophysiology of Antarctic vascular plants // Physiol. Plant. – 2002. – Vol.115. – №5. – P. 479–486.

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

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

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

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

Schenk R.U., Hildebrandt A.C. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures // Can. J. Bot. – 1972 – Vol. 50. – P. 199–204.

Zuloaga, F.O., Nicora, E.G., Rugolo de Agrasar *et al.* Catalogo de la familia Poaceae en la Republica Argentina. Monogr. Syst.Bot. Missouri Bot. – 1994. – Gard. 47. – P. 1–178.