

ПАРНИКОЗА І.Ю.^{1✉}, МІРЮТА Н.Ю.¹, РОЙЕК М.², БЕТЄХТІН А.А.², ПОРОННІК О.О.¹, МІРЮТА Г.Ю.¹, НАВРОЦЬКА Д.О.¹, ХАСТЕРОК Р.², КУНАХ В.А.¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: ivan.parnikoza@gmail.com

² Сілезький Університет в Катовицях,

Польща, 40-032, м. Катовиці, вул. Ягелонська, 28

✉ ivan.parnikoza@gmail.com

РОСЛИНИ *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* E. DESV. З РІЗНИМ ЧИСЛОМ ХРОМОСОМ В УМОВАХ ВИРОЩУВАННЯ *IN VITRO*. ЗВ'ЯЗОК РОЗМІРУ ГЕНОМУ ТА ДВОХ ПОКАЗНИКІВ ПРИСТОСОВУВАНOSTI

На фоні кліматичних змін важливим є вивчення пристосовуваності рослин, що зростають в екстремальних умовах довкілля, зокрема таких, як Антарктика, і змушені адаптуватися як до локальної мозаїки мікрокліматів, так і до глобальних екологічних змін. Генетичні дослідження не показали значної генетичної гетерогенності аборигенного злаку *Deschampsia antarctica* E. Desv. [1, 2], проте у регіоні Аргентинських островів виявлено різні хромосомні форми цього злаку, зокрема диплоїдні, гіпотриплоїдні рослини та рослини, у каріотипі яких наявні додаткові В-хромосоми [3, 4].

У попередніх дослідженнях на прикладі *D. antarctica* показано необхідність застосування низки показників для оцінки комплексної пристосовуваності: показника проективного покриття як показника зайнятої території та морфометричних параметрів генеративних особин у популяції [5–7]. Зважаючи на це, метою роботи було з'ясувати, наскільки пов'язані між собою такий базовий показник розміру геному і показники пристосовуваності, що характеризують віталітет рослини та вміст деяких вторинних метаболітів.

Матеріали і методи

Перелік та коротка характеристика місць збору вивчених рослин 11 генотипів представлено в таблиці. Дослідні рослини вирощували *in vitro*, як описано в [8]. Визначення розміру геному (значення 2С ядерної ДНК) для кожного генотипу *D. antarctica* було розраховано на основі методу проточної цитометрії згідно з методикою [9], число хромосом визначали, як опи-

сано в [3]. Як характеристику віталітету рослин вивчали довжину листків. У листках також визначали кількість флавоноїдів за рутином, як описано в [10]. Для оцінки різниці між генотипами за кожним із досліджених параметрів було побудовано розподіли чи визначено середні значення. Пошук різниці між розподілами для пар популяцій за кожним параметром проводили методом критерію медіани [11]. При порівнянні середніх значень знаходили їх різниці за абсолютною величиною.

Для вивчення взаємозв'язку між дослідженими параметрами (ймовірнісних зв'язків) на першому етапі було застосовано деякі евристичні методи зниження розмірності, зокрема метод екстремального групування за парами характеристик [12]. Набори попарних порівнянь популяцій групували за трьома парами показників пристосовуваності: $|\Delta Gs| - |\Delta Ph|$, $|\Delta Gs| - |\Delta Fl|$ та $|\Delta Fl| - |\Delta Ph|$ (де $|\Delta Gs|$ – набір абсолютних значень попарних відстаней між розмірами геному (в пг), $|\Delta Ph|$ – набір абсолютних значень попарних відстаней (в умовних одиницях) між розподілами за довжиною листка, $|\Delta Fl|$ – набір абсолютних значень попарних різниць вмісту флавоноїдів). Кожну пару показників, яку піддавали екстремальному групуванню, було поділено на дві групи «позитивну» та «негативну» за допомогою регресійних методів. Ймовірність приналежності до кожної з груп визначали для кожного з одинадцяти досліджених генотипів. Для кожного з генотипів будували схеми, які мають наочно показати ймовірнісні зв'язки між дослідженими показниками.

Таблиця. Локалізація популяцій, із яких було зібрано насіння для одержання дослідних рослин (генотипів), хромосомні числа, розмір геному та вміст флавоноїдів у рослин *D. antarctica*, вирощуваних *in vitro*

№	Генотип	Локалізація, сезон збору насіння	Хромосомний набір, 2n	Розмір геному 2C, пг	Вміст флавоноїдів, мг/г
1	G/D4-1	о. Галіндез, S 65°14.916', W 64° 14.293', 2012/13	26	11,01±0,03	2,92
2	G/D12-2a	о. Галіндез S 65°14.845', W64°15.156', 2006/07	26	10,84±0,09	2,8
3	G/D12-1	о. Галіндез, S 65°14.845', W 64°15.156', 2013/14	26	11,02±0,06	3,86
4	Y62	о. Великий Ялур, S 65°14.039' W 64°09.761', 2004/05	26	10,85±0,10	1,62
5	Y66	о. Великий Ялур, S 65°14.039' W 64°09.761', 2004/05	36, 38, 39	16,74±0,07	2,23
6	Y67	о. Великий Ялур, S 65°14.039' W 64°09.761', 2004/05	26	10,79±0,07	2,64
7	S22	о. Скуа, мис Фінгер S 65°15.296', W 64°16.441', 2007/08	26	10,94±0,04	3,74
8	R35	мис Расмуссен, S 65°14.819', W 64°5.156', 2004/05	26	10,77±0,02	2,72
9	W1	о. Вінтер, S 65°14.851', W 64°15.482', 2013/14	26	10,91±0,04	2,23
10	DAR12	о. Дарбо, S 65°23.707', W 64°12.905', 2006/07	26+1-3B	10,86±0,04	1,22
11	L59	о. Лейхл, S 65°33.167', W 64°23.249', 2009/10	26	11,01±0,12	4,67

Результати та обговорення

Вивчення розміру геному підтвердило встановлену раніше на основі числа хромосом [3, 4], наявність у загальній масі диплоїдних рослин гіпотриплоїдного генотипу Y66 (табл.).

Рослини генотипів DAR12 (міксоплоїд, що містить 1-3 B-хромосоми) та Y66 (гіпотриплоїд) характеризувалися найбільшою довжиною листків (рис. 1 і, д). Домінуючим у цих рослин є 5-й клас за розміром листків (10–11,9 см). Диплоїдні рослини генотипу L59 (рис. 1 к) мали

розподіл із 3-м домінуючим класом і довгим «хвостом» у бік більших розмірів (6,0 - >18,0 см).

У диплоїдних рослин генотипів G/D4-1 (рис. 1 а), Y62 (рис. 1 г), Y67 (рис. 1 е) найбільшу частку складають листки 2-го (4,0–5,9 см), у генотипів S22 (рис. 1 є), G/D12-1 (рис. 1 в), R35 (рис. 1 и), W1 (рис. 1 і) – 3-го (6,0–7,9 см) класів. Рослини генотипу G/D12-2a (рис. 1 б) мають домінуючі 2–4 класи довжини листків (4,0–9,9 см).

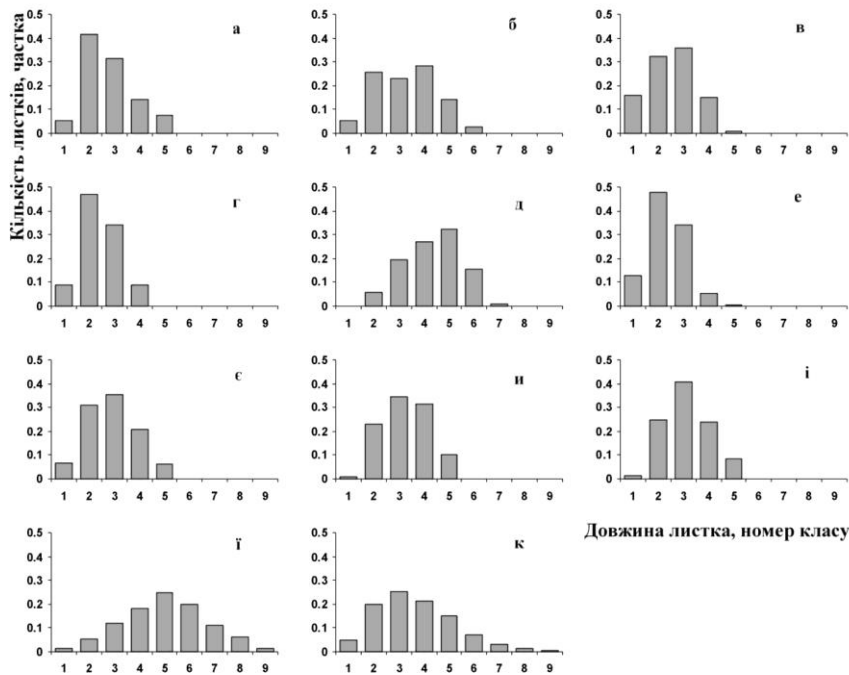


Рис. 1. Розподіли за довжиною листка рослин досліджених генотипів *D. antarctica* за умов стандартизованого вирощування *in vitro*: а – G/D4-1, б – G/D12-2а, в – G/D12-1, г – Y62, д – Y66, е – Y67, є – S22, и – R35, і – W1, ї – DAR12, к – L59. Класи за довжиною листка, см: 1 – <3,9; 2 – 4,0 – 5,9; 3 – 6,0 – 7,9; 4 – 8,0 – 9,9; 5 – 10,0 – 11,9; 6 – 12,0 – 13,9; 7 – 14,0 – 15,9; 8 – 16,0 – 17,9; 9 – >18,0 см.

Виявлена мінливість добре співвідноситься з показаною раніше гетерогенністю морфометричних параметрів у природних популяціях *D. antarctica* [7]. Загалом габітус та морфометричні характеристики рослин *D. antarctica* дуже залежать від мікроумов зростання. Майже в кожній популяції району Аргентинських островів вдається відшукати дрібні рослини, які зростають на відкритих ділянках та більші за розміром, з довшими листками, які ховаються в розщелинах скель та захищені від вітрів. Проте в цьому випадку гетерогенність спостерігали у рослин, вирощуваних у стандартизованих умовах *in vitro*.

За вмістом флавоноїдів досліджених рослин в умовах *in vitro* також виявили значні відмінності (табл.). Найбільшу кількість флавоноїдів виявлено в листках диплоїдних рослин генотипу L59. Рослини генотипу DAR12 (із додатковими 1-3 В-хромосомами) мали найнижчий показник за вмістом флавоноїдів.

Проведено аналіз усіх наборів попарних порівнянь рослин за трьома аналізованими показниками: $|\Delta Gs| - |\Delta Ph|$, $|\Delta Gs| - |\Delta Fl|$, $|\Delta Fl| - |\Delta Ph|$ за допомогою методу екстремального групування, як описано в [13]. Їх розділено на групи з позитивною та негативною кореляцією за вико-

ристання регресійної техніки. Після розподілу по групах визначено ймовірність потрапляння кожного генотипу в одну з двох груп. Побудовано схеми ймовірнісних зв'язків розміру геному та двох аналізованих показників пристосованості (рис. 2).

Отримані результати демонструють специфіку зв'язку між таким інтегральним показником, як розмір геному, та показниками пристосованості: розміром листків та вмістом флавоноїдів у рослин *D. antarctica*. Слід підкреслити, що рослини, отримані з насіння різних популяцій, а вирощували їх в однакових умовах. Зокрема, виявлено виразні відмінності між більшістю диплоїдних генотипів та генотипами з хромосомним поліморфізмом. Так, диплоїдні генотипи (обведені овалами) характеризувалися синхронністю зв'язку між змінами розміру геному та обох досліджених показників пристосованості. Оцінку характеру зв'язку дає аналіз трикутника, утвореного лініями, які позначають ймовірнісні зв'язки між парами досліджених параметрів $|\Delta Gs| - |\Delta Ph|$, $|\Delta Gs| - |\Delta Fl|$, $|\Delta Ph| - |\Delta Fl|$. Знак при значенні ймовірності потрапляння в «позитивну» групу свідчить про синхронний – позитивний зв'язок (+, збільшення одного параметра супроводжується збільшенням іншо-

го) чи «негативну» – асинхронний – негативний зв'язок (-, збільшення одного параметра характеризується зменшенням іншого). Що стосується рослин генотипу Y66, який є гіпотриплоїдом, то, на відміну від рослин генотипів диплоїдних, для перших двох пар характеристик для нього характерні негативні ймовірнісні зв'язки. Це означає, що збільшення розміру геному у представників цього генотипу викличе зменшення довжини листка з ймовірністю 0,6 та вмісту флавоноїдів з ймовірністю 0,7, тоді як відношення між довжиною листка і вмістом флавоноїдів може бути в половині випадків позитивними, а в

іншій половині – негативними. Подібна картина спостерігається у випадку генотипу DAR12, але відміна полягає у тому, що ймовірнісний зв'язок між вмістом флавоноїдів та довжиною листка в цього генотипу є негативним (-0,7) на відміну від розглянутих вище диплоїдів та гіпотриплоїда. За умов стандартизованого культивування, коли клоновані рослини за молекулярними і хромосомними маркерами були стабільними [14], виявлена ситуація може свідчити про вирішальне значення складової «розмір геному».

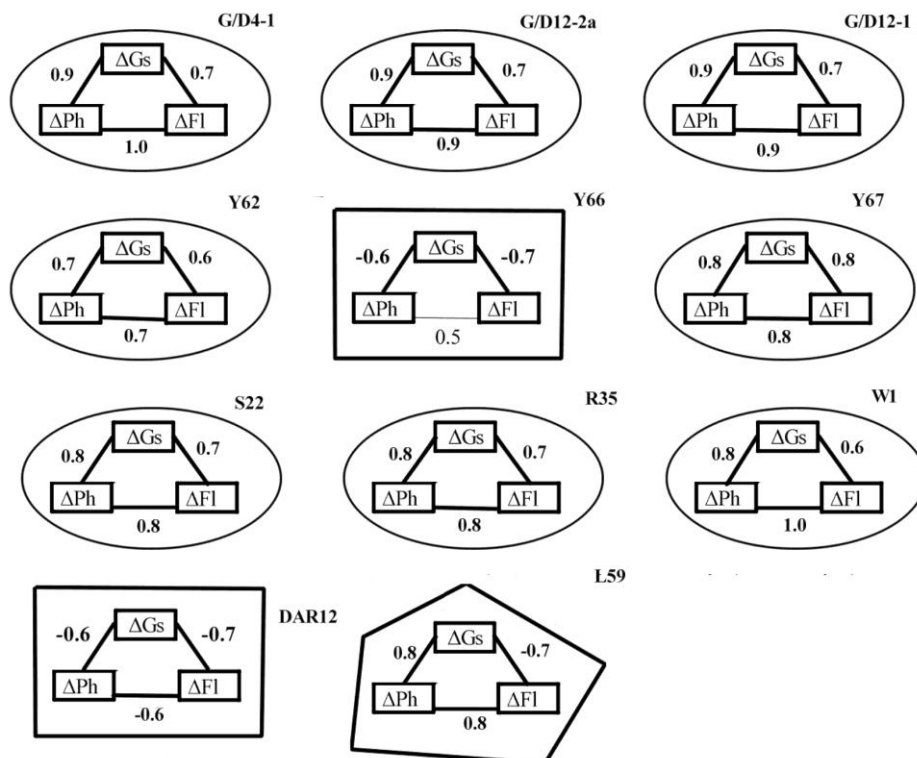


Рис. 2. Схема ймовірнісних зв'язків між розміром геному, розмірами листків та вмістом флавоноїдів рослин *D. antarctica* за умов стандартизованого вирощування *in vitro*. Цифрами позначено ймовірність для кожного генотипу синхронності (+) або асинхронності (-) процесів, які описуються порівнюваними рядами даних. Овалами обведено генотипи (усі диплоїдні), які мають позитивні ймовірнісні зв'язки, прямокутниками – генотипи, які мають три або два негативні зв'язки (диплоїд з В-хромосомами DAR12 і гіпотриплоїд Y66), диплоїдний генотип L59, який має лише один негативний ймовірнісний зв'язок – п'ятикутником.

Проте у диплоїдній рослині генотипу L59, який містить у листках найбільшу кількість флавоноїдів (табл.), ми спостерігали унікальну картину: показник розміру геному в цього генотипу мав позитивний зв'язок із характеристикою розмір листків, він же мав негативний зв'язок з показником вмісту флавоноїдів. При цьому показники вмісту флавоноїдів та довжини листка мали між собою позитивний зв'язок.

З чим може бути пов'язана така картина саме в диплоїдного генотипу L59? Не можна заперечувати, що окрім розміру геному на досліджені зв'язки впливає також результат тривалої адаптації до різних (індивідуальних) умов існування в районі Аргентинських островів (Морська Антарктика). Зв'язок між змінами у геномі та досліджених параметрів – розмір листків та вміст флавоноїдів – може здійснюватися за допомо-

гою потоків сигналів. Такими сигнальними молекулами в ауксиновому обміні, який відповідає за ріст рослини, є флавоноїди. Темпи росту рослин і їхніх органів контролюються ауксином (індоліл-3-оцтовою кислотою – ІОК), а флавоноїди є регуляторами ауксинового обміну [15]. Їх вплив на процеси адаптації судинних рослин Антарктики потребує детальнішого вивчення.

Висновки

Розмір геному (пропорційний числу хромосом) у рослин *Deschampsia antarctica* впливає на його ймовірнісні зв'язки з такими ознаками пристосовуваності, як довжина листка та вміст флавоноїдів.

Література

1. Andreev I.O., Spiridonova E.V., Kyryachenko S.S., Parnikozha I.Yu., Maidanyuk D.N., Volkov R.A., Kozeretska I.A., Kunakh V.A. Population-genetic analysis of *Deschampsia antarctica* E. Desv. from two regions of maritime Antarctic // Moscow University Biological Sciences Bulletin. – 2010. – V. 65, N 4. – P. 208–210.
2. Volkov R.A., Kozeretska I.A., Kyryachenko S.S., Andreev I.O., Maidanyuk D.N., Parnikozha I.Yu., Kunakh V.A. Molecular evolution and variability of ITS1–ITS2 in populations of *Deschampsia antarctica* E. Desv. from two regions of the maritime Antarctic // Polar Science. – 2010. – V. 4, N 3. – P. 469–478.
3. Navrotska D.O., Twardovska M.O., Andreev I.O., Parnikozha 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. – № 13. – P. 185–191.
4. 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. – V. 10, № 9. – e0138878. doi: 10.1371/journal.pone.0138878.
5. Causton D.R., Venus J.C. The Biometry of Plant Growth. Edward Arnold, London, 1981. – 307 p.
6. Dietz H., Steinlein T. Determination of plant species cover by means of image analysis // Journal of Vegetation Science. – 1996. – V. 7. – p. 131–136. doi: 10.2307/3236426.
7. Parnikozha I., Miryuta N., Ozheredova I., Kozeretska I., Smykla J., Kunakh V., Convey P. Comparative analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. population adaptability in the natural environment of the Admiralty Bay region (King George Island, maritime Antarctic) // Polar Biology. – 2015. – V. 38, No. 9. – P. 1401–1411.
8. Zahrychuk O.M., Drobyk N.M., Kozeretska I.A., Parnikozha I.Yu., Kunakh V.A. Introduction in culture *in vitro* of *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) from two regions of Maritime Antarctica // Ukrainian Antarctic Journal. – 2011/2012. – № 11. – P. 289–295.
9. Bai C., Alverson W.S., Follansbee A., Waller D.M. New reports of nuclear DNA content for 407 vascular plant taxa from the United States [Електронний ресурс] // Annals of Botany – 2012. – V. 110, No 8. – P. 1623–1629. doi: 10.1093/aob/mcs222. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3503501/>.
10. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. – Л., 1987. – 191 с.
11. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики. – Москва: Финансы и статистика, 1982. – 344 с.
12. Айвазян С.А., Бухштабер В.М., Енюков И.С., Мешалкин Л.Д. Прикладная статистика. Классификация и снижение размерности. – М.: Финансы и статистика, 1989. – 606 с.
13. Мірюта Н., Пороннік О., Парнікоза І., Грахов В., Мирюта Г., Козуб Н., Созинов І., Кунах В. Збереження унікальності за комплексною пристосовуваністю різних генотипів *Deschampsia antarctica* Desv. в умовах стандартизованого вирощування рослин *in vitro* // Український Антарктичний Журнал. – 2016. – № 15. – С. 60–80.
14. Спірідонова К.В., Андреев І.О., Загрічук О.М., Навроцька Д.О., Твардовська М.О., Дробик Н.М., Кунах В.А. Генетична стабільність отриманих мікроклональним розмноженням рослин *Deschampsia antarctica* Desv. за тривалого культивування *in vitro* // Физиология растений и генетика. – 2016. – Т. 48, № 6. – С. 498–507.
15. Макаренко О.А., Левицкий А.П. Физиологические функции флавоноидов в растениях // Физиология и биохимия культурных растений. – 2013 – Т. 45, № 2. – С. 100–112.

Автори висловлюють подяку Національному антарктичному науковому центру Міністерства освіти та науки України, Національній науковій фундації (NSF) США, проф. В. Поліщуку, к. б. н. І. Дикому, В. Папіташвілі, В. Смаголю та О. Салганському. Це дослідження виконане в рамках співпраці між Національним антарктичним науковим центром МОН України та Інститутом молекулярної біології і генетики НАН України в рамках Державної цільової науково-технічної програми проведення досліджень в Антарктиці на 2011–2020 рр., а також спільного проекту між НАН України і Польською академією наук: «Адаптивні стратегії взаємовиживання організмів в екстремальних умовах довкілля», 2015–2017 рр.

**PARNIKOZA I.Yu.¹, MIRYUTA N.Yu.¹, ROJEK M.², BETEKHTIN A.A.², PORONNIK O.O.¹,
MYRYUTA G.Yu.¹, NAVROTSKA D.O.¹, HASTEROK R.², KUNAKH V.A.¹**

¹ *Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: ivan.parnikoza@gmail.com*

² *University of Silesia in Katowice,
Poland, 40-032, Katowice, Jagiellonska str., 28*

DESCHAMPSIA ANTARCTICA E. DESV. PLANTS WITH DIFFERENT CHROMOSOME NUMBER CULTIVATED IN VITRO. RELATIONS BETWEEN GENOME SIZE AND TWO ADAPTABILITY INDICES

Aim. We would have researched probabilistic relations between genome size and two adaptability indices in eleven genotypes revealed in seeds germ of *Deschampsia antarctica* E. Desv. which has different genome size under standardized cultivation condition *in vitro*. **Methods.** We have used biochemical method for determination of flavonoid contents in plant leaves and flow cytometry analysis for determination of genome size in plant leaves. **Results.** Eleven genotypes of *Deschampsia antarctica* with different genome size have been researched by three data rows. Probabilistic scheme have been created and analyzed for all researched genotypes. **Conclusions.** The *Deschampsia antarctica* genome size or karyotype changes have been shown to have effect on its probabilistic relations with flavonoids content and leaf length. Mechanisms of such relations is required a detailed research.

Keywords: *Deschampsia antarctica*, genome size, leaf length, flavonoids.