

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

**НАВРОЦЬКА Дар'я Олександрівна**

УДК 575.22: 582.923.1 + 576.5

**МІНЛИВІСТЬ ГЕНОМУ *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* E. DESV. У  
ПРИРОДІ ТА В КУЛЬТУРІ *IN VITRO***

03.00.22 – молекулярна генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

КИЇВ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

**Науковий керівник** доктор біологічних наук, професор,  
член-кор. НАН України  
**Кунах Віктор Анатолійович**,  
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
завідувач відділу генетики клітинних популяцій.

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Терновська Тамара Костянтинівна**,  
Національний університет «Києво-Могилянська  
Академія», завідувач кафедри біології;

доктор біологічних наук,  
провідний науковий співробітник  
**Дубровна Оксана Василівна**,  
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,  
провідний науковий співробітник відділу генетичного  
поліпшення рослин.

Захист відбудеться “27” березня 2018 року о 10-30 на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03143.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: вул. Заболотного, 150, 03143, м. Київ.

Автореферат розіслано “\_\_” \_\_\_\_\_ 2018 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
к.б.н., с.н.с.



І.В.Крупська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Згідно з концепцією про край ареалу виду чи моделлю «рясного центру», географічно-периферійним популяціям організмів притаманний низький рівень генетичного різноманіття і високі показники генетичної диференціації, порівняно із популяціями з центральних частин ареалу (Sagarin, Gaines, 2002; Eckert et al., 2008). Водночас, в маргінальних популяціях, які зазнають впливу нетипових екологічних умов, можуть відбуватися інтенсивні процеси видоутворення, які сприяють виникненню і підтриманню біологічного різноманіття (Grant, 1981; Kirkpatrick, Barton, 2014). Нові форми чи навіть види організмів на краю ареалу можуть виникати внаслідок мінливості геному за дії інтенсивного тиску добору під впливом умов навколишнього середовища (Belyayev, Raskina, 2013).

Рослини, що є невід'ємною частиною всіх екосистем, ведуть прикріплений спосіб життя, тому в процесі еволюції в них виробились специфічні механізми адаптації до різних умов існування. Деякі види здатні виживати в регіонах малоприсаєданих для нормального існування (при екстремально високих значеннях температури, УФ-радіації, обмеженому доступі води, засоленні ґрунтів та дії інших стресорів) (Yang, 2016). Адаптація рослинного організму до умов довкілля може відбуватися за рахунок зміни фізіологічних функцій за умови, що стресові чинники не перевищують норму реакції. Це забезпечується змінами в біохімічних процесах, які регулюють активність метаболізму. У випадку, коли регуляторні системи рослини не спроможні компенсувати дію зовнішніх стресових факторів, може відбуватись активація генетичної мінливості, яка є основою для появи нових ознак. Ці механізми діють на рівні окремого організму, але проявляються й на рівні популяції у вигляді зростання генетичної гетерогенності (Gomulkiewicz, 2013; Ellegren, Galtier, 2016).

На особливий інтерес заслуговує антарктична екосистема, що є моделлю для вивчення адаптації організмів до полярних екстремумів. Антарктика – єдиний ізольований континент з найекстремальнішими кліматичними умовами на планеті. Наземні організми Антарктики, завдяки існуванню на межі можливостей, можуть бути індикатором впливу кліматичних змін. Тому, дослідження мінливості геному типових для Антарктики видів рослин має значне фундаментальне значення. Одним із двох видів судинних рослин, що адаптувались до суворих умов існування, є щучник антарктичний чи *Deschampsia antarctica* E. Desv. Це унікальний вид для вивчення механізмів, що відповідають за пристосування рослинного організму (завдяки змінам геному) до навколишніх несприятливих умов. Крім того, геном *D. antarctica*, який досі малодосліджений, може бути цінним джерелом генів, пов'язаних із

стійкістю та адаптацією до низьких температур, посухи, високого рівня УФ-випромінювання, існування на засолених чи надмірно зволжених ґрунтах.

Відомо, що зовнішні стресорні чинники можуть створювати умови для виникнення структурних перебудов геному рослин, що проявляються у зміні хромосомного числа (міксо-, анеу- та поліплоїдії, появі В-хромосом), морфології та диференційного забарвлення хромосом, а також мінливості послідовностей ДНК (Кунах, 2011, 2013). Тому, актуальним є вивчення особливостей мінливості геному *D. antarctica* з південного краю ареалу виду в Морській Антарктиці на хромосомному та молекулярно-генетичному рівнях.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційну роботу виконано у відділі генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України відповідно до державних бюджетних тем «Вивчення генетичного поліморфізму і пластичності геному рослин в екстремальних умовах довкілля» (номер держреєстрації 0110U000689, 2010-2015 рр.) та «Мінливість геному рослин в екстремальних умовах зростання» (номер держреєстрації 0115U003743, 2016-2020 рр.), а також у рамках проекту «Вивчення динаміки показників адаптивності наземних рослинних угруповань Антарктики в умовах кліматичних змін» (номер держреєстрації 0115U001966, 2015 р.) Національного антарктичного наукового центру МОН України.

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи було дослідити особливості структури та мінливості геному на цитогенетичному та молекулярно-генетичному рівнях у щучника антарктичного (*Deschampsia antarctica* E. Desv.) з регіону Аргентинських островів Морської Антарктики.

Відповідно до мети було поставлено такі завдання:

- 1) визначити число хромосом у рослин *D. antarctica* з регіону Аргентинських островів Морської Антарктики;
- 2) визначити розмір геному рослин методом проточної цитофлуориметрії;
- 3) дослідити генетичний поліморфізм рослин за допомогою ISSR- та IRAP-ПЛР аналізу;
- 4) встановити хромосомну локалізацію генів 5S рРНК і 45S рРНК, теломерних і центромерних повторів за допомогою молекулярного каріотипування;
- 5) вивчити особливості генетичної мінливості у рослин за мікроклонального розмноження та тривалого культивування *in vitro*;
- 6) з'ясувати особливості генетичної мінливості в калюсних тканинах *D. antarctica*;
- 7) дослідити соматоклональну мінливість у рослин-регенерантів *D. antarctica*.

**Об'єкт дослідження** – геном рослини *D. antarctica*.

**Предмет дослідження** – мінливість геному *D. antarctica* в природі та індукована культивуванням в умовах *in vitro*.

**Методи дослідження:** культивування рослинних тканин *in vitro*, цитогенетичний аналіз, диференційне забарвлення хромосом, флуоресцентна *in situ* гібридизація (FISH), проточна цитофлуориметрія, виділення ДНК, ПЛР аналіз, електрофорез ДНК в агарозному гелі, методи статистичного аналізу даних.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Для виду *D. antarctica* вперше проведено комплексне дослідження мінливості геному на хромосомному та молекулярному рівнях:

- встановлено хромосомне число для рослин з регіону Аргентинських островів Морської Антарктики (район Української антарктичної станції «Академік Вернадський»), що знаходиться на південному краю ареалу виду;
- знайдено нові хромосомні форми – рослини з гіпотриплоїдним набором хромосом, міксоплоїдні та з В-хромосомами;
- визначено розмір геному (2C/пг) рослин з різним числом хромосом;
- проведено порівняльний молекулярно-генетичний аналіз рослин з різним числом хромосом та показано їхню генетичну подібність;
- встановлено хромосомну локалізацію генів 5S рРНК і 45S рРНК, теломерних і центромерних повторів у геномі рослин з різним числом хромосом за допомогою методу флуоресцентної *in situ* гібридизації;
- показано генетичну стабільність рослин з різним числом хромосом на хромосомному і молекулярному рівнях за тривалого мікроклонального розмноження;
- проведено цитогенетичний аналіз калюсних культур і непрямих регенерантів, отриманих від рослин з різним числом хромосом, і показано домінування клітин із диплоїдним та біядиплоїдним числом хромосом.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані результати є складовою частиною комплексної оцінки стану рослинності в Антарктичному регіоні, яка проводиться в рамках Державної цільової науково-технічної програми проведення досліджень в Антарктиці протягом 2011-2020 рр., і складають основу для подальшого моніторингу стану антарктичних екосистем за впливу людської діяльності та кліматичних змін в антарктичному регіоні.

Використання цитогенетичних, молекулярних та біотехнологічних підходів дозволяє застосувати отримані дані щодо особливостей мінливості і добору в популяціях рослин *D. antarctica* як основи адаптації організмів, а

також вивчати пристосування природних, модельних і штучних клітинних систем до екстремальних умов існування.

Створена колекція генотипів рослин *in vitro* та калюсних культур *D. antarctica* є перспективним модельним об'єктом для подальших молекулярно-генетичних досліджень. Разом з тим, культура тканин виду може бути використана як джерело для пошуку біологічно-активних речовин та інших біотехнологічних розробок.

Наукові висновки роботи можуть становити інтерес для науково-дослідних установ та вищих навчальних закладів при викладанні лекційних курсів, проведенні лабораторно-практичних робіт з дисциплін «Генетика» та «Генетика популяцій» для студентів біологічних та екологічних спеціальностей.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням Навроцької Д.О. Наведені в рукописі результати отримано здобувачем особисто або за безпосередньої участі у виконанні експериментів. Роботу по культивуванню рослинного матеріалу в умовах *in vitro* проведено у співробітництві з лабораторією екології та біотехнології Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Результати молекулярно-цитогенетичного аналізу отримано разом з к.б.н. Твардовською М.О., а також у співробітництві з відділом анатомії і цитології рослин Сілезького університету (Катовіце, Польща). Дані молекулярно-генетичного аналізу отримані разом з с.н.с., к.б.н. Андрєєвим І.О. та с.н.с., к.б.н. Спірідоновною К.В. Результати досліджень опубліковано у спільних наукових працях. Автором проаналізовано сучасну зарубіжну та вітчизняну літературу за темою наукового дослідження. Обговорення результатів досліджень дисертаційної роботи проведено спільно із науковим керівником – д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України Кунахом В.А., а також із к.б.н., с.н.с. Андрєєвим І.О.

**Апробація результатів дисертації.** Результати роботи представлено на 15-ти конференціях: ІХ Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Умань, 22–26 вересня 2014); І Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених та студентів з міжнародною участю «Сучасні проблеми викладання та наукових досліджень біології у ВНЗ України» (Дніпропетровськ, 9 жовтня 2014); ІХ Conference of Young Scientists the Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine dedicated to 160-th anniversary of M.F. Kastschenko (Kyiv, 26–27 May 2015); 26 International Congress on Polar Research “High latitude and high mountains: driver of or driven by global change?” (Munich, 6–11 September 2015); Х міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» та асоційованому з

конференцією симпозиумі «Геном рослин VII» (Чернівці, 14–18 вересня 2015); V International Conference for Young Scientists “CYS-2015” (Київ, 21–25 September 2015); Ukrainian Society of Cell Biology International Conference «Advances in cell biology and biotechnology» (Lviv, 11–13 October 2015); XII міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 19–21 квітня 2016); X Конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, 24–25 травня 2016); X Parnas Conference and Young Scientist Forum «Molecules in the living cell and innovative medicine» (Wroclaw, 10–12 July 2016); 41-st FEBS Congress «Molecular and system biology for a better life» (Ephesus/ Kusadasi, 3–8 September 2016); «Mind the Gap 5. Bridging the gap between theoretical and empirical population genetics» Conference (Vienna, 30 October–1 November 2016); VIII Міжнародній Антарктичній Конференції, присвяченій 25-річчю приєднання України до Договору про Антарктику (Київ, 16–18 травня 2017); Міжнародній конференції молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології» (Луцьк, 5–10 вересня 2017); EMBO workshop “Evolution in the time of genome architecture” (Naples, 13–15 September 2017), а також доповідались на наукових семінарах відділу генетики клітинних популяцій ІМБіГ НАНУ.

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 20 наукових праць, з яких 7 статей у фахових виданнях, що входять до переліку затвердженого МОН України, та тези 13 доповідей наукових конференцій та конгресів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел. Обсяг роботи – 162 сторінки, включаючи 27 рисунків та 12 таблиць. Перелік цитованої літератури містить 269 найменувань.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ**

В огляді літератури розглянуто особливості мінливості геному соматичних клітин рослин за дії стресових умов, зумовлених зовнішніми і внутрішніми чинниками. Наведено значення поліплоїдії та В-хромосом у каріотипі для еволюційного успіху та адаптації рослин до несприятливих умов існування. Описано вплив стресових умов культивування *in vitro* на геном рослин та визначено процеси, які зумовлюють виникнення соматональної мінливості. Головну увагу приділено характеристиці об'єкту дослідження *D. antarctica* E. Desv.: описано таксономічне положення, наведено морфологічні особливості будови, наведено літературні дані щодо

молекулярно-генетичних досліджень внутрішньовидового різноманіття. Охарактеризовано хромосомні числа інших представників роду *Deschampsia*.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У дослідженні використали рослини щучника антарктичного походженням з регіону Аргентинських островів (розташування української антарктичної станції «Академік Вернадський») Морської Антарктики – острови Берселот, Великий Ялур, Вінтер, Галіндез, Дарбо, Лейхел, Скуа та мису Расмуссен, що були вирощені з насіння в стерильних умовах. Також досліджували калюсні культури кореневого походження, отримані від зазначених рослин.

Для отримання асептичних проростків рослин насіння *D. antarctica* стерилізували у розчині пероксиду водню (Загричук, 2011/2012), висаджували на агаризоване живильне середовище Мурасіге-Скуга, МС (Murashige, Skoog, 1962) без фітогормонів, пророщували при інтенсивності світла 3000 Лк та 16-годинному фотоперіоді при температурі 17-18°C та вологості 80% до появи перших листочків. Потім вкорінювали на живильному середовищі Гамборга-Евелей, В<sub>5</sub> (Gamborg and Everleigh, 1968), доповненому 0,1 мг/мл НОК.

Одержання і культивування рослин-клонів проводили за наступною схемою: шляхом мікроклонального розмноження від рослин п'яти генотипів одержали по п'ять клонів (загалом 25 рослин); їх культивували на живильному середовищі В<sub>5</sub> з додаванням 0,1 мг/л НОК за інтенсивності освітлення 3000 Лк, 16-годинного фотоперіоду, при 17-18°C та вологості 80%. Відбір зразків для аналізу проводили один раз на рік впродовж трьох років дослідження.

Для індукції та вирощування культури тканин відбирали експланти кореневого походження, довжиною 1-1,5 см, висаджували їх на живильне середовище В<sub>5</sub>, доповнене 0,1 мг/мл дікамба, з розрахунку 50 експлантів на одну чашку Петрі (Osorio et al., 2014). Калюсні культури вирощували в темряві при температурі 24-25°C та вологості 80%, субкультивування проводили через кожні 4 тижні. Аналізували зразки відібрані на 2, 3, 4 пасажах.

Для цитогенетичного аналізу використовували кінчики корінців рослин довжиною 1–1,5 см, які витримували в крижаній воді (0°C) протягом 24 год. Зразки фіксували в суміші етанол : льодяна оцтова кислота (3:1) протягом доби. Калюсні тканини досліджували на 7-му добу росту. Їх так само інкубували в крижаній воді та фіксували. Отриманий матеріал переносили у 70° етанол і зберігали при кімнатній температурі. Зразки зафарбовували



1%-им розчином ацетоорсеїну чи флуоресцентним барвником DAPI і робили тиснення препаратів. Для аналізу використовували мікроскоп «NU-2E Carl Zeiss», мікрофотографування проводили цифровим фотоапаратом Canon 1000D.

Для визначення розміру ядерного геному (2C/пг) зразки, що були ізольовані з молодого листя рослин та внутрішній стандарт подрібнювали разом і поміщали в буфер для екстракції ядер (CyStain PI Precision P Sysmex 05-5022) з 1%-м  $\beta$ -меркаптоетанолом (Sigma) та 1% Тритон X-100 (Sigma). Суспензію ядер фільтрували через сіточку, а потім фарбували буфером з пропідій йодидом і РНКазою (Staining Buffer CyStain). Аналіз проводили на проточному цитометрі CyFlow Space (Sysmex). Як внутрішній стандарт використовували рослини *Secale cereale* L. subsp. *cereale* (2C=16.01 пг) та *Vicia faba* L. cv 'Tinova' (2C=26.21 пг).

Флуоресцентну *in situ* гібридизацію проводили згідно з (Jenkins, Hasterok, 2007). Як зонди використовували: (а) послідовність гена 5S рРНК *Triticum aestivum* L., рТа749 (Gerlach, Dyer, 1980); (б) 2.3 kb *Cla*I фрагмент гена 25S рРНК *Arabidopsis thaliana* (Unfried, Gruendler, 1990); (в) теломерні повтори *A. thaliana* ((TTTAGGG)<sub>n</sub>), HT100.3 (Hajdera, 2003); (г) центромерну послідовність *Brachypodium sylvaticum*, CCS1 (260 bp) (Aragon-Alcaide, 1996). Аналіз і мікрофотографування препаратів здійснювали за допомогою епіфлуоресцентного мікроскопа Olympus Provis AX70 з відповідними фільтрами та CCD камери Hamamatsu C5810. Зображення обробляли за допомогою програмного забезпечення Adobe Photoshop.

Молекулярно-генетичний аналіз проводили методом полімеразної ланцюгової реакції з ISSR- та IRAP-праймерами. ДНК виділяли за ЦТАБ-методом (Doyle, 1987) із листя асептичних рослин та калюсних культур на 20-25 день росту. У роботі використано 14 праймерів. Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 20 мкл містила: 30 нг ДНК, 0,2 мМ дНТФ, 1,25 U Таq-полімерази (Амплісенс, РФ), 1× (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> буфер (Fermentas, Литва), 1 мкМ праймера. ПЛР проводили в термоциклері Терцик МС2 («Біотехнологія», РФ) за наступного температурного режиму: 94 °С – 2 хв., 35 × (94 °С – 20 с, 53 °С – 30 с, 72 °С – 90 с), 72 °С – 5 хв. Реакцію з кожним праймером повторювали щонайменше двічі, враховували тільки відтворені амплікони.

Продукти ПЛР фракціонували електрофорезом в 1,5 % агарозному гелі в 1×SB буфері (5 мМ Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, рН 8.5) з наступною візуалізацією в УФ-світлі після забарвлення бромистим етидієм. Як маркер молекулярних мас використовували 100bp+1.5Kb+3Kb ДНК маркер (НПО «Сибэнзим», РФ).

При визначенні числа хромосом та розміру геному рослин результати вимірювань представляли у вигляді середнього арифметичного результатів

окремих вимірів та стандартної похибки (Плохинский, 1970). Для кількісної оцінки генетичного поліморфізму електрофоретичні спектри ПЛР-продуктів записували у вигляді бінарної матриці, а потім на її основі за допомогою програми FAMD 1.3 розраховували генетичні відстані за Жакардом (Schluter, Harris, 2006). Відносну кількість клітин з різним числом хромосом у калюсних тканинах виражали у відсотках. Обробку даних та побудову графіків виконували за допомогою програм Microsoft Excel та CorelDRAW.

## РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

### ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ РОСЛИН *D. ANTARCTICA*

**Дослідження цитогенетичних особливостей каріотипу виду.** За літературними даними, для *D. antarctica* з регіону Фолклендських та Південних Шетлендських островів (о. Кінг Джордж, Аргентинська антарктична станція «Jubani», наразі «Carlini»), а також Аргентини (Патагонія) характерним є число хромосом  $2n=26$  (Moore, 1967; Cardone et al., 2009; Gonzalez et al., 2016). А на о. Кінг Джордж були виявлені також рослини з міксоплоїдією  $2n=26, 28$  (Cardone et al., 2009).

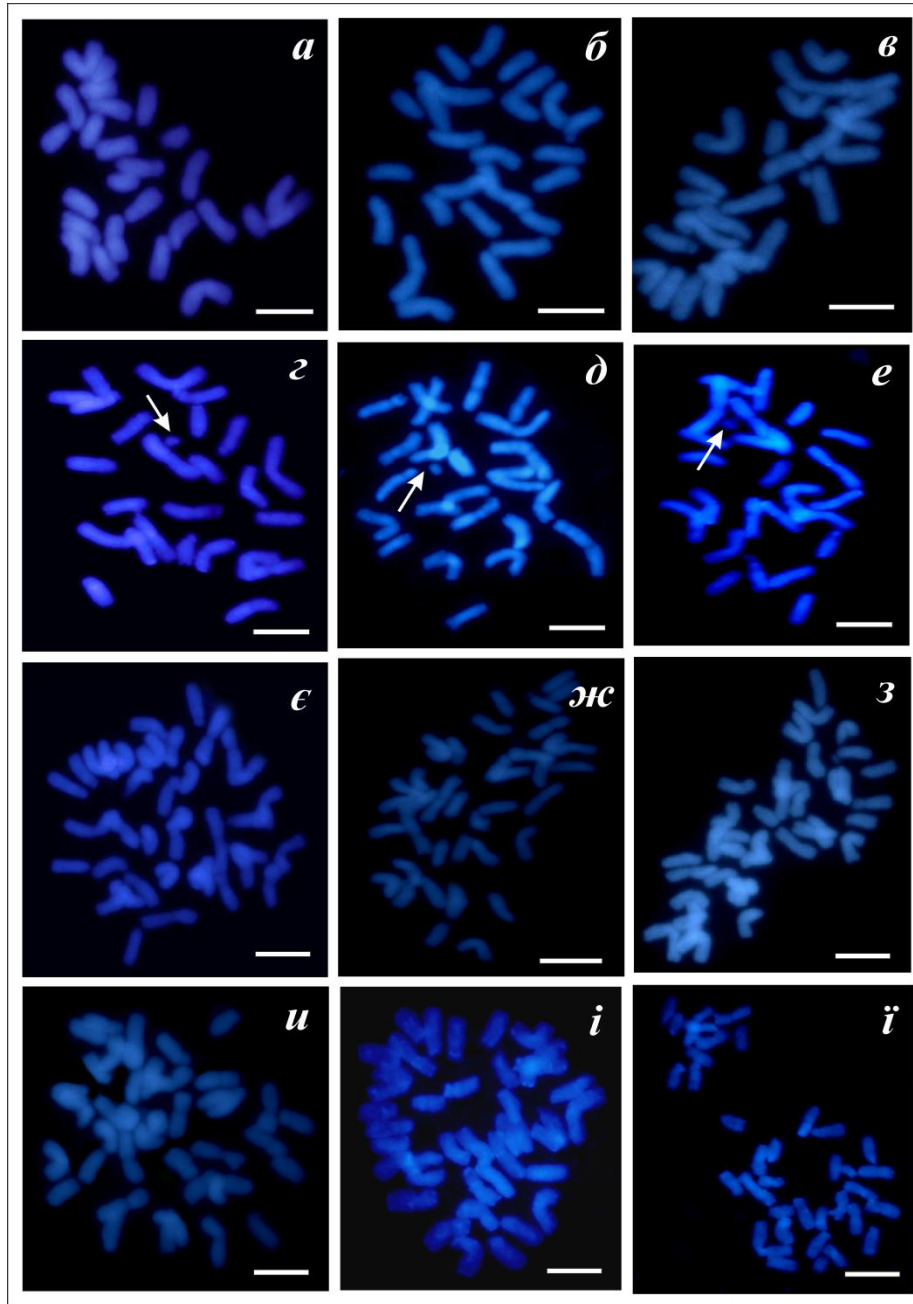
Досліджень каріотипу рослин виду з інших районів Антарктики до цього часу не проводили. Саме тому завдання нашої роботи полягало у проведенні цитогенетичного аналізу рослин *D. antarctica* з острівних популяцій регіону Аргентинських островів, що знаходяться на південному краю ареалу виду в Морській Антарктиці.

Результати цитогенетичного аналізу корінців рослин показали, що у більшості проаналізованих зразків (G/D12-2a, G/D4-1, G/D12-1, G20, L59, R35, S22, W1, Y62) було виявлено типовий для виду набір хромосом  $2n=26$ , що складався з 13 пар хромосом розміром 3–10 мкм (рис.1). Водночас, рослини генотипів DAR12, Y66 та Y67 виявилися міксоплоїдами з анеуплоїдними клітинами.

Розмах мінливості за числом хромосом у рослин генотипу DAR12 був у межах від 13 до 28 хромосом з модальним числом 26 хромосом. Частка анеуплоїдних клітин складала від 7,7 до 26,7 %. У досліджених рослин поряд із клітинами з 26 хромосомами було виявлено клітини з однією-двома В-хромосомами ( $2n = 26+0-2B$ ) (рис.1).

Рослини генотипу Y66, походженням з о. Великий Ялур, мали гіпотриплоїдний набір хромосом  $2n=36-39$  та містили у значній кількості анеуплоїдні клітини (до 25 %), а також невеликий відсоток диплоїдних та гаплоїдних клітин. Розмах мінливості за числом хромосом у таких рослин становив від 13 до 39 хромосом, що відповідає гаплоїдному та триплоїдному набору цього виду. Модальний клас формували клітини з 36 хромосомами (також були виявлені клітини з 37, 38 та 39 хромосомами) (рис.1). Аналіз

інших зразків з о. Великий Ялур виявив диплоїдний (Y62) та міксоплоїдний (Y67) генотипи.



**Рис. 1.** Метафазні пластинки клітин апікальної меристеми кореня міксоплоїдних рослин *D. antarctica* таких генотипів: *a, б, в* – DAR12 ( $2n=26$ ); *г, д, е* – DAR12 ( $2n=26+1B$ ); *е, ж, з* – Y66 ( $2n=36$ ); *и* – Y66 ( $2n=38$ ), *i* – Y66 ( $2n=39$ ), *i* – Y67 ( $2n=38$ ). Забарвлення DAPI. В-хромосоми вказано стрілками. Масштаб 10 мкм

Диплоїдний набір хромосом  $2n=26$ , тобто хромосомне число  $x=13$ , є найхарактернішим для представників роду *Deschampsia*. Водночас, у таких видів як *D. flexuosa* (L.) Trin. ( $2n=28$ ) та *D. atropurpurea* (Wahl.) Scheele ( $2n=14$ ) базове хромосомне число складає  $x=7$ , як і у більшості злаків, що

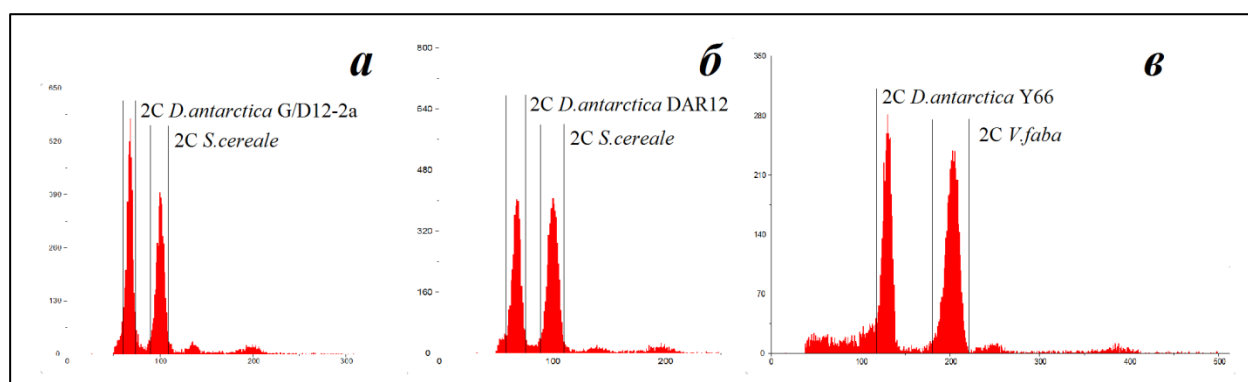
характеризуються найбільшим різноманіттям основного хромосомного числа ( $x=2-13$ ) (Щапова, 2011). Для представників роду *Deschampsia* відомі також поліплоїдні та триплоїдні генотипи, які мають 39 хромосом (*D. alpine* (L.) Roem et. Schult.) чи 52 (*D. brevifolia* R. Br., *D. mackenzieana* Raup., *D. mildbraedii* Pilg.).

Згідно з гіпотезою, висловленою С. Кавано і Ф. Альбертс, поліплоїдні види цього роду виникли внаслідок дуплікацій ( $x=7-14$ ), тоді як види з хромосомним числом  $2n=26$  виникли внаслідок дисплоїдії ( $28-26$ ) від поліплоїдних видів (Kawano, 1963, Alberts, 1978). Вважають, що *D. antarctica* – один із видів, еволюція якого йшла саме в напрямку дисплоїдії (Cardone et al., 2009).

Виявлені нами нові форми хромосомного поліморфізму *D. antarctica*, а саме рослини з гіпотриплоїдією, міксоплоїдією та додатковими хромосомами, можуть бути наслідком підвищеної геномної нестабільності, зумовленої екстремальними умовами зростання чи переважанням вегетативного способу розмноження у дослідженому регіоні.

**Визначення розміру геному рослин *D. antarctica*.** Літературні дані про розмір геному представників родини *Deschampsia* досить обмежені. Значення  $2C$  встановлено не для всіх видів. Результати визначення ядерного вмісту ДНК *D. antarctica* наведено лише в одній роботі (Bennett et al., 1982). Це зумовило необхідність отримання додаткових даних про розмір геному рослин цього виду з району Морської Антарктики. Крім того, одним із завдань дослідження був порівняльний аналіз вмісту ядерної ДНК у рослин генотипів, що відрізняються за числом хромосом.

Методом проточної цитофлуориметрії було встановлено, що середній розмір геному диплоїдних рослин (генотипи G/D12-2a, G/D4-1, G/D12-1, L59, R35, S22, W1, Y62, Y67) становив 10,88 пг/ $2C$  (рис.2 а).



**Рис. 2.** Гістограми розподілу за вмістом ДНК ( $2C$ ) у рослин *D. antarctica* з різним числом хромосом: а – G/D12-2a ( $2n=26$ ), б – DAR12 ( $2n=26+0-2B$ ), в – Y66 ( $2n=36-39$ )

Ядерний вміст ДНК у DAR12 ( $2n=26+0-2B$ ), який містить додаткові хромосоми, був близько 10,86 пг/2С, що знаходиться в межах діапазону значень, отриманих для диплоїдних рослин (рис.2 б). На противагу цьому, вміст ДНК у рослин гіпотриплоїдного генотипу Y66 ( $2n=36-39$ ) становив 16,46 пг/2С, що в 1,5 рази більше, ніж середнє значення, отримане для диплоїдних рослин (рис.2 в).

Отримані значення розміру геному рослин *D. antarctica* узгоджуються з даними, що були описані раніше: вміст 2С ДНК для рослин *D. antarctica* ( $2n=26$ ) з о. Галіндез становив 9,95 пг/2С, а для тетраплоїдної форми *D. caespitosa* ( $2n=52$ ) з району Британських островів Прибережної Антарктики було встановлене значення 9,0 пг/2С ДНК (Bennett et al., 1982). Крім того, відомо, що для *D. caespitosa* ( $2n=26$ ), *D. chapmanii* ( $2n=26$ ) і *D. tenella* ( $2n=26$ ) з Нової Зеландії значення 2С складали 10,43 пг, 11,05 пг і 10,07 пг, відповідно (Murray et al., 2005).

**Молекулярно-генетичні дослідження геному *D. antarctica*.** Геномну мінливість *D. antarctica* з популяцій Антарктичного регіону за допомогою ПЛР-аналізу досліджувало кілька груп вчених. Методами AFLP (Holderegger et al., 2003; Mark de Wouw et al., 2007; Chwedorzewska, Bednarek, 2008) та RAPD аналізу (Andreev et al., 2010) виявлено низький рівень геномного поліморфізму рослин в регіоні порівняно із популяціями Південної Америки. Враховуючи значні відмінності між представниками виду при цитогенетичному аналізі, одним із завдань цієї роботи було дослідити поліморфізм рослин із використанням ПЛР-маркерів.

Для молекулярно-генетичного аналізу рослин *D. antarctica* восьми генотипів (W1, DAR12, S22, Y62, Y66, Y67, R35, L59) з різних острівних популяцій було використано 10 ISSR та 4 IRAP праймери. Загалом для досліджених зразків було отримано 63 амплікони, серед яких 16 (25,4 %) були поліморфними. За даними ПЛР-аналізу було розраховано генетичні відстані між дослідженими генотипами за Жаккардом, які знаходились у межах 0,0323–0,1803 (табл.1).

Найбільш відмінними виявились генотипи W1 і DAR12, генетична відстань між якими дорівнювала 0,1803. Найменші значення генетичних відстаней, в межах 0,0323–0,0645, було встановлено для групи генотипів Y66, Y67, Y62, R35, S22, куди входили гіпотриплоїд, міксоплоїд та диплоїди. А генотип W1 із диплоїдним набором хромосом виявився генетично віддаленим від решти диплоїдів.

Генетичні відстані між диплоїдними рослинами коливалися в межах від 0,0476 до 0,1746. Значення коефіцієнту між генотипом DAR12 з В-хромосомами та гіпотриплоїдом Y66 (0,0968), як і генетичні відстані між DAR12 та диплоїдами, не виходили за межі цього діапазону (табл.1). Це

свідчить про те, що рослини із нетиповим каріотипом є генетично близькими до диплоїдних. Ймовірно, їхнє утворення в дослідженому регіоні відбувається з певною частотою, можливо дещо вищою, ніж в більш північних популяціях, оскільки там їх знайти поки що не вдалося. Водночас, очевидно, що час їх існування виявляється недостатнім для дивергенції та утворення нових форм або рас, які б істотно відрізнялися від решти рослин за молекулярно-генетичними ознаками.

Таблиця 1

**Генетичні відстані за Жаккардом між рослинами *D. antarctica*,  
розраховані за результатами ISSR та IRAP-аналізу**

№	Генотип	W1	DAR12	S22	Y62	Y66	Y67	R35	L59
1	W1	0							
2	DAR12	0,1803	0						
3	S22	0,0847	0,0984	0					
4	Y62	0,1290	0,0806	0,0484	0				
5	Y66	0,1452	0,0968	0,0645	0,0476	0			
6	Y67	0,1475	0,0983	0,0968	0,0484	0,0641	0		
7	R35	0,1746	0,1270	0,0952	0,0476	0,0323	0,0645	0	
8	L59	0,1639	0,1148	0,1129	0,0645	0,0806	0,0500	0,0806	0

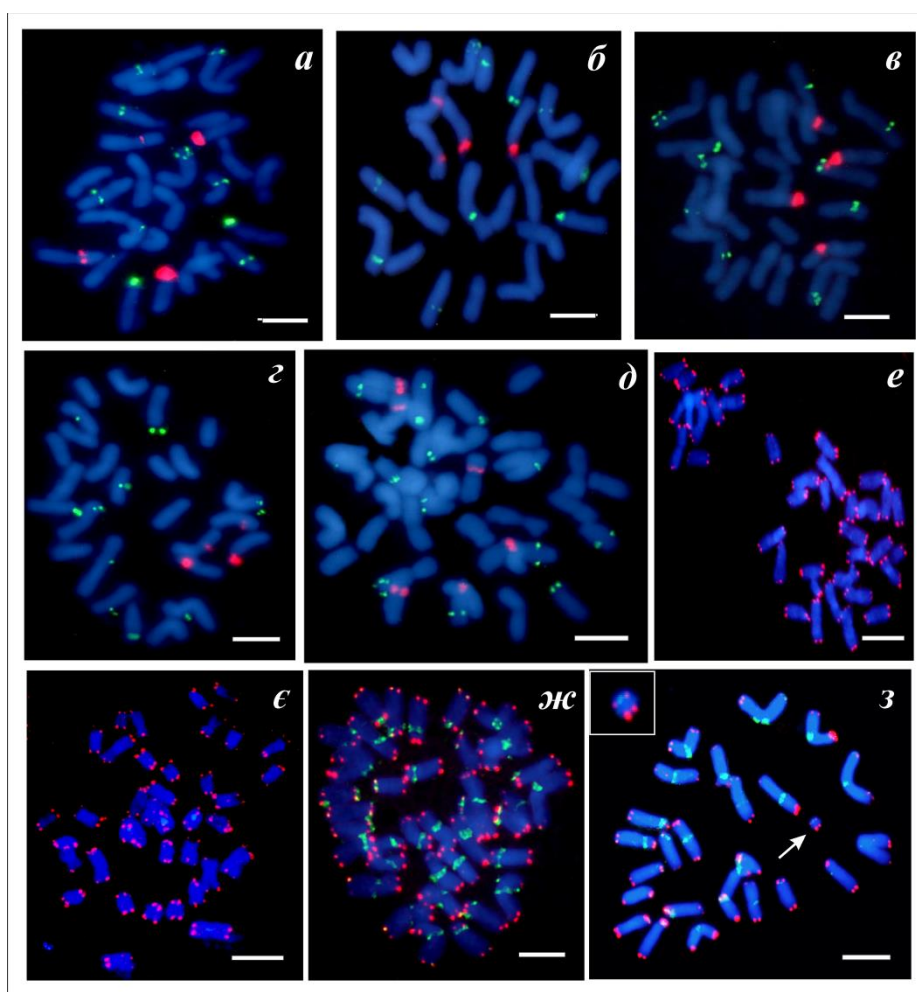
Отже, проведені дослідження *D. antarctica* з району Аргентинських островів вказують на те, що відмінності між диплоїдними рослинами та гіпотриплоїдом, або генотипом з В-хромосомами не перевищують рівня молекулярно-генетичних відмінностей між окремими диплоїдними рослинами.

**ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ КАРІОТИПУ  
*D. ANTARCTICA*: АНАЛІЗ ХРОМОСОМНОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ ГЕНІВ 5S  
рРНК ТА 45S рРНК, ТЕЛОМЕРНИХ ТА ЦЕНТРОМЕРНИХ ПОВТОРІВ**

Інформації про структурну організацію геному *D. antarctica* на початок наших досліджень не було. Тому одне із завдань роботи полягало в ідентифікації та локалізації генів рРНК, теломерних і центромерних послідовностей у каріотипі рослин виду. Для дослідження було обрано п'ять

генотипів рослин, які відрізнялись за каріотиповими характеристиками (диплоїди, гіпотриплоїд та генотип з додатковими хромосомами).

В результаті аналізу флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH) з послідовностями генів 5S рРНК і 45S рРНК в якості зондів, було виявлено десять сайтів 5S рРНК локусів і чотири сайти 25S рРНК локусів у каріотипі диплоїдних рослин генотипів G/D12-2а, R35, S22, DAR12. 5S рДНК сайти були локалізовані в проксимальних регіонах шести хромосом і термінальних регіонах чотирьох хромосом. Сигнали 25S рДНК спостерігались в безпосередній близькості до центромери двох хромосом і в термінальних регіонах двох інших хромосом (рис.3 а – з).



**Рис. 3.** Локалізація генів 5S рРНК (зелений) та 45S рРНК (червоний) на метафазних хромосомах *D. antarctica* (А-Д): а – DAR12 (2n=26), б – G/D12-2а (2n=26), в – R35 (2n=26), г – S22 (2n=26), д – Y66 (2n=36). Розташування теломерних повторів HT100.3 *A. thaliana* (червоний) у каріотипі гіпотриплоїдного генотипу Y66, 2n=36 (е та є). Локалізація теломерних повторів HT100.3 *A. thaliana* (червоний) та центромерних повторів CCS1 *Brachypodium sylvaticum* (зелений) у каріотипі гіпотриплоїдного генотипу Y66, 2n=39 (ж) і каріотипу з В-хромосомою DAR12, 2n=26+1В (з). Додаткову хромосому вказано стрілкою. Забарвлення DAPI. Масштаб 10 мкм

У каріотипі гіпотриплоїда Y66 було виявлено чотирнадцять сайтів 5S рДНК і шість сайтів 25S рДНК. 5S рДНК сайти були виявлені в проксимальних регіонах восьми хромосом та в термінальних регіонах шести хромосом. Сигнали 25S рДНК були знайдені в проксимальних регіонах трьох хромосом та термінальних регіонах трьох інших хромосом (рис.3 д). Виявлені відмінності за числом сайтів рДНК, ймовірно, спричинені зростанням загального числа хромосом в гіпотриплоїдному генотипі. Загалом сигнали рДНК були дискретними та локалізувались на різних хромосомах.

FISH з використанням зондів з теломерними і центромерними повторюваними послідовностями виявив типове розташування цих повторів на хромосомах *D. antarctica*. Теломерні послідовності формували чіткі сайти на термінальних кінцях всіх хромосом (рис.3 е, є). Центромерний зонд гібридизувався безпосередньо з ділянкою первинної перетяжки всіх хромосом як диплоїдних, так і гіпотриплоїдного генотипів (рис.3 ж, з). Це може свідчити про відсутність хромосомних перебудов у досліджуваних зразків. Використання в якості зондів теломерних та центромерних послідовностей дозволило підтвердити наявність додаткової хромосоми в каріотипі рослин DAR12. В-хромосома була значно менше решти хромосом за розміром, та мала чіткі сигнали гібридизації в центромерній та обох термінальних теломерних ділянках (рис.3 з). Це вказує на структурну цілісність цієї хромосоми, яка, в іншому випадку, могла б бути розпізнана як мітотично-нестабільний хромосомний фрагмент (Jones, Viegas, 2008; Houben et al., 2013).

Рослину з переважанням клітин з 38 хромосомами з о. Великий Ялур було досліджено методом GISH-аналізу із геномною ДНК *D. caespitosa* в якості зонду (Amosova et al., 2016). Було показано наявність Робертсонівської транслокації, яка призвела до злиття гомологічних хромосом дванадцятої пари, що містили сайти 5S рДНК. Це пояснює редукцію числа хромосом триплоїда до гіпотриплоїда (39–38) та втрату одного з сайтів 5S рДНК.

Таким чином, ідентифіковано розташування генів 5S рДНК та 45S рДНК, теломерних і центромерних повторів в каріотипі рослин *D. antarctica*, а також підтверджено наявність додаткових хромосом у каріотипі рослин генотипу DAR12. Каріотипова мінливість, виявлена у гіпотриплоїда та генотипу з В-хромосомами, підтверджує підвищену хромосомну нестабільність у рослин із зміненим каріотипом та демонструє основні можливі зміни в його структурі.

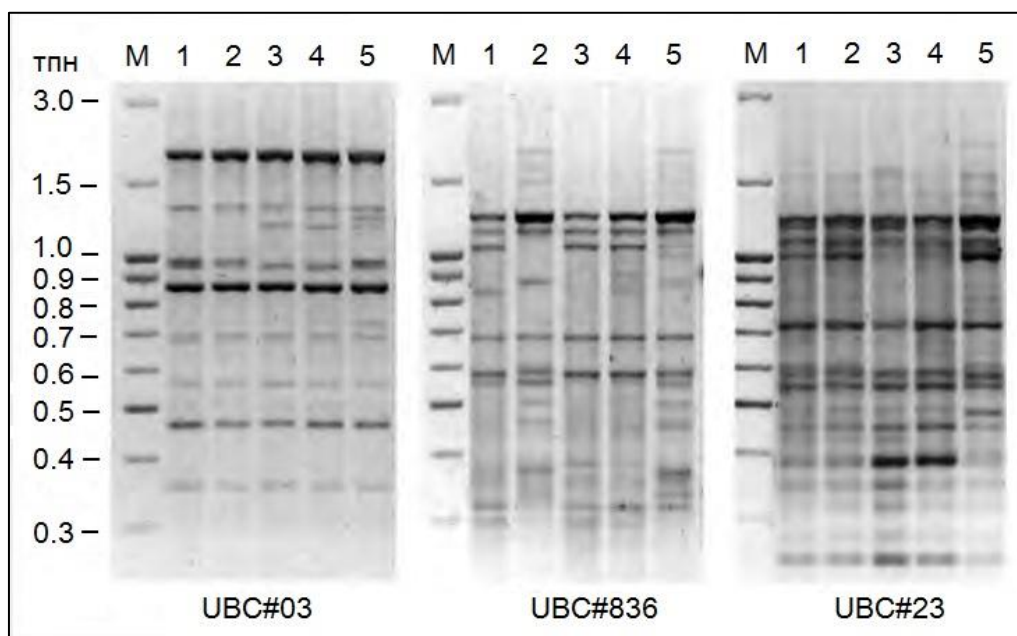
## **ВИВЧЕННЯ МІНЛИВОСТІ ГЕНОМУ *D. ANTARCTICA* В УМОВАХ *IN VITRO***

**Дослідження генетичної мінливості рослин-клонів за мікроклонального розмноження. Культивування рослин в умовах *in vitro***



створює значний стрес, який здатний спричиняти зміни спадкового матеріалу, що проявляються в формі хромосомних перебудов, метилування ДНК, точкових мутацій та ін. (Кунах, 2005). Однак, до цього часу досліджень, спрямованих на вивчення генетичної мінливості *D. antarctica* за мікроклонального розмноження та тривалого культивування *in vitro*, проведено не було. Для первинної характеристики матеріалу нами було проведено молекулярно-генетичний аналіз вихідних рослин *D. antarctica*, для яких попередньо було знайдено відмінності за числом хромосом

Генетичний поліморфізм оцінювали методом ПЛР-аналізу з використанням 10 ISSR-праймерів. Загалом для зразків нараховано 106 ампліконів, з яких 39 (35 %) були поліморфними (рис. 4). Значення попарних генетичних відстаней Жаккарда між різними генотипами, розраховані на основі результатів ISSR-аналізу, були в межах 0,1446–0,2772.



**Рис. 4.** Електрофоретичні спектри продуктів ISSR-ПЛР аналізу рослин *D. antarctica* таких генотипів: 1 – G/D12-2a, 2 – R35, 3 – DAR12, 4 – Y66, 5 – S22; М – маркер молекулярних розмірів ДНК. Під електрофореграмами наведено назви праймерів, які використовували для аналізу

Для визначення генетичної мінливості рослин, зумовленої впливом стресових умов при тривалому культивуванні *in vitro*, було проведено порівняльний молекулярно-генетичний та цитогенетичний аналізи клонального потомства рослин генотипів G/D12-2a, DAR12, R35, S22, Y66.

В результаті порівняльного молекулярно-генетичного аналізу вихідних рослин і їхніх тривало-культивованих нащадків, взятих через різні проміжки часу, відмінностей у спектрах ПЛР-продуктів не виявили ані для рослин із

диплоїдним каріотипом, ані для гіпотриплоїда та рослини з В-хромосомами. Цитологічний аналіз показав, що на відміну від рослин з типовим для виду числом хромосом  $2n=26$ , у яких за тривалого культивування воно не змінювалось, у рослин із додатковими хромосомами та гіпотриплоїда (DAR12 та Y66) спостерігалась мінливість кількості анеуплоїдних клітин залежно від пасажу культивування.

Отже, показано збереження генетичних характеристик за ISSR-ПЛР та цитогенетичного аналізу у рослин-клонів *D. antarctica* за мікроклонального розмноження та тривалого (впродовж 57–79 пасажів) культивування *in vitro*.

Генетичних відмінностей ані всередині кожної з груп рослин одного генотипу, ані порівняно із вихідним предком не виявлено. Рослини, які походили від диплоїдного предка, так і залишались диплоїдними, а рослини з нетиповим каріотипом зберігали клітини з різним числом хромосом, хоча їх співвідношення змінювалось в залежності від пасажу.

**Особливості генетичної мінливості в культурі тканин.** Культура рослинних тканин є експериментальною моделлю для вивчення клітинного поділу, диференціації, морфогенезу (Zimmerman et al., 1993) та стрес-опосередкованої мінливості геному рослин (Кунах, 2005, 2011).

В результаті вивчення числа хромосом у клітинах калюсних тканин *D. antarctica*, отриманих від рослин п'яти генотипів з різним числом хромосом – диплоїдних, гіпотриплоїда та з В-хромосомами, виявлено їх нестабільність за цією ознакою: частка клітин з різним рівнем плоїдності змінювалась від пасажу до пасажу у кожному дослідженому варіанті калюсу (табл. 2).

Цитогенетичні особливості вихідних рослин впливали на число хромосом у калюсних клітинах. Калюс генотипу Y66 ( $2n=36-39$ ) характеризувався наявністю більшої кількості клітин з гіпотриплоїдним набором хромосом. У клітинах калюсу генотипу DAR12 ( $2n=26+0-2B$ ) відмічали наявність метафаз, що містили мікро-хромосоми.

Найбільший розмах мінливості числа хромосом (18–63) виявлено у калюсі, отриманому від диплоїдної рослини G/D12-2a ( $2n=26$ ). Менший розмах мінливості за числом хромосом виявлено у культурах тканин генотипів Y66, DAR12 та S22. Найменша мінливість числа хромосом була виявлена у калюсі R35 (16–52 хромосом). Модальний клас в культурі тканин *D. antarctica* незалежно від стану каріотипу вихідної рослини (диплоїд, з В-хромосомами чи гіпотриплоїд) формували диплоїдні клітини та клітини з біядиплоїдним числом хромосом (табл. 2).

Досліджені клітинні популяції характеризувалися наявністю значної кількості анеуплоїдних клітин. Найвищий рівень анеуплоїдії було виявлено у культурі тканин генотипу R35 (60,6 %). У зразків G/D12-2a, DAR12 та Y66

відсоток таких клітин становив 44,6 %, 47,6 % та 52,7 %, відповідно. А найменшу кількість анеуплоїдних клітин виявлено у калюсній тканині S22 (44,0 %).

Таблиця 2

**Кількість клітин різних рівнів плоїдності у калюсних тканинах  
*D. antarctica*, отриманих від рослин з різним числом хромосом**

Генотип і число хромосом	Пасаж	Кількість наборів хромосом – n (%), $x \pm s^*$								
		1	<2	2	>2	3	>3	4	>4	5
G/D12-2a, 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
Y66, 2n=36-39	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	–	–	–
DAR12, 2n=26+0-2B	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	–	–
R35, 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	–	–
S22, 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	–	–

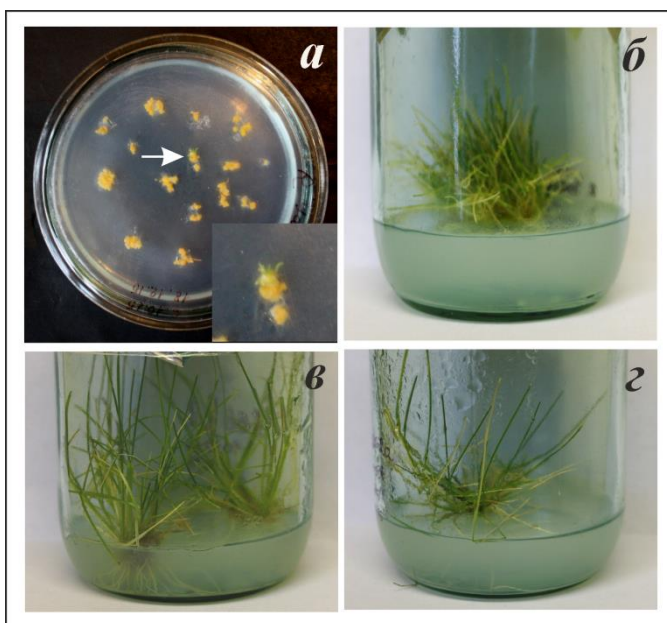
\*Примітки:  $x$  – середнє значення,  $s$  – стандартне відхилення.

Отримані дані свідчать про підвищену хромосомну мінливість в клітинах калюсних культур *D. antarctica* на початкових етапах культивування та збереження цитогенетичних характеристик у рослин диплоїдних генотипів G/D12-2a, DAR12, S22. У решти культур тканин, отриманих від рослин генотипів Y66 та R35, спостерігали підвищену хромосомну нестабільність. Це можна пояснити нестабільністю каріотипу цих генотипів в цілому, яка виявляється у вигляді високої частки анеуплоїдних клітин в тканинах рослин донорів експлантів.

**Дослідження соматклональної мінливості рослин-регенерантів.** Соматклональна мінливість може проявлятися у зміні кількості і морфології хромосом, метилюванні, ампліфікації чи редукції повторюваних

послідовностей ДНК у соматиклонів порівняно із вихідною рослиною (Кунах, 2005). Описані в літературі регенеранти *D. antarctica*, одержані від рослин з регіону Південних Шетландських островів, були подібними до материнських як морфологічно, так і за результатами AFLP-аналізу (Cuba et al., 2005); інші демонстрували фенотипову подібність до материнських особин (Osorio et al., 2014). Однак, досліджень, які б вивчали каріологічні особливості регенерантів виду досі не проводилось. Тому, нашим завданням було дослідити геномну мінливість на хромосомному рівні.

Від рослин диплоїдних генотипів G/D12-2a ( $2n=26$ ), R35 ( $2n=26$ ) та гіпотриплоїда Y66 ( $2n=36-39$ ) було отримано непрямі регенеранти (рис. 5), цитогенетичний аналіз яких встановив, що модальний клас клітин апікальної меристеми коренів у них формували диплоїдні клітини. У регенеранта R-1 (який походив від диплоїда G/D12-2a) було виявлено значну частку анеуплоїдних клітин, а рослина R-2 (диплоїдного походження від R35) була диплоїдною з числом хромосом  $2n=26$ . У регенерантів R-3, R-4, R-5, R-6, R-7, R-8, R-9 (гіпотриплоїдного походження) зустрічалися клітини з числом хромосом  $2n=26, 28, 33, 36$ .



**Рис. 5.** Утворення перших листочків з калусної тканини *D. antarctica* на регенераційному середовищі (а); досліджені рослини-регенеранти, походженням від диплоїдних генотипів G/D12-2a (б), R35 (в) і гіпотриплоїда Y66 (г).

Отже, встановлено, що здатність до регенерації притаманна як для диплоїдних, так і для гіпотриплоїдного генотипів рослин *D. antarctica*. У всіх соматиклонів, незалежно від плоїдності вихідного експланту, виявлено переважання диплоїдних клітин у проліферативному пулі. Отримані дані підтвердили, що у генетично-гетерогенній клітинній популяції культури тканин диплоїдні клітини характеризуються підвищеною здатністю до органогенезу і регенерації, а також виявили підвищену нестабільність хромосомного числа гіпотриплоїдного генотипу.

## ВИСНОВКИ

В результаті комплексних молекулярно-генетичних та цитогенетичних досліджень антарктичного злаку *D. antarctica* з регіону Аргентинських островів Морської Антарктики вперше вивчено особливості структури та мінливості геному цього виду у рослин, взятих з природи та культивованих *in vitro*.

1. Встановлено, що більшість досліджених рослин *D. antarctica* має типове для виду хромосомне число  $2n=26$ . Вперше виявлено нові для виду хромосомні форми, а саме рослини з гіпотриплоїдією, міксоплоїдією та В-хромосомами.
2. Методом проточної цитометрії, визначено розмір ядерного геному ( $2C/pg$ ) у рослин з різним числом хромосом, який становив близько 10,88 пг для диплоїдів, 10,86 пг для генотипу з В-хромосомами, та 16,46 пг для гіпотриплоїда.
3. За допомогою молекулярно-генетичного аналізу з використанням ISSR- та IRAP-маркерів показано, що генетичні дистанції між рослинами з різним числом хромосом не виходять за межі відмінностей, встановлених для диплоїдних генотипів.
4. Методом флуоресцентної гібридизації *in situ* встановлено хромосомну локалізацію генів 5S рРНК та 45S рРНК, теломерних і центромерних повторів у *D. antarctica*. Виявлено відмінності в кількості локусів генів рРНК у рослин з диплоїдним та гіпотриплоїдним хромосомним набором. З використанням методів молекулярно-цитогенетичного аналізу підтверджено наявність та структурну цілісність В-хромосом.
5. Показано збереження вихідних генетичних характеристик у рослин-клонів за мікроклонального розмноження та тривалого культивування *in vitro*. Не виявлено відмінностей на молекулярно-генетичному та цитогенетичному рівні ані всередині групи клонованих рослин кожного з генотипів, ані при порівнянні з вихідною особою: рослини, які походили від диплоїдного предка, залишались диплоїдними, у міксоплоїдів зберігалися анеуплоїдні клітини, але їх частка змінювалася між пасажами.
6. Вперше досліджено цитогенетичну структуру клітинних популяцій калюсних культур *D. antarctica*. Встановлено, що на перших етапах культивування, незалежно від цитогенетичних характеристик вихідних рослин (диплоїд, гіпотриплоїд, чи з В-хромосомами), модальний клас формували диплоїдні та клітини з біядиплоїдним числом хромосом.
7. Отримано рослини-регенеранти *D. antarctica* непрямого походження. За допомогою цитогенетичного аналізу встановлено, що у всіх соматиклонів, незалежно від плоїдності рослини-донора експлантів, в зоні апікальної меристеми кореня переважали диплоїдні клітини.

**ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ  
ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. New forms of chromosome polymorphism in *Descampsia antarctica* Desv. from the Argentine Islands of the Maritime Antarctic region / **D.O. Navrotska**, M.O. Twardovska, I.O. Andreev, I.Yu. Parnikoza, A.A. Betekhtin, O.M. Zahrychuk, N.M. Drobyk, R. Hasterok, V.A. Kunakh // Ukrainian Antarctic Journal. – 2014. – № 13. – P. 185–191 (Здобувачем проведено цитогенетичний аналіз рослин, здійснено статистичну обробку даних, взято участь у обговоренні результатів, написано частину статті).
2. Вивчення геномів рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з різних локалітетів Прибережної Антарктики за допомогою хромосомних та молекулярних маркерів / М.О. Твардовська, І.О. Андреев, А.В. Амосова, К.В. Спірідонова, **Д.О. Навроцька**, Т.Е. Саматадзе, С.А. Зошук, О.В. Муравенко, В.А. Кунах // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2014. – Т. 14. – С. 133–137 (Здобувачем проаналізовано літературу, отримано асептичні проростки, проведено цитогенетичний аналіз, взято участь у обговоренні результатів).
3. Хромосомний поліморфізм рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з району Аргентинських островів (Прибережна Антарктика) / **Д.О. Навроцька**, М.О. Твардовська, І.О. Андреев, О.М. Загричук, І.Ю. Парнікоза, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // Вісник Українського товариства генетиків та селекціонерів. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 184–190 (Здобувачем проаналізовано літературу, відібрано рослини для експериментальної роботи, проведено цитогенетичний аналіз клітин апікальної меристеми і статистичне опрацювання отриманих даних, здійснено інтерпретацію результатів, написано частину статті).
4. 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. Андреев // Вісник Українського товариства генетиків та селекціонерів. – 2016. – Т. 14, № 1 – С. 36–43 (Здобувачем проаналізовано літературу, отримано культуру тканин, проведено цитогенетичний аналіз культури тканин, зроблено фотографії метафазних пластинок, здійснено статистичну обробку даних, побудовано діаграми розподілу клітин за рівнем плоідності, написано основну частину статті).
5. Генетична стабільність отриманих мікроклональним розмноженням рослин *Deschampsia antarctica* Desv. за тривалого культивування *in vitro* / К.В. Спірідонова, І.О. Андреев, О.М. Загричук, **Д.О. Навроцька**, М.О. Твардовська, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // Физиология растений и генетика. – 2016. – Т. 48, № 6 – С. 36–43 (Здобувачем вирощено частину рослинного матеріалу, виділено частину ДНК зразків, здійснено цитогенетичний аналіз рослин та зроблено мікро-фотографії, обговорено отримані результати, взято участь у написанні статті). Включено у наукометричну базу Thomson Scientific, США.

6. Рослини *Deschampsia antarctica* E. Desv. з різним числом хромосом в умовах вирощування *in vitro*. Зв'язок розміру геному та двох показників пристосовуваності / І.Ю. Парнікоза., Н.Ю. Мірjuta, М. Ройек, А.А. Бетехтін, О.О. Пороннік, Г.Ю. Мирjuta, **Д.О. Навроцька**, Р. Хастерок, В.А. Кунах // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2017. – Т. 20 – С. 304 – 309 (Здобувачем здійснено підготовку рослинного матеріалу, проведено цитогенетичний аналіз, взято участь в обговоренні отриманих результатів).
7. Comprehensive characterization of cultivated *in vitro* *Deschampsia antarctica* E. Desv. plants with different chromosome numbers / **Navrotska D.O.**, Andreev I.O., Parnikoza I.Yu., Spiridonova K.V., Poronnik O.O., Miryuta N.Yu., Myryuta G.Yu., Zahrychuk O.M., Drobyk N.M., Kunakh V.A. // Cytology and Genetics. – 2017. – Vol. 51, № 6. – P. 422-431 (Здобувачем проаналізовано літературу, проведено цитогенетичний та FISH аналіз генотипів рослин, досліджено ефективність калюсогенезу деяких із досліджуваних генотипів, здійснено статистичну обробку та інтерпритацію отриманих результатів, написано основну частину статті). Включено до наукометричних баз SCOPUS та THOMSON REUTERS.
8. Молекулярно-цитогенетичний аналіз рослин *Deschampsia antarctica* з різних локалітетів Прибережної Антарктики / **Д.О. Навроцька**, М.О. Твардовська, В.А. Кунах // I Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів з міжнародною участю “Сучасні проблеми викладання та наукових досліджень у ВНЗ України”, Дніпропетровськ, Україна. – 2014. – С. 42–44 (Здобувачем отримано асептичні проростки, проведено цитогенетичний аналіз, взято участь у написанні тез).
9. Cytogenetic and molecular analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. from the Maritime Antarctic / **D.O. Navrotska**, M.O. Twardovska, I.O. Andreev, A.A. Betekhtin, R. Hasterok, V.A. Kunakh // IX Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine dedicated to 160-th Anniversary of M.F. Kastschenko, Kyiv, Ukraine. – 2015. – P. 7 (Здобувачем проведено цитогенетичний аналіз інтактних рослин, здійснено FISH аналіз генотипів рослин, проаналізовано результати, написано тези).
10. Cytogenetic features of *Deschampsia antarctica* Desv. plants in different microclimate condition of the Argentine Islands of Maritime Antarctic / V. Kunakh, **D. Navrotska**, M. Twardovska, R. Hasterok, A. Betekhtin, I. Andreev, I. Parnikoza // 26-th International Congress on Polar Research “High latitude and high mountains: driver of or driven by global change?”, Munich, Germany. – 2015. – P. 92 (Здобувачем проаналізовано літературу, визначено число хромосом та встановлено локалізацію генів rPHK в каріотипі рослин, написано основну частину тез).
11. Karyotypic variation in *Deschampsia antarctica* Desv. plants and tissue culture / **D.O. Navrotska**, M.O. Twardovska, I.O. Andreev, A.A. Betekhtin, R. Hasterok, V.A. Kunakh // The 5-th International Conference for Young Scientists “CYS-

- 2015”, Kyiv, Ukraine. – 2015. – P.89 (Здобувачем проведено цитогенетичний аналіз рослин та культури тканин, проаналізовано результати, написано тези).
12. Cytogenetic studies of *Deschampsia antarctica* Desv. tissue culture / **D.O. Navrotska**, M.O. Twardovska, I.O. Andreev, V.A. Kunakh // Ukrainian Society of Cell Biology International Conference “Advances in cell biology and biotechnology”, Lviv, Ukraine. – 2015. – P.127 (Здобувачем отримано культури тканин та проведено їх цитогенетичний аналіз, здійснено статистичну обробку, проаналізовано результати, написано тези).
  13. Цитологічний аналіз *Deschampsia antarctica* Desv. з острова Вінтер (Прибережна Антарктика) / М. Олійник, **Д. Навроцька**, О. Пороннік, І. Парнікоза // XII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і Поступ Біології”, Львів, Україна. – 2016. – С. 131–132 (Здобувачем отримано асептичні проростки, проведено цитологічний аналіз рослин, здійснено статистичну обробку та опрацювання результатів, написано тези).
  14. Genome variability of *Deschampsia antarctica* Desv. plants with different chromosome numbers in tissue culture / **D. Navrotska**, I. Andreev, M. Twardovska, V. Kunakh // 10<sup>th</sup> Parnas Conference. Young Scientist Forum «Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine», Wroclaw, Poland. – 2016. Vol.63, Sup.1. – P.14 (Здобувачем проведено цитологічний аналіз культури тканин, здійснено статистичну обробку, інтерпретовано результати, написано тези).
  15. Peculiarities of genome variability of antarctic hairgrass *Deschampsia antarctica* Desv. from the Maritime Antarctic / **D. Navrotska**, M. Twardovska, I. Andreev, I. Parnikoza, A. Betekhtin, R. Hasterok, V. Kunakh // The 41-st FEBS Congress “Molecular and System Biology for a Better Life”, Ephesus/ Kusadasi, Turkey. – 2016. – Vol. 283, Sup.1. – P. 335 (Здобувачем проведено молекулярно-цитогенетичний аналіз рослин та калюсних культур, написано тези).
  16. Research of genome plasticity the *Deschampsia antarctica* Desv. plants from populations the Argentine Islands region of Maritime Antarctic / **D. Navrotska**, I. Andreev, V. Kunakh // The Mind the Gap 5 Conference ‘Bridging the gap between theoretical and empirical population genetics’, Vienna, Austria. – 2016. – P.12 (Здобувачем проведено молекулярно-цитогенетичний аналіз рослин, написано тези).
  17. Каріологічна гетерогенність рослин *Deschampsia antarctica* E. Desv. в регіоні Аргентинських островів Морської Антарктики / **Д.О. Навроцька**, І.О. Андрєєв, І.Ю. Парнікоза, О.О. Пороннік, В.А. Кунах // VIII Міжнародна Антарктична Конференція, присвячена 25-річчю приєднання України до договору про Антарктику, Київ, Україна. – 2017. – С. 80–81 (Здобувачем проведено цитологічний аналіз, проаналізовано літературу, написано тези).
  18. Цито- та молекулярно-генетичні дослідження мікроклонально розмножених рослин *Deschampsia antarctica* E. Desv. за тривалого культивування *in vitro* / К.В. Спірідонова, І.О. Андрєєв, **Д.О. Навроцька**, О.М. Загричук, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // VIII Міжнародна Антарктична Конференція,



присвячена 25-річчю приєднання України до договору про Антарктику, Київ, Україна. – 2017. – С. 98–99 (Здобувачем отримано рослинний матеріал, виділено ДНК частини зразків, проведено цитологічний аналіз, написано тези).

19. Цитогенетичне дослідження рослин-регенерантів *Deschampsia antarctica* E. Desv. / Д.О. Навроцька, І.О. Андреев, В.А. Кунах // Міжнародна конференція молодих учених “Актуальні проблеми ботаніки та екології”, Луцьк, Україна. – 2017. – С. 77 (Здобувачем проведено планування дослідження, отримано регенеранти, здійснено їх цитогенетичний аналіз, написано тези).
20. Peculiarities of genome variability of *Deschampsia antarctica* E. Desv. from the marginal populations of Maritime Antarctic / D. Navrotska, I. Andreev, A. Betekhtin, M. Rojek, R. Hasterok, V. Kunakh // EMBO Workshop “Evolution in the time of genome architecture”, Naples, Italy. – 2017. – P. 36 (Здобувачем проведено молекулярно-цитогенетичне дослідження рослин, отримано калюсні культури і рослин-регенеранти та проведено їх цитогенетичний аналіз, підсумовано одержані результати, написано тези).

## АНОТАЦІЯ

**Навроцька Д.О. Мінливість геному *Deschampsia antarctica* E. Desv. в природі та культурі *in vitro*.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2017.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню особливостей мінливості геному антарктичного злаку *D. antarctica*, походженням з південного краю поширення виду в Морській Антарктиці, у природі та культурі *in vitro*.

Встановлено число хромосом рослин *D. antarctica* з регіону Аргентинських островів Морської Антарктики та виявлено нові форми хромосомного поліморфізму. Визначено розмір геному (2С/пг) відмінних за числом хромосом рослин. Показано відсутність залежності між встановленою мінливістю за числом хромосом рослин *D. antarctica* досліджених генотипів і рівнем їх молекулярно-генетичних відмінностей. Досліджено структурні особливості каріотипу виду: встановлено локалізацію генів 5S рРНК та 45S рРНК, теломерних і центромерних повторюваних послідовностей; підтверджено ідентичність гіпотриплоїдного генотипу та структурну цілісність В-хромосом. Показано збереження генетичних характеристик на молекулярно-генетичному та цитогенетичному рівні у рослин-клонів за мікроклонального розмноження та тривалого культивування *in vitro*. Проаналізовано особливості цитогенетичної мінливості в калюсних тканинах, отриманих від різних за числом хромосом рослин. Отримано рослини-регенеранти *D. antarctica* непрямого походження,

та виявлено, що незалежно від плоїдності вихідного експланту, в їх проліферативному пулі переважали диплоїдні клітини.

**Ключові слова:** *Deschampsia antarctica* E. Desv., мінливість геному, генетичне різноманіття, хромосомний поліморфізм, В-хромосоми, розмір геному (2C), флуорисцентна *in situ* гібридизація (FISH), структурна організація геному, ISSR- та IRAP-ПЛР, соматоклональна мінливість, культура тканин *in vitro*, рослини-регенеранти.

## АННОТАЦІЯ

**Навроцкая Д.А. Изменчивость генома *Deschampsia antarctica* E. Desv. в природе и культуре *in vitro*.** – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.22 – молекулярная генетика. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2017.

Диссертация посвящена исследованию особенностей изменчивости генома антарктического злака *D. antarctica*, происхождением из южного края распространения вида в Прибрежной Антарктике, в природе и культуре *in vitro*.

Установлено число хромосом *D. antarctica* из региона Аргентинских островов Морской Антарктики и выявлено новые формы хромосомного полиморфизма. Определён размер генома (2C/пг) отличающихся по числу хромосом растений. Показано отсутствие зависимости между установленной изменчивостью по числу хромосом растений *D. antarctica* исследуемых генотипов и уровнем их молекулярно-генетических различий. Исследованы структурные особенности кариотипа вида: установлено локализацию генов 5S рРНК и 45S рРНК, теломерных и центромерных повторяющихся последовательностей; подтверждено идентичность гипотриплоидного генотипа и структурную целосность В-хромосом. Показано сохранения генетических характеристик на молекулярно-генетическом и цитогенетическом уровне у растений-клонов при микроклональном размножении и длительном культивировании *in vitro*. Проанализированы особенности цитогенетической изменчивости в каллусных тканях, полученных от различных по числу хромосом растений. Получены растения-регенеранты *D. antarctica* непрямого происхождения, и обнаружено, что, независимо от плоидности исходного экспланта, в их пролиферативном пуле преобладали диплоидные клетки.

**Ключевые слова:** *Deschampsia antarctica* E. Desv., изменчивость генома, генетическое разнообразие, хромосомный полиморфизм, В хромосомы, размер генома (2C), флуорисцентная гибридизация *in situ* (FISH), структурная организация генома, ISSR- и IRAP-ПЦР, соматическая изменчивость, культура тканей *in vitro*, растения-регенеранты.

## SUMMARY

**Navrotska D.O. *Deschampsia antarctica* E. Desv. genome variability in nature and culture *in vitro*.** – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.22 – Molecular Genetics. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017.

The thesis is devoted to the investigation of the genome variability of Antarctic hairgrass *D. antarctica*, originating from the southern edge of species distribution in the maritime Antarctic, as in nature, as well under the cultivation in experimental *in vitro* conditions.

It is established that the karyotype of most of *D. antarctica* plants from the Argentine islands region of maritime Antarctic (Ukrainian Antarctic Station Vernadsky Research Base) have a typical chromosome set of  $2n=26$ , and consists of 13 pairs of chromosomes of 3-10  $\mu\text{m}$  in size. Moreover, new forms of chromosome polymorphism, plants with hypotriploidy, mixoploidy and B chromosomes, were found for the first time.

The 2C DNA content (pg) of *D. antarctica* plants, which differ by the number of chromosomes, was determined. The DNA amount of diploid plants was in average 10.88 pg, the 2C of specimen with B chromosomes was within the range of values obtained for diploids (10.86 pg), and hypotriploid was characterized by 1.5 times the value of diploids (16.46 pg).

The absence of dependence between the chromosome number variability of investigated *D. antarctica* plants and the level of their molecular genetic differences by the used PCR markers was revealed. It was established that differences between diploids and hypotriploid, or genotype with B chromosomes, do not exceed the level of molecular genetic variability revealed between the diploids only.

The structural features of the *D. antarctica* karyotype were investigated: the localisation of the 5S rRNA and 45S rRNA genes, telomeric and centromeric repeating sequences were determined. The differences in the localization of rRNA genes in the karyotypes of plants with diploid and hypotriploid chromosome set were revealed. The nature of hypotriploid genotype and structural integrity of B chromosomes have been confirmed by the FISH technique. Karyotype variability

detected in hypotriploid and genotype with B chromosomes confirms the instability of *D. antarctica* genome and demonstrates possible changes of its structure.

The preservation the genetic characteristics of plants during microclonal propagation and *in vitro* long-term cultivation was shown. The absence of difference at the molecular-genetic and cytogenetic levels was detected as between clones of plants each group of individual genotypes, as between clones and parent plants: plants originating from the diploid ancestor remained diploid, mixoploids retained the cells with different chromosome numbers, but their ratios varied depending from passage.

The peculiarities of cytogenetic variability in the *D. antarctica* callus tissues obtained from plants with different chromosome number were determined for the first time. The instability by the number of chromosomes was determined: proportion of cells with different level of ploidy varied from passage to passage in each of the studied callus variant.

The modal class was formed by diploid and/or cells with near-diploid chromosome set, regardless the karyotype of ancestor (diploid, with B chromosomes, hypotriploid). Obtained data indicated the presence of chromosomal variability in the callus tissues cells at the early stages of cultivation, and confirm the preservation the cytogenetic features in diploid genotypes of *D. antarctica*.

*D. antarctica* indirect regenerants were obtained. It was demonstrated that ability to regenerate is inherent both for diploid and hypotriploid genotypes. The diploid cells prevailed in all investigated regenerants regardless of the ploidy of donor plant. Obtained results indicate that the diploid cells in a genetically heterogeneous cell population show enhanced ability to form regenerants and enhanced genomic instability of hypotriploid genotype.

This research is a part of complex assessment the state of vegetation in the maritime Antarctic region, and the frame for further monitoring the status of Antarctic ecosystems, which are under the impact of human activity and climate change in this part of the planet. The usage of cytogenetic, molecular and biotechnological approaches enabled to obtain data about the variability and selection in marginal populations of *D. antarctica*, and also allowed to investigate the adaptation of natural, model and artificial cell systems to extreme existence conditions.

**Keywords:** *Deschampsia antarctica* E. Desv., genomic variability, genetic diversity, chromosomal polymorphism, B chromosomes, genome size (2C), fluorescent *in situ* hybridization (FISH), structural organization of genome, ISSR- and IRAP-PCR, somaclonal variation, tissue culture *in vitro*, plant regenerants.