

ПОРОННИК О.О.¹, ПАРНИКОЗА І.Ю.¹✉, МІРЮТА Н.Ю.¹, МІРЮТА Г.Ю.¹, **ГРАХОВ В.П.**²,
НАВРОЦЬКА Д.О.¹, КУНАХ В.А.¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: oksana_poronnik@ukr.net

² Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України,

Україна, 01014, м. Київ, вул. Тимірязєвська, 1

✉ ivan.parnikoza@gmail.com

РОСЛИНИ *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* E. DESV. З РІЗНИМ ЧИСЛОМ ХРОМОСОМ В УМОВАХ ВИРОЩУВАННЯ *IN VITRO*. ДОВЖИНА ЛИСТКІВ ТА ВМІСТ ФЛАВОНОЇДІВ У КУЛЬТУРИ *IN VITRO* ТА В ПРИРОДІ

Дослідження *Deschampsia antarctica* E. Desv. – одного з двох видів судинних рослин найекстремальнішого регіону нашої планети Антарктики – виявили наявність у них пристосованості до різних абіотичних факторів стресу за допомогою координації реакцій організму. При цьому відбувається взаємодія окремих механізмів адаптації, кінцевим результатом якої є утворення комплексної пристосованості [1]. В процесі дослідження комплексної пристосованості рослин *Deschampsia antarctica* такі параметри пристосованості, як довжина листка [2] та вміст флавоноїдів у листках, характеризувалися значною мінливістю. Зважаючи на це та виявлення в Морській Антарктиці різних хромосомних форм *D. antarctica* [3, 4], перспективним було вивчити зв'язок між обома параметрами пристосованості та їх залежність від каріотипу в умовах культури *in vitro* та у вихідних рослин із природних популяцій.

Матеріали і методи

Вивчали рослини 11 генотипів, вирощувані (клоновані) в умовах *in vitro*, перелік яких, їх хромосомні числа та коротка характеристика місць збору вихідного насіння представлено в таблиці 1. Дані, що стосуються цих рослин порівнювали із результатами вивчення рослин у природі з відповідних популяцій у місцях їх природного зростання у Морській Антарктиці.

Дослідні рослини вирощували *in vitro* на живильному середовищі В5 у світловій кімнаті при освітленні близько 6500 люкс, температурі 18–20°C та вологості 80 %. Для досліду кожен вихідну рослину 70–75-го пасажу розклоновували на 3–5 рослин і вирощували на тому самому середовищі протягом місяця. В умовах культури *in vitro* рослини представлені короткими

пагонами, вкритими довгими лінійними листками. Зважаючи на це, органом, який вивчали, були листки цих рідко квітучих в умовах культури *in vitro* рослин.

У цьому дослідженні вивчено розподіли за ознакою «довжина листка» та спектри флавоноїдів листків рослин різних генотипів. Параметр довжини листка вивчали як характеристику віталітету рослин. Кількість флавоноїдів за рутинном у листках визначали, як описано в [5]. Профілювання флавоноїдів листків проводили методом обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії [6]. Порівнювали отримані дані для рослин *in vitro* та рослин, що зростали у природних умовах в Антарктиці.

Результати та обговорення

Середнє значення довжини листків у рослин досліджених генотипів *D. antarctica* в стандартизованих умовах *in vitro* в порівнянні з аналогічним показником із природних популяцій (із місць походження оригінального насіння) представлено в таблиці 2. Помітно високу гетерогенність цього показника у культивованих рослин та дещо меншу мінливість у природних популяціях. У природних умовах листя загалом є значно коротшим. Серед рослин *in vitro* найдовші листки мали рослини диплоїдного генотипу, що містить 1-3 В-хромосоми (DAR12), та рослини з гіпотриплоїдним числом хромосом (Y66).

Дослідження показало, що культивовані рослини мають спектр флавоноїдів, подібний до такого у вихідних рослин (рис. 1). Проте кількісний вміст у культивованих *in vitro* рослин був дещо нижчим. За вмістом флавоноїдів (за рутинном) культивовані рослини різних генотипів також виявили значні відмінності (рис. 2). Най-

© ПОРОННИК О.О., ПАРНИКОЗА І.Ю., МІРЮТА Н.Ю., МІРЮТА Г.Ю.1, **ГРАХОВ В.П.**, НАВРОЦЬКА Д.О., КУНАХ В.А.

більша кількість флавоноїдів характерна для генотипу *D. antarctica* L59 з диплоїдним набором хромосом, тоді як генотип DAR12 з В-хромосомами мав найнижчий показник за вмістом флавоноїдів.

Виявлена мінливість за вмістом флавоноїдів у досліджених рослин *D. antarctica*, що зростають в умовах *in vitro*, співвідноситься з показаною вище гетерогенністю за довжиною листка (табл. 2). З чим це може бути пов'язано? З літератури відомо, що існує взаємозалежність між продукцією фенольних сполук та морфометричними показниками [7]. Зокрема, довжину листків регулюють ауксини, а синтез ауксинів у рослині у відповідь на дію ультрафіолету регулюють флавоноїди. Так, флавоноїд лютеолін ви-

ступає синергістом ауксину β -індолілоцтової кислоти (ІОК), внаслідок чого ріст листків стимулюється. Інший флавоноїд – апігенін виробляється під дією ультрафіолету і є кофактором ферменту ІОК-оксидази, а відповідно, є антагоністом ІОК. Внаслідок їх спільного впливу листки рослини є коротшими [8].

Таким чином, можна припустити, що в природних умовах у рослин *D. antarctica* домінує синтез апігеніну, внаслідок чого листки коротші, а в рослин за умов культивування *in vitro* і відсутності значного впливу ультрафіолету накопичується значно менше апігеніну, що сприяє їх росту (рис. 2).

Таблиця 1. Локалізація популяцій, де було зібрано насіння, з якого одержано дослідні культивовані *in vitro* рослини (генотипи) та їх хромосомні числа

№	Генотип	Локалізація, сезон збору насіння	Хромосомний набір, 2n
1	G/D4-1	о. Галіндез, S 65°14.916', W 64° 14.293', 2012/13	26
2	G/D12-2a	о. Галіндез S 65°14.845', W64°15.156', 2006/07	26
3	G/D12-1	о. Галіндез, S 65°14.845', W 64°15.156', 2013/14	26
4	Y62	о. Великий Ялур, S 65°14.039' W 64°09.761', 2004/05	26
5	Y66	о. Великий Ялур, S 65°14.039' W 64°09.761', 2004/05	36, 38, 39
6	Y67	о. Великий Ялур, S 65°14.039' W 64°09.761', 2004/05	26
7	S22	о. Скуа, мис Фінгер S 65°15.296', W 64°16.441', 2007/08	26
8	R35	мис Расмуссен, S 65°14.819', W 64°5.156', 2004/05	26
9	W1	о. Вінтер, S 65°14.851', W 64°15.482', 2013/14	26
10	DAR12	о. Дарбо, S 65°23.707', W 64°12.905', 2006/07	26+1-3В
11	L59	о. Лейхіл, S 65°33.167', W 64°23.249', 2009/10	26

Таблиця 2. Середня довжина листків у рослин *D. antarctica* в умовах *in vitro* та в природі

Назва генотипу	Кількість досліджених		Середнє значення довжини листків $\pm S_d$, см		
	рослин	листоків	рослин <i>in vitro</i>	рослин у природі, сезон 2013/14 рр.	рослин у природі, сезон 2015/16 рр.
G/D4-1	55	404	6,6 \pm 0,3	3,0 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1
G/D12-2a	14	79	7,6 \pm 1,0	4,9 \pm 0,1	3,0 \pm 0,1
G/D12-1	39	231	6,1 \pm 0,2	4,9 \pm 0,1	3,0 \pm 0,1
Y62	48	276	5,9 \pm 0,1	5,3 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1
Y66	26	192	9,7 \pm 0,9	5,3 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1
Y67	40	285	5,7 \pm 0,1	5,3 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1
S22	21	150	6,6 \pm 0,2	3,4 \pm 0,1	-
R35	20	109	8,9 \pm 1,2	6,9 \pm 0,5	4,7 \pm 0,1
W1	28	199	7,3 \pm 0,5	4,44 \pm 0,01	-
DAR12	20	138	11,1 \pm 0,7	-	3,5 \pm 0,2
L59	38	307	8,4 \pm 0,5	-	-

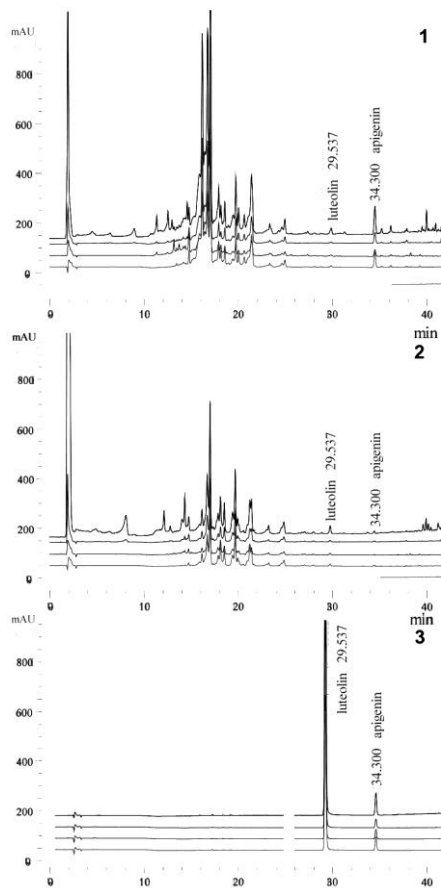


Рис. 1. Хроматографічні профілі екстрактів листків *D. antarctica*: 1 – рослина з природних умов Аргентинських островів (площадка D12), 2 – рослина генотипу G/D12-2a, культивована в стандартизованих умовах *in vitro*, 3 – стандарти флавоноїдів лютеоліна та апігеніна. Піки, що відповідають речовинам з 12-ї до 22-ї хв, відносять до глікозидів лютеоліна.

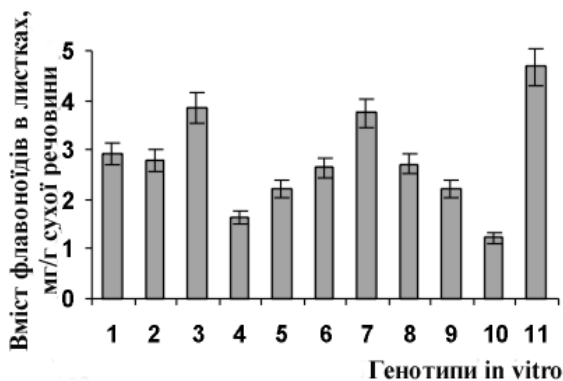


Рис. 2. Вміст флавоноїдів у листках *D. antarctica* за їх вирощування в умовах *in vitro*: 1 – G/D4-1, 2 – G/D12-2a, 3 – G/D12-1, 4 – Y62, 5 – Y66, 6 – Y67, 7 – S22, 8 – R35, 9 – W1, 10 – DAR12, 11 – L59.

У той же час, як показує наше дослідження, як довжина листка, так і вміст флавоноїдів пов'язані з каріотипом досліджених рослин. Відомо, що міксоплоїдні рослини з такими формами хромосомної мінливості як поліплоїдія, анеуплоїдія та наявність В-хромосом одночасно характеризуються відмінностями на морфометричному та біохімічному рівні [9]. Вплив кількості хромосом у соматичних клітинах на їх функціональний статус добре відомий [10]. Зміни в кількості хромосом можуть викликати і серйозні негативні ефекти на рівні статевої репродукції. Зокрема, показано, що хромосомні варіації можуть бути пов'язані з явищем живородіння в арктичного виду щучника *D. alpina* (L.) Roem. & Schult [11]. Тетраплоїдні раси *D. caespitosa* (L.) P. Beauv. вважаються більш адаптованими до специфічних умов зростання [12]. Вважається, що гетерохроматинові ділянки і В-хромосоми можуть контролювати адаптацію рослин до умов середовища [9]. Взаємозв'язок між вмістом ДНК, проективним покриттям та морфометрією показано для природних популяцій *D. antarctica* [2].

Спільним фактором для формування дослідженої каріотипової, морфологічної та біохімічної гетерогенності може виступати тривалий вплив різноманіття середовища існування антарктичних рослин. Зокрема, в умовах Аргентинських островів спостерігається гетерогенність місцезростань за часом утворення, умовами зростання (відсутність чи присутність орнітогенного впливу), а також ступенем оптимальності середовища для існування (від найбільш оптимальних до крайових умов). Імовірно, накопичений у процесі тривалої адаптації набір генетичних та епігенетичних факторів зберігається у культивованих *in vitro* рослин та забезпечує їх гетерогенність, виявлену в нашому дослідженні. Вищевказане не тільки дозволяє врахувати вихідну гетерогенність в наступних модельних експериментах, але й виявити генотипи як особливо адаптовані до змінних умов існування, так і перспективні з точки зору продукції важливих вторинних метаболітів, цінних у практичних цілях [13].

Висновки

У рослин досліджених генотипів *D. antarctica* з різним числом хромосом за умов стандартизованого вирощування *in vitro* виявлено значно довші листки, ніж у рослин із приро-

дних популяцій. Показник довжини листків варіює залежно від каріотипу рослини: найдовшими були листки у гіпотриплоїда і у диплоїда з додатковими В-хромосомами. Культивовані рослини мають аналогічний природним рослинам спектр флаваноїдів, проте кількісний вміст був дещо нижчим у рослин, вирощених в умо-

вах *in vitro*. У рослин із відмінним від диплоїдного числа набором хромосом вміст флаваноїдів у листках був меншим порівняно з диплоїдами з різних місцезростань.

Автори висловлюють подяку Національному антарктичному науковому центру Міністерства освіти та науки України.

Літератури

1. Lee J., Noh E.K., Choi H.S., Shin S.C., Park H., Lee H. Transcriptome sequencing of the Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* Desv. under abiotic stress. // *Planta*. – 2012. doi: 10.1007/s00425-012-1797-5.
2. Parnikoza I., Miryuta N., Ozheredova I., Kozheretska 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.
3. Navrotska D.O., Twardovska M.O., Andreev I.O., Parnikoza I.Yu., Betekhtin A.A., Zahrychuk O.M., Drobyk N.M., Hasterok R., Kunakh V.A. New forms of chromosome polymorphism in *Deschampsia antarctica* Desv. from the Argentine Islands of the Maritime Antarctic region // *Ukrainian Antarctic Journal*. – 2014. – № 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. Методи біохімічного дослідження рослин / Под ред. А.И. Ермакова. – Л., 1987. – 191 с.
6. Dictionary of Natural Products, ver.15. Chapman & Hall/CRC, 2007. Hampden Data Services Ltd. Dictionary of Natural Products, ver. 22.2. Taylor & Francis Group, 2014 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://dnp.chemnetbase.com>.
7. Lambers H., Chapin III S.F., Pons T.L. Plant Physiological Ecology. – Springer-Verlag New York – 2008. – 223 p.
8. The Science of flavonoids / [Ed. by E. Grotewold]. – New York: Springer Science, 2006. – 273 p.
9. Кунах В.А. Додаткові або В-хромосоми рослин. Походження і біологічне значення // Вісник Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2010. – Т. 8, № 1. – С. 99–140.
10. Кунах В.А. Жебраковские чтения. III. Онтогенетическая пластичность генома как основа адаптивности растений / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; отв. ред. А.В. Кильчевский. – Минск. Право и экономика, 2011. – 56 с.
11. Nygren A. Studies on vivipary in the genus *Deschampsia* // *Hereditas*. – 1949. – 35. – P. 27–32.
12. Nkongolo K.K., Deck A., Michael P. Molecular and cytological analyses of *Deschampsia caespitosa* populations from Northern Ontario (Canada) // *Genome*. – 2001. – 44 (5). – P. 818–825.
13. Gidekel M., Weber H., Cabrera G., Gutiérrez A., Osorio J., Podhajcer O., Cafferata E., Sunkel C., Mihovilovic I. Extracts of *Deschampsia antarctica* Desv. with antineoplastic activity. *Uxmal SA Chile July 2011: US 20110177178*.

PORONNIK O.O.¹, PARNIKOZA I.Yu.¹, MIRYUTA N.Yu.¹, MYRYUTA G.Yu.¹, GRAHOV V.P.², NAVROTSKA D.O.¹, 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: oksana_poronnik@ukr.net

² M.M. Gryshko National Botanical Garden, Ukraine, 01014, Kyiv, Tymeryazivska str., 1

DESCHAMPSIA ANTARCTICA E. DESV. PLANTS WITH DIFFERENT CHROMOSOME NUMBER CULTIVATED IN VITRO. PLANTS LENGTH AND FLAVONOIDS IN IN VITRO CULTURE AND IN NATURE

Aim. The aim of this work is to research two adaptability indices (leaf length and flavonoid content and spectrum) in eleven genotypes revealed in seeds germ of *Deschampsia antarctica* E. Desv. in standardized cultivation condition *in vitro*. Then these adaptability indices would compare with the same for native populations. **Methods.** We have used biochemical method for determination of flavonoid contents in plant leaves, HPLC method for research of flavonoid spectrum in plant leaves. **Results.** Heterogeneity of leaf length and flavonoid content has been shown. Both parameters difference have been detected in comparison with native populations. Flavonoid spectrum has no difference in comparison with native populations. **Conclusions.** *Deschampsia antarctica* genotypes under standardized cultivation condition *in vitro* have had longer leaves than plants in nature populations. Length of the leaves was varied depending on karyotype of corresponding genotype. Cultivated plants have had flavonoid spectrum similar to the same plants in nature. This fact allows to assume plants *in vitro* possible producent of secondary metabolites.

Keywords: *Deschampsia antarctica*, leaf length, flavonoids, chromosome number.