НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

НАВРОЦЬКА Дар'я Олександрівна

УДК 575.22: 582.923.1 + 576.5

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.22 – молекулярна генетика

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Д.О. Навроцька

(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник: **Кунах Віктор Анатолійович**, доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України

Київ – 2018

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 та генетики Національної Академії Наук України, Київ, 2018.

Географічно-периферійні популяції організмів характеризуються низьким рівнем генетичного різноманіття і високими показниками генетичної диференціації порівняно із популяціями з центральних частин ареалу. Нові форми чи навіть види організмів на краю ареалу можуть виникати внаслідок мінливості геному (в тому числі перебудов у каріотипі) за дії інтенсивного тиску добору під впливом умов навколишнього середовища (Sagarin, Gaines, 2002; Eckert *et al*., 2008; Belyayev, Raskina, 2013). Дослідження і аналіз геному рослин Антарктичної екосистеми, що є моделлю адаптації організмів до полярних екстремальних умов, має значне фундаментальне значення. Тому представлена дисертаційна робота присвячена дослідженню особливостей мінливості геному єдиного антарктичного злаку *D. antarctica*, походженням з південного краю поширення виду в Морській Антарктиці.

Встановлено, що каріотип більшості рослин *D. antarctica* з регіону Аргентинських островів Морської Антарктики (район Української антарктичної станції «Академік Вернадський») має типовий для виду набір хромосом 2n=26, тобто складається з 13 пар хромосом розміром 3–10 мкм. Разом з тим, вперше виявлено нові форми хромосомного поліморфізму – рослини з міксоплоїдією, анеуплоїдією, гіпотриплоїдією та додатковими хромосомами у каріотипі. У гіпотриплоїдного генотипу Y66 (2n=36-39)

розмах мінливості за числом хромосом становив від 13 до 39 хромосом; модальний клас формували клітини з 36 хромосомами, хоча анеуплоїдні клітини (до 25 %) та невеликий відсоток диплоїдних та гаплоїдних клітин теж було виявлено. Розмах мінливості за числом хромосом у рослин генотипу з додатковими хромосомами DAR12 (2n=26+0-2B) був у межах від 13 до 28 хромосом; в проліферативному пулі переважали клітини з 26 хромосомами; частка анеуплоїдних клітин складала від 7,7 до 26,7 %. Поява таких рослин в популяції може бути наслідком підвищеної геномної нестабільності, зумовленої екстремальними умовами зростання чи вегетативним способом розмноження.

Визначено розмір геному (пг/2С) рослин *D. antarctica*, що відрізнялись за числом хромосом. Середній розмір геному диплоїдних рослин становив 10,88 пг/2С. Ядерний вміст ДНК у рослин з В-хромосомами в каріотипі знаходився в межах діапазону значень, отриманих для диплоїдних рослин (10,86 пг/2С), а гіпотриплоїдний генотип характеризувався в 1,5 рази більшим значенням (16,46 пг/2С). Порівняння отриманих значень з уже відомими для представників роду з інших місць зростання дозволяє стверджувати про стабільність розміру геному у видів роду *Deschampsia* та *D. antarctica* зокрема.

Для комплексної оцінки мінливості геному рослин з природи, поряд із каріологічними дослідженнями, було проведено порівняльний молекулярно-генетичний аналіз рослин *D. antarctica* з різним числом хромосом із використанням ISSR- та IRAP-маркерів. Встановлено, що відмінності між диплоїдами та гіпотриплоїдом, чи генотипом з додатковими хромосомами, не перевищують відмінностей між лише диплоїдними генотипами.

Досліджено структурні особливості каріотипу *D. antarctica*: встановлено локалізацію генів 5S рРНК та 45S рРНК, теломерних і центромерних повторюваних послідовностей на хромосомах рослин виду. Виявлено відмінності в розташуванні локусів генів рРНК у рослин з диплоїдним та гіпотриплоїдним хромосомним набором. За допомогою методу

флуоресцентної гібридизації *in situ* підтверджено природу гіпотриплоїдного генотипу та наявність В-хромосом у каріотипі рослин (локалізація центромерних та теломерних ділянок у структурі додаткових хромосом вказує на їх структурну цілісність). Виявлена каріотипова мінливість, детектована у гіпотриплоїда та генотипу з В-хромосомами, вказує на основні можливі зміни в його структурі.

Показано збереження генетичних характеристик у рослин-клонів в процесі мікроклонального розмноження та тривалого культивування *in vitro*. Не виявлено відмінностей на молекулярно-генетичному та цитогенетичному рівні ані між рослинами кожної з груп окремих генотипів, ані з вихідною особиною. Рослини, які походили від диплоїдного предка, залишались диплоїдними, міксоплоїди зберігали клітини з різним числом хромосом, але їх співвідношення змінювалось в залежності від пасажу.

Вперше з'ясовано особливості цитогенетичної мінливості в калюсних тканинах *D. antarctica*, отриманих від різних за числом хромосом генотипів рослин. У клітинах калюсних тканин виявлено нестабільність числа хромосом: частка клітин з певним рівнем плоїдності змінювалась від пасажу до пасажу у кожному дослідженому варіанті калюсу. Культури, отримані від гіпотриплоїда характеризувались наявністю значної частки анеуплоїдних (52,6 %) та поліплоїдних клітин (18,6 %). А у калюсі, отриманому від генотипу з В-хромосомою, спостерігали збільшене число анеуплоїдних клітин (47,0 %), порівняно з іншими культурами диплоїдного походження. Встановлено, що в культурі тканин *D. antarctica* на перших етапах культивування незалежно від стану каріотипу вихідної рослини (диплоїд, міксоплоїд, гіпотриплоїд) модальний клас складали диплоїдні та/або клітини з білядиплоїдним числом хромосом. Отримані експериментальні дані свідчать про наявність хромосомної мінливості в клітинах калюсних культур *D. antarctica* на початкових етапах культивування та підтверджують явище збереження цитогенетичних особливостей у рослин диплоїдних генотипів.

Шляхом непрямого органогенезу *in vitro* отримано рослини-регенеранти *D. antarctica*, та досліджено їх на наявність сомаклональної мінливості. Утворення регенерантів спостерігалося на калюсних тканинах як диплоїдних, так і гіпотриплоїдного генотипів. Встановлено, що у всіх регенерованих рослин, незалежно від плоїдності вихідного експланту, переважали клітини з диплоїдним числом хромосом. Однак, у одного з регенерантів диплоїдного походження спостерігали анеуплоїдію, а у всіх сомаклонів гіпотриплоїдного походженням було виявлено мінливість за числом хромосом з переважанням диплоїдних клітин. Таким чином, показано, що у генетично-гетерогенній клітинній популяції клітини з диплоїдним хромосомним набором імовірно мають підвищену здатність до органогенезу та утворення регенерантів, хоча анеуплоїдні або міксоплоїдні рослини теж можуть утворюватись.

Отримані результати для *D. antarctica* з південного краю поширення в районі Аргентинських островів Морської Антарктики підтверджують концепцію про край ареалу виду. А проведене дослідження є складовою частиною комплексної оцінки стану рослинності в Антарктичному регіоні та підгрунтям для подальшого моніторингу стану антарктичних екосистем за дії впливу людської дільності та кліматичних змін в цьому регіоні планети. Використання молекулярних, цитогенетичних та біотехнологічних підходів дає підстави застосовувати отримані дані щодо особливостей мінливості і добору в популяціях рослин *D. antarctica* як основи адаптації організмів, а також дозволяє вивчати пристосування природних, модельних і штучних клітинних систем до екстремальних умов існування. Створена протягом дослідження колекція генотипів рослин *in vitro* та калюсних культур *D. antarctica* має особливу цінність як перспективний модельний об’єкт для подальших молекулярно-генетичних досліджень та може мати прикладне значення для розробок в біотехнологічному напрямку.

Ключові слова: *Deschampsia antarctica* E. Desv., мінливість геному, генетичне різноманіття, хромосомний поліморфізм, B-хромосоми, розмір

геному (2С), флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH), структурна організація геному, ISSR- та IRAP-ПЛР, сомаклональна мінливість, культура тканин тканин *in vitro*, рослини-регенеранти.

Список публікацій здобувача:

1. **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 *Descampsia antarctica* Desv. from the Argentine Islands of the Maritime Antarctic region // Ukrainian Antarctic Journal. – 2014. – № 13. – P. 185-191.
2. Твардовська М.О., Андрєєв І.О., Амосова А.В., Спірідонова К.В., **Навроцька Д.О.**, Саматадзе Т.Е., Зощук С.А., Муравенко О.В., Кунах В.А. Вивчення геномів рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з різних локалітетів Прибережної Антарктики за допомогою хромосомних та молекулярних маркерів // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2014. – Т. 14. – С. 133-137.
3. **Навроцька Д.О.**, Твардовська М.О., Андрєєв І.О., Загричук О.М., Парнікоза І.Ю., Дробик Н.М., Кунах В.А. Хромосомний поліморфізм рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з району Аргентинських островів (Прибережна Антарктика) // Вісник Українського товариства генетиків та селекціонерів. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 184-190.
4. Спірідонова К.В. , Андрєєв І.О. , Загричук 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. 36-43.
5. Кунах В.А., **Навроцька Д.О.**, Твардовська М.О., Андрєєв І.О. Особливості хромосомної мінливості в культурі тканин рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з різним числом хромосом // Вісник

Українського товариства генетиків та селекціонерів. – 2016. – Т. 14, № 1 – С. 36-43.

6. Парнікоза І.Ю., Мірюта Н.Ю., Ройек М., Бетєхтін А.А., Пороннік О.О., Мирюта Г.Ю., **Навроцька Д.О.**, Хастерок Р., Кунах В.А. Рослини *Deschampsia antarctica* E. Desv. з різним числом хромосом в умовах вирощування *in vitro*. Звязок розміру геному та двох показників пристосовуваності // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2017. – Т. 20 – С. 304-309.
7. **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. Comprehensive characterization of cultivated *in vitro Deschampsia antarctica* E. Desv. plants with different chromosome numbers // Cytology and Genetics. – 2017. – Vol. 51, № 6. – P. 422-431.
8. **Навроцька Д.О.**, Твардовська М.О., Кунах В.А. Молекулярно-цитогенетичний аналіз рослин *Deschampsia antarctica* з різних локалітетів Прибережної Антарктики // Матеріали І Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю “Сучасні проблеми викладання та наукових досліджень у ВНЗ України”. – Дніпропетровськ, Україна. – 2014. – С. 42-44.
9. **Navrotska D.O.**, Twardovska M.O., Andreev I.O., Betekhtin A.A., Hasterok R., Kunakh V.A. Cytogenetic and molecular analisys of *Deschampsia antarctica* Desv. from the Maritime Antarctic // Abstract of 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.
10. Kunakh V., **Navrotska D.**, Twardovska M., Hasterok R., Betekhtin A., Andreev I., Parnikoza I. Cytogenetic features of *Deschampsia antarctica* Desv. plants in different microclimate condition of the Argentine Islands of Maritime Antarctic // Materials of 26-th International Congress on Polar

Research “High latitude and high mountains: driver of or driven by global change?”. – Munich, Germany. – 2015. – P. 92.

11. **Navrotska D.O.**, Twardovska M.O., Andreev I.O., Betekhtin A.A., Hasterok R., Kunakh V.A. Karyotypic variation in *Deschampsia antarctica* Desv. plants and tissue culture // Abstract of the 5-th International Conference for Young Scientists “CYS-2015”. – Kyiv, Ukraine. – 2015. – P. 89.
12. **Navrotska D.O.**, Twardovska M.O., Andreev I.O., Kunakh V.A. Cytogenetic studies of *Deschampsia antarctica* Desv. tissue culture // Materials of the Ukrainian Society of Cell Biology International Conference “Advances in cell biology and biotechnology”. – Lviv, Ukraine. – 2015. – P. 127.
13. **Navrotska D.**, Andreev I., Twardovska M., Kunakh V. Genome variability of *Deschampsia antarctica* Desv. plants with different chromosome numbers in tissue culture // Materials of the X Parnas Conference. Young Scientist Forum “Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine”. – Wroclaw, Poland. – 2016. – Vol. 63, Sup.1. – P. 14.
14. Олійник М., **Навроцька Д.**, Пороннік О., Парнікоза І. Цитологічний аналіз *Deschampsia antarctica* Desv. з острова Вінтер (Прибережна Антарктика) // Матеріали XII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і Поступ Біології”. – Львів, Україна. – 2016. – С. 131-132.
15. **Navrotska D.**, Twardovska M., Andreev I., Parnikoza I., Betekhtin A., Hasterok R., Kunakh V. Pecularities of genome variability of antarctic hairgrass *Deschampsia antarctica* Desv. from the Maritime Antarctic // Materials of the 41-st FEBS Congress “Molecular and System Biology for a Better Life”. – Ephesus/ Kusadasi, Turkey. – 2016. – Vol. 283, Sup.1. – P. 335.
16. **Navrotska D.**, Andreev I., Kunakh V. Research of genome plasticity the *Deschampsia antarctica* Desv. plants from populations the Argentine Islands region of Maritime Antarctic // Abstract of the Mind the Gap 5 Conference

"Bridging the gap between theoretical and empirical population genetics", Vienna, Austria. – 2016. – P. 12.

17. **Навроцька Д.О.**, Андрєєв І.О., Парнікоза І.Ю., Пороннік О.О., Кунах В.А. Каріологічна гетерогенність рослин *Deschampsia antarctica* E. Desv. в регіоні Аргентинських островів Морської Антарктики // Матеріали VIII Міжнародної Антарктичної Конференції, присвяченої 25-річчю приєднання України до договору про Антарктику – Київ, Україна. – 2017. – С. 80-81.
18. Спірідонова К.В., Андрєєв І.О., **Навроцька Д.О.**, Загричук О.М., Дробик Н.М., Кунах В.А. Цито- та молекулярно-генетичні дослідження мікроклонально розмножених рослин *Deschampsia antarctica* E. Desv. за тривалого культивування *in vitro* // Матеріали VIII Міжнародної Антарктичної Конференції, присвяченої 25-річчю приєднання України до договору про Антарктику. – Київ, Україна. – 2017. – С. 98-99.
19. **Навроцька Д.О.**, Андрєєв І.О., Кунах В.А. Цитогенетичне дослідження рослин-регенерантів *Deschampsia antarctica* E. Desv. // Матеріали міжнародної конференції молодих учених "Актуальні проблеми ботаніки та екології". – Луцьк, Україна. – 2017. – С. 77.
20. **Navrotska D.**, Andreev I., Betekhtin A., Rojek M., Hasterok R., Kunakh V. Peculiarities of genome variability of *Deschampsia antarctica* E. Desv. from the marginal populations of Maritime Antarctic // Abstract of the EMBO Workshop "Evolution in the time of genome architecture". – Naples, Italy. – 2017. – P. 36.

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 of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

Geographically-peripheral populations of organisms are characterized by a low level of genetic diversity and high level of genetic differentiation, compared with populations from the central parts of the range. New forms or even species of organisms can occur due to genome variability (including changes in the karyotype) under the action of intensive pressure of selection and the influence of environmental conditions on the edge of the range (Sagarin, Gaines, 2002; Eckert *et al*., 2008; Belyayev, Raskina, 2013). Study and analysis the genome of plants typical for Antarctic ecosystem, which might be the model of adaptation to polar extremes, is a particular fundamental importance. Therefore, this dissertation is devoted to the study the genome variability of Antarctic hairgrass *D. antarctica* originating from the southern edge of species distribution in the maritime Antarctic.

It is established that the karyotype of most of *D. antarctica* plants from the Argentine islands region of maritime Antarctic (region of the Ukrainian Antarctic Station “Vernadsky Research Base”) has a typical set of chromosomes 2n=26, and consists of 13 pairs of chromosomes of 3-10 μm in the size. Moreover, new forms of chromosomal polymorphism – plants with mixoploidy, aneuploidy, hypotriploidy and B chromosomes were found for the first time.

The genome size (pg/2C) of *D. antarctica* plants, which differ by the number of chromosomes, was determined. The average genome size of the diploid plants was 10.88 pg/2C. The nuclear DNA content of plants with B chromosomes was

within the range of values obtained for diploid plants (10,86 пг/2С), and hypotriploid was characterized by 1.5 times the value (16,46 пг/2С). Comparison of the obtained values with those already known for species of the genus from other growth locations suggests on stability of genome size in species of the genus *Deschampsia* and *D. antarctica* in particular.

For the comprehensive assessment of genome variability of plants in addition to the cytological we carried out comparative molecular genetic study of the *D. antarctica* plants with different chromosome numbers using ISSR- and IRAP-markers. It was established that differences between diploids and hypotriploid, or genotype with B chromosomes do not exceed the level of molecular genetic variability between diploid genotypes only.

The structural features of *D. antarctica* karyotype were investigated: the localization of 5S rRNA and 45S rRNA genes, telomeric and centrometric repeating sequences in the karyotype were determined. The differences in the localization of rRNA genes in the karyotypes of plants with diploid and hypotriploid chromosomal set were revealed. Using the fluorescence *in situ* hybridization technique, the nature of the hypotripoid genotype and the presence of B chromosomes in the karyotype have been confirmed (the localization of centromeric and telomeric regions in the structure of B chromosomes indicates on their integrity). Karyotype variability detected in hypotriploid and genotype with B chromosomes demonstrates the basic possible changes of its structure.

A study of the somaclonal variability of *D. antarctica* during *in vitro* cultivation was carried out. Preservation of genetic characteristics in clones of plants during micropropagation and long-term cultivation *in vitro* was demonstrated. Differences at the molecular-genetic and cytogenetic levels as between plants of each group of individual genotypes, as with the parent plant were not detected. Plants that originated from the diploid ancestor remained as diploids, mixoploids retained cells with different chromosome numbers, but their ratios varied depending on the passage.

The peculiarities of cytogenetic variability in the *D. antarctica* callus tissues obtained from plant genotypes differ by the chromosome number were determined for the first time. In cells of the investigated tissues, the instability by the number of chromosomes was determined: the proportion of cells with different level of ploidy varied from passage to passage in each of the studied variant. Culture derived from hypotriploid genotype was characterized by a high frequency of both aneuploid (52.6 %) and polyploid cells (18.6 %). And in the callus derived from the genotype with additional chromosomes, the higher amount of aneuploid cells (47.0%) compared to other cultures of diploid origin were observed. It was established that the modal class was formed by diploid and/or cells with near-diploid chromosome number in the tissue culture of *D. antarctica* at the first stages of cultivation regardless the karyotype of original plant (diploid, mixoploid, hypotriploid). Obtained experimental data indicates on the presence of chromosomal variability in the cells of callus tissues at the early stages of cultivation, and confirm the preservation the cytogenetic features in plants of diploid genotypes.

D. antarctica regenerants were obtained by *in vitro* indirect organogenesis and were investigated on the presence of a somaclonal variability. It was demonstrated that ability to regenerate is inherent both for diploid and hypotriploid genotypes. The cells with diploid number of chromosomes prevailed in all investigated plants regardless the ploidy of explants. However, one of the regenerants of diploid origin demonstrated aneuploidy, while variability in the number of chromosomes with the prevalence of diploid cells was detected in the remaining somaclones of hypotriploid origin. Thus, it has been shown that the ability to organogenesis and formation of regenerants are more characteristic for diploid cells in a genetically heterogeneous cell population, although aneuploid and mixoploid regenerants can also be formed.

Obtained results confirm the conception the species edge of the range and demonstrate the presence a low level genetic diversity in the populations of *D. antarctica* from the southern edge of the distribution at the Argentine Islands

region of maritime Antarctic. This research is a part of complex assessment the state of vegetation in the Antarctic and the frame for further monitoring the status of Antarctic ecosystems, which are under the impact of human activity and climate change in this region of the planet. The usage of molecular, cytogenetic 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. Collection of *D. antarctica* genotypes and tissue cultures *in vitro* that were obtained during the study, have a particular value as a promising model for subsequent molecular genetic investigations and may have an applied impact for development in the biotechnological direction.

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

List of scientific publications published on the topic of the dissertation:

1. **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 *Descampsia antarctica* Desv. from the Argentine Islands of the Maritime Antarctic region // Ukrainian Antarctic Journal. – 2014. – № 13. – P. 185-191.
2. Twardovska M.O., Andreev I.O., Amosova A.V., Spiridonova K.V., **Navrotska D.O.**, Satamadze T.E., Zoschuk S.A., Muravenko O.B., Kunakh V.A. Study of genomes *Deschampsia antarctica* Desv. from different localities of Maritime Antarctic using chromosomal and molecular markers // Factors in Experimental Evolution of Organisms. – 2014. – № 14. – P. 133-137.

3. **Navrotska D.O.**, Twardovska M.O., Andreev I.O., Zahrychuk O.M., Parnikoza I.Yu., Drobyk N.M., Kunakh V.A. Chromosomal polymorhism of *Deschampsia antarctica* Desv. plants from Argentine Islands region (Maritime Antarctic) // The Bulletin of Vavilov Society of Geneticist and Breeders of Ukraine. – 2014. – Vol. 12, № 2. – P. 184-190.
4. Spiridonova K.V., Andreev I.O., Zagrichuk O.M., **Navrotska D.O.**, Twardovska M.O., Drobyk N.M., Kunakh V.A. Genetic stability of micropropagated plants of *Deschampsia antarctica* Desv. during long-term *in vitro* culture // Plant Physiology and Genetics. – 2016. – Vol. 48, № 6 – P. 36-43.
5. Kunakh V.A., **Navrotska D.O.**, Twardovska M.O., Andreev I.O. Peculiarities of chromosomal variability in cultured tissues of *Deschampsia antarctica* Desv. plants with different chromosome numbers // The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine. – 2016. – Vol. 14, № 1 – P. 36-43.
6. Parnikoza I.Yu., Miryuta N.Yu., Rojek M., Betekhtin A.A., Poronnik O.O., Myryuta G.Yu., **Navrotska D.O.**, Hasterok R., Kunakh V.A. *Deschampsia antarctica* E. Desv. plants with different chromosome number cultivated *in vitro*. Relations between genome size and two adaptability indices // Factors in Experimental Evolution of Organisms. – 2017. – Vol. 20 – P. 304-309.
7. **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. Comprehensive characterization of cultivated *in vitro Deschampsia antarctica* E. Desv. plants with different chromosome numbers // Cytology and Genetics. – 2017. – Vol. 51, № 6. – P. 422-431.
8. **Navrotska D.O.**, Twardovska M.O., Kunakh V.A. Molecular-cytogenetic analysis of *Deschampsia antarctica* plants from different localities of Maritime Antarctic // Proceedings of I Ukrainian scientific and practical conference for young scientists and students with international participation

"Modern Problems of Teaching and Research in Higher Education Institutions of Ukraine". – Dnipropetrovsk, Ukraine. – 2014. – P. 42-44.

9. **Navrotska D.O.**, Twardovska M.O., Andreev I.O., Betekhtin A.A., Hasterok R., Kunakh V.A. Cytogenetic and molecular analisys of *Deschampsia antarctica* Desv. from the Maritime Antarctic // Abstract of 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.
10. Kunakh V., **Navrotska D.**, Twardovska M., Hasterok R., Betekhtin A., Andreev I., Parnikoza I. Cytogenetic features of *Deschampsia antarctica* Desv. plants in different microclimate condition of the Argentine Islands of Maritime Antarctic // Materials of 26-th International Congress on Polar Research "High latitude and high mountains: driver of or driven by global change?". – Munich, Germany. – 2015. – P. 92.
11. **Navrotska D.O.**, Twardovska M.O., Andreev I.O., Betekhtin A.A., Hasterok R., Kunakh V.A. Karyotypic variation in *Deschampsia antarctica* Desv. plants and tissue culture // Abstract of the 5-th International Conference for Young Scientists "CYS-2015". – Kyiv, Ukraine. – 2015. – P. 89.
12. **Navrotska D.O.**, Twardovska M.O., Andreev I.O., Kunakh V.A. Cytogenetic studies of *Deschampsia antarctica* Desv. tissue culture // Materials of the Ukrainian Society of Cell Biology International Conference "Advances in cell biology and biotechnology". – Lviv, Ukraine. – 2015. – P. 127.
13. **Navrotska D.**, Andreev I., Twardovska M., Kunakh V. Genome variability of *Deschampsia antarctica* Desv. plants with different chromosome numbers in tissue culture // Materials of the X Parnas Conference. Young Scientist Forum "Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine". – Wroclaw, Poland. – 2016. – Vol. 63, Sup. 1. – P. 14.
14. Oliinyk M., **Navrotska D.**, Poronnik O., Parnikoza I. Cytogenetic analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. from the Winter Island (Maritime Antarctic) // Proceedings the XII International Scientific Conference for Students and PhD

Students “Youth and Progress of Biology”. – Lviv, Ukraine. – 2016. – P. 131-132.

15. **Navrotska D.**, Twardovska M., Andreev I., Parnikoza I., Betekhtin A., Hasterok R., Kunakh V. Pecularities of genome variability of antarctic hairgrass *Deschampsia antarctica* Desv. from the Maritime Antarctic // Materials of the 41-st FEBS Congress “Molecular and System Biology for a Better Life”. – Ephesus/ Kusadasi, Turkey. – 2016. – Vol. 283, Sup. 1. – P. 335.
16. **Navrotska D.**, Andreev I., Kunakh V. Research of genome plasticity the *Deschampsia antarctica* Desv. plants from populations the Argentine Islands region of Maritime Antarctic // Abstract of the Mind the Gap 5 Conference “Bridging the gap between theoretical and empirical population genetics”, Vienna, Austria. – 2016. – P. 12.
17. **Navrotska D.O.**, Andreev I.O., Parnikoza I.Yu., Poronnik O.O., Kunakh V.A. Karyological heterogeneity in *Deschampsia antarctica* E. Desv. from Argentine Islands region of Maritime Antarctic // Proceedings the VIII International Antarctic Conference, dedicated to 25-th anniversary of accession Ukraine to the Antarctic Treaty. – Kyiv, Ukraine. – 2017. – P. 80-81.
18. Spiridonova K.V., Andreev I.O., **Navrotska D.O.**, Zahrychuk O.M., Drobyk N.M., Kunakh V.A. Cytogenetic and molecular genetic study of micropropagated plants of *Deschampsia antarctica* E. Desv. under long term culture condition // Proceedings the VIII International Antarctic Conference, dedicated to 25-th anniversary of accession Ukraine to the Antarctic Treaty. – Kyiv, Ukraine. – 2017. – P. 98-99.
19. **Navrotska D.O.**, Andreev I.O., Kunakh V.A. Cytogenetic study of *Deschampsia antarctica* E. Desv. regenerated plants // Proceedings International Conference for Young Scientists “Actual Problems of Botany and Ecology”. – Lutsk, Ukraine. – 2017. – P. 77.

20. **Navrotska D.**, Andreev I., Betekhtin A., Rojek M., Hasterok R., Kunakh V. Peculiarities of genome variability of *Deschampsia antarctica* E. Desv. from the marginal populations of Maritime Antarctic // Abstract of the EMBO Workshop “Evolution in the time of genome architecture”. – Naples, Italy. – 2017. – P. 36.

ЗМІСТ

ЗМІСТ 18
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 20
ВСТУП 22
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 29
1.1. Мінливість геному рослин в стресових умовах зростання 29
1.1.1. Дуплікація геному (поліплоїдія) та її наслідки для еволюційного успіху рослин 31
1.1.2. Значення додаткових або В-хромосом у каріотипі рослин 37
1.2. Культура *in vitro* як модель стресового впливу на геном рослин 41
1.3. *Deschampsia antarctica* E. Desv. – один із представників судинних рослин Антарктики 44
1.3.1.Таксономічне положення та поширення виду 45
1.3.2.Морфологічні особливості та способи репродукції *D. antarctica* 46
1.3.3.Молекулярно-генетичні дослідження внутрішньовидового різноманіття *D. antarctica* 49
1.4. Характеристика каріотипу представників роду *Deschampsia* P. Beauv. 54
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ 57
2.1. Об’єкти досліджень 57
2.2. Культивування рослин в умовах *in vitro* 60
2.2.1. Отримання асептичних рослин 60
2.2.2. Отримання та культивування рослин-клонів 61
2.2.3. Індукція та культивування калюсних культур 63
2.2.4. Отримання та культивування рослин-регенерантів 64
2.3. Цитогенетичний аналіз 64
2.4. Флуоресцентна гібридизація *in situ* 66
2.4.1. Приготування препаратів метафазних хромосом з апікальної меристеми кореня 67

2.4.2. ДНК-зонди та їх мічення 67
2.4.3. Денатурація та гібридизація 69
2.4.4. Імунодетекція ДНК-зондів 70
2.4.5. Візуалізація та обробка зображень 70
2.5. Проточна цитофлюориметрія 71
2.6. Молекулярно-генетичний аналіз 72
2.6.1. Виділення ДНК із рослинних тканин 72
2.6.2. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) 73
2.6.3. Електрофорез ДНК в агарозному гелі 74
2.7. Статистичні методи обробки результатів досліджень 75
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ 76
3.1. Генетичні дослідження рослин *D.antarctica* 76
3.1.1. Дослідження цитогенетичних особливостей каріотипу виду 76
3.1.2. Визначення розміру геному рослин *D. antarctica* 84
3.1.3. Молекулярно-генетичні дослідження мінливості геному 87
3.2. Дослідження структурних особливостей каріотипу *D. antarctica*: аналіз хромосомної локалізації генів 5S рРНК та 45S рРНК, теломерних та центромерних повторів 91
3.3. Вивчення мінливості геному *D.antarctica* в умовах *in vitro* 97
3.3.1. Дослідження генетичної мінливості рослин-клонів за мікроклонального розмноження 97
3.3.2. Особливості генетичної мінливості у культурі тканин 103
3.3.3. Дослідження сомаклональної мінливості рослин-регенерантів 111
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ 119
ВИСНОВКИ 130
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 132
ДОДАТОК А 157
ДОДАТОК Б 161

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БАП – 6-бензиламінопурин

B_5 – живильне середовище Гамборга-Евелей

$ГК_3$ – гіберелова кислота

год – година

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

дНТФ – дезоксинуклеотид трифосфат (deoxyribonucleotide triphosphate)

ЕДТА – етилен-диамін-тетраоцтова кислота

ІОК – індолілоцтова кислота

Кін – кінетин (6-фурфуриламінопурин)

МС – живильне середовище Мурасіге-Скуга

МГЕ – мобільні генетичні елементи

НОК – нафтилоцтова кислота

об./хв – оберти за хвилину

пг – пікограм

ПГД – повногеномна дуплікація геному (whole genome duplication, WGD)

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

п.н. – пара нуклеотидів

рДНК – рибосомна ДНК

РНКаза – рибонуклеаза

сек – секунда

т.п.н. – тисяча пар нуклеотидів

УФ – ультрафіолетове випромінювання

хв – хвилина

ЦТАБ – цетил-триметил-амоніум-бромід

DAPI – діаміно 2- феніліндолдихлорид (4,6′ -diamino-2-

phenylindoldichydrochloride)

FISH – флуоресцентна гібридизація *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization)

FITC – флюоресцеїн ізотіоцианат (fluorescein isothiocyanate)

IRAP – поліморфізм локусів ДНК, що фланковані ділянками ретроелементів (inter retroelement amplified polymorphism)

ISSR – поліморфізм локусів ДНК, що франковані мікросателіт-ними повторами (inter simple sequence repeats)

SSC – цитратний буфер (saline sodium citrate buffer)

SDS – додецилсульфат натрію (sodium dodecyl sulfate)

Tween – полісорбат, неіонна поверхнево-активна речовина

ВСТУП

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 [1, 2]. В той же час, в маргінальних угрупованнях, які перебувають під впливом нетипових екологічних умов, можуть відбуватися інтенсивні процеси видоутворення, які сприяють виникненню і підтриманню біологічного різноманіття [3, 4]. Нові форми чи навіть види організмів на краю ареалу можуть виникати внаслідок мінливості геному (в тому числі перебудов у каріотипі) за дії інтенсивного тиску добору під впливом умов навколишнього середовища [5].

Рослини, що є невід'ємною частиною всіх екосистем, ведуть прикріплений спосіб життя, тому в процесі еволюції в них виробились механізми адаптації до різних умов існування. Деякі види здатні виживати в регіонах малопридатних для нормального існування (при екстремально-високих значеннях температури, УФ-радіації, обмеженому доступі води, засоленні ґрунтів та дії інших стресорів) [6]. 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, тоді 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, яка є джерелом для добору і еволюції виду [7, 8].

На особливий інтерес заслуговує антарктична екосистема. Антарктика – ізольований континент з найекстремальнішими кліматичними умовами на планеті. Це «природна лабораторія» для досліджень, які неможливо повторити де-інде на планеті. Наземні організми Антарктики, завдяки існуванню на межі можливостей, можуть бути індикатором впливу кліматичних змін. Тому, аналіз і дослідження мінливості геному типових для Антарктики видів рослин має значне фундаментальне значення.

Одним із двох видів судинних рослин, що адаптувались до складних умов існування, є злак щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* E. Desv). Це унікальний вид для вивчення механізмів, що відповідають за пристосування рослинного організму до навколишніх несприятливих умов. Крім того, геном *D. antarctica*, який досі залишається малодослідженим, може бути цінним джерелом генів, пов’язаних із стійкістю та адаптацією до низьких температур, посухи, високого рівня УФ-випромінювання, існування на засолених чи надмірно зволожених 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 додаткових хромосом), зміні морфології та диференційного забарвлення хромосом, а також як мінливість послідовностей ДНК [9]. Тому, зважаючи на вищевказане, актуальним є з’ясувати особливості мінливості геному *D. antarctica* з південного краю ареала виду в Морській Антарктиці на хромосомному та на 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, та Державної цільової науково-технічної програми проведення досліджень в Антарктиці протягом 2011-2020 рр.

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

Для реалізації 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 генетичну мінливість рослин за ISSR- та IRAP-ПЛР аналізу;
4) встановити локалізацію генів 5S рРНК і 45S рРНК, теломерних і центромерних повторів у геномі 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 сомаклональну мінливість у рослин-регенерантів *D. antarctica*.

Об'єкт дослідження – геном рослин виду *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 гібридизація *in situ* (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 (2С/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 регенерантів, отриманих від рослин з різним числом хромосом, та показано домінування клітин із диплоїдним та білядиплоїдним 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 дії впливу людської дільності 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 протягом дослідження колекція генотипів рослин *in vitro* та калюсних культур *D. antarctica* має особливу цінність як перспективний модельний об'єкт для подальших молекулярно-генетичних досліджень та інших біотехнологічних розробок.

В цілому отримані наукові висновки роботи можуть становити інтерес для науково-дослідних установ та вищих навчальних закладів під час викладання лекційних курсів, проведення 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 та д.б.н., проф. Дробик Н.М. 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. Спірідоновою К.В. Результати досліджень опубліковано у спільних наукових працях.

Автором відібрано і критично проаналізовано сучасну зарубіжну та вітчизняну літературу за темою наукового дослідження. Обговорення результатів досліджень і висновків дисертаційної роботи проведено спільно

із науковим керівником – д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України Кунахом В.А., а також із с.н.с., к.б.н. Андрєєвим І.О.

Апробація результатів дисертації. Результати роботи представлено на 15-ти конференціях: IX Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Умань, 22–26 вересня 2014); I 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); IX 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); X міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» та асоційованому з конференцією симпозіумі «Геном рослин VII» (Чернівці, 14–18 вересня 2015); V International Conference for Young Scientists "CYS-2015" (Kyiv, 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 друкованих праць, у тому числі 7 статей у наукових фахових виданнях, що входять до переліку затвердженого Міністерством освіти і науки України, та тези 13 доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій та конгресів.

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

Автор висловлює щиру подяку за допомогу та підтримку під час виконання роботи всім співробітникам відділу генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, співробітникам лабораторії екології та біотехнології Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка, співробітникам відділу анатомії і цитології рослин Сілезького університету (Катовіце, Польща), викладачам факультету природничих наук Національного університету «Києво-Могилянська Академія», та співробітникам Національного антарктичного наукового центру МОН України.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Мінливість геному рослин в стресових умовах зростання

Геном будь-якого живого організму може зазнавати змін, наслідком яких є еволюційні процеси та навіть видоутворення [10]. Найчастіше такі зміни зумовлені стресовими умовами існування. Щоб вижити, живі істоти виробили механізми толерантності, стійкості та ухиляння від дії екстремальних чинників середовища. Толерантність дозволяє витримувати тиск і виживати неушкодженими, стійкість чи резистентність передбачає активну протидію стресу, а ухиляння дозволяє попередити дію будь-якого зовнішнього негативного чинника [9].

Рослини внаслідок прикріпленого способу існування не можуть змінити місце зростання навіть у разі несприятливих змін навколишнього середовища, тому в них виникли механізми адаптації, що діють як на організменому, так і на популяційному рівнях. У відповідь на несприятливі флуктуації екологічних чинників (посуха, затоплення, екстремальна температура, засолення грунтів, несприятлива інтенсивність освітлення, інфікування патогенами, механічні ушкодження) у рослин відбуваються структурні і метаболічні перебудови в організмі.

Стресові умови можуть бути постійної чи випадкової дії. Адаптація рослин до постійного стресу відбувається за дії добору шляхом виникнення морфологічних змін, наприклад, зміни листя на колючки у сукулентів, змін у розташуванні продихів, та спеціалізації тканин. Щоб впоратися з випадковим стресом, рослини вмикають механізми, які передбачають розпізнавання умов, запуск відповідного протидіючого метаболічного шляху, такого як

наприклад, системно набута стійкість проти біотичного стресу чи активація білків теплового шоку. Дослідження таких механізмів відповіді організму на абіотичний стрес і стратегій адаптації викликають підвищений інтерес, адже зміни клімату можуть негативно впливати на поширення і відтворення рослинних видів. Згідно з Міллер та спів. толерантність рослин і механізми їх адаптації можна пояснити тільки враховуючи одночасну дію різних стресових факторів [11, 12] та беручи до уваги весь спектр специфічних відповідей рослин [13, 14].

В основі відомих на сьогодні клітинних і молекулярних механізмів захисту рослин від стресових чинників, адаптивності і гомеостазу на рівні окремого організму лежить явище мінливості геному соматичних клітин рослин. Це проявляється у змінах числа хромосом, розміру геному, повторюваних послідовностей у нормі та за впливу різних біотичних і абіотичних факторів довкілля, адаптивності геномних перетворень, що відбуваються в онтогенезі, і можливості передачі таких змін у поколіннях [9, 15].

Барбара Макклінток у своїй доповіді з нагоди отримання Нобелівської премії 1983 року відмітила, що геном рослин реагує на пошкоджуючі (стресові) впливи включенням таких механізмів, що призводять до перебудов в ньому. Загалом дія стресу може запускати процеси, які викликають збільшення кількості мутацій та інших геномних перебудов [16, 17]. Таке твердження було підтримано й іншими авторами [18, 19, 20, 21]. Макклінток детально описала існування чотирьох різних типів стресу, що можуть спричиняти перебудови в геномі за рахунок транскрипційної активації транспозонів, транспозиції мобільних генетичних елементів і численних циклів розрив-злиття-міст, втрати хромосом чи хромосомних фрагментів, а також різних епігенетичних ефектів. До цих чотирьох типів стресу відносять і дію умов культури *in vitro*, атаку рослин патогенами, міжвидове схрещування [22].

Зміна умов росту істотно впливає на геномну мінливість на організменному, хромосомному та молекулярному рівнях: при зниженні чи підвищенні температури, засоленні, несприятливих співвідношеннях мінеральних поживних речовин чи їх дефіциті, у результаті посухи, вірусному, бактеріальному зараженні, у разі поранень, запиленні чужорідним пилком, перенесенні рослин у незвичні умови існування. Стресові чинники призводять до істотних змін внутрішньоклітинного фізіологічного гомеостазу. Наслідком цього є швидкі зміни в геномі на хромосомному рівні. При цьому у рослин мутаційний процес інтенсифікується, спричиняючи структурні перебудови хромосом, ампліфікацію певних послідовностей та інші модифікації геному на молекулярному рівні. Такі механізми досить поширені в природі і є важливими не тільки в адаптаційних, а й еволюційних процесах [17, 20, 21, 23].

Таким чином, внаслідок впливу стресових умов, зумовлених зовнішніми і внутрішніми чинниками, в рослин підвищується рівень мінливості геному соматичних клітин, в результаті чого виникає поліморфізм на молекулярному та хромосомному рівнях, змінюється напрям і ефективність клітинного добору.

1.1.1. Дуплікація геному (поліплоїдія) та її наслідки для еволюційного успіху рослин. Стабільність геному, в тому числі постійність числа хромосом, є фундаментальним біологічним явищем, що забезпечує передачу генетичної інформації в поколіннях. Не менш фундаментальною властивістю геному є також здатність до мінливості. Протягом онтогенезу у більшості видів вищих рослин в соматичних клітинах можуть виникати різноманітні геномні зміни, а найчастіше в процесі диференціювання тканин відбувається поліплоїдизація [15, 24].

Як відомо, поліплоїд – це організм, чий геном містить більше, ніж два повних набори хромосом (3n, 4n і т.д.). Стеббінс виділив три основні типи поліплоїдів: це автополіплоїди, алополіплоїди та сегментні алополіплоїди [25]. Автополіплоїди складаються з ідентичних чи дуже подібних геномів, і

виникають внаслідок дуплікації одного [25, 26]. Алополіплоїди, на противагу, містять два чи більше різних геноми, і можуть виникати завдяки гібридизації двох різних видів з подальшим подвоєнням геному [25, 27]. Сегментні алополіплоїди складаються з більше ніж двох відмінних геномів, що можуть призводити до формування як бівалентів, так і мультивалентів протягом кон'югації хромосом у мейозі [25, 28, 29]. Деякі автополіплоїди можуть бути виокремлені в різні групи, чи відноситись до одного таксону, не зважаючи на морфологічні відмінності за розміром і морфологією. Крім того, вони можуть бути репродуктивно ізольованими [30].

В багатьох випадках формування поліплоїдного геному відбувалось шляхом автополіплоїдії чи гібридизації еволюційно-близьких видів. Утворені рослини здатні дати нащадків лише за умови, що в мейозі формуються біваленти, а не мультиваленти із утворенням незбалансованих гамет. Для пшениці описано ефект одного локусу, що гарантує чітке утворення бівалентів, та продемонстровано, що механізм пошуку гомологічної пари є генетично контрольованим [30]. Тому, рання поява і широке розповсюдження поліплоїдії серед покритонасінних зумовлені унікальною можливістю групи утворювати бівалентні пари в мейозі, що могло бути наслідком дуже ретельного добору гомологічних хромосом [30, 31].

На сьогодні еволюційне значення поліплоїдії так і залишається остаточно нез'ясованим. Частина наукової спільноти вважає, що це явище веде до еволюційної безвиході та перекриває шляхи для подальшого еволюційного розвитку [32, 33, 34, 35]. Інша стверджує, що саме поліплоїдія відіграла основну роль в еволюції видів [36, 37, 38]. Однак наслідки повногеномної дуплікації (ПГД) в еволюції покритонасінних видів є значними. Наприклад, при втраті частини геному після ПГД може суттєво збільшитись швидкість репродуктивної ізоляції між географічно-віддаленими субпопуляціями, що таким чином тимчасово сприяє зростанню видоутворення в поліплоїдних лініях [39]. Водночас, за утворення міжвидових гібридів з численними копіями алелей генів кожного локусу

дубльовані гени можуть зазнавати мутацій, а завдяки репродуктивній ізоляції таких поліплоїдів можуть утворюватись нові види [40, 41]. Тому розкриття механізмів походження і збереження дуплікованих генів дозволить краще зрозуміти не лише шляхи набуття генами нових функцій і реакцій організму за дії природнього добору, а також можливі причини різноманіття живого [42].

Успіх поліплоїдів, в тому числі нещодавно утворених, пояснюється високим рівнем мінливості їхнього геному [43, 44, 45], що проявляється в мінливості числа хромосом, розмірі геному, підвищеній активності МГЕ, а також появі інсерцій, делецій за дії стресу. Здатність переживати масштабні зміни в геномі, які часто відбуваються протягом одного чи декількох поколінь, пов’язана з реструктуризацією транскриптому, метаболому і протеому, і може призводити до змін фенотипу.

Поліплоїдні форми рослин також асоціюють з більш широкою екологічною амплітудою і новими еволюційними можливостями. Це пов’язують із збільшеною «буферною ємністю» їхнього геному, яку забезпечують дуплікований набір генів і фізіологічна потужність, набута завдяки «фіксованій гетерозиготності» дуплікованого геному [42]. Крім того, до переваг поліплоїдів відносять здатність набувати нових функцій у результаті дуплікації генів [43, 44, 45, 46].

Серед недоліків поліплоїдів є збільшене число хромосом та складність їх кон’югації і сегрегаційних взаємодій, що можуть спричиняти аномалії (включаючи анеуплоїдію) протягом мейозу і мітозу [47]. Клітинна архітектура поліплоїдів теж відрізняється через збільшений розмір клітин, що змінює співвідношення їхньої поверхні до об’єму [48, 49, 50, 51].

Загалом, зміни в поліплоїдних рослинах, що можуть бути позитивними чи негативними, впливають на геномну архітектуру, транскриптом і епігенетичні процеси, призводячи до пригнічення чи активації певних генів, втрати послідовностей ДНК і епігенетичних змін [52, 53, 54, 55]. З даних аналізу послідовностей ДНК і генетичних карт відомо про наявність в таких

геномах численних копій генів, кількість та активність яких може збільшуватись чи зменшуватись залежно від поліплоїдизаційних подій [56]. До таких відносяться гени 5S рРНК та 45S (18S, 5.8S, 26S) рРНК. Ці гени представлені у геномах рослин тандемними повторами, кількість яких може варіювати навіть у близьких видів [57]. Локуси як 5S рДНК, так і 45S рДНК найчастіше зазнають перебудов протягом еволюції. Так, у злакових розташування і розмір локусів обох класів повторів рДНК та їх порядок надзвичайно варіюють [30, 57].

При поліплоїдизації зазвичай утворюються нащадки, що можуть відрізнятись від обох батьківських форм. Внаслідок індукованих поліплоїдією змін можуть виникати організми, що здатні перевершувати предкові форми чи заселяти нові ніші існування. Саме тому вважається, що поліплоїдизація є головною рухомою силою, що лежить в основі дивергенції покритонасінних та їхнього біорізноманіття [29, 58, 59, 60]. Деяким видам властиві внутрішньовидові поліплоїдні серії, особливо це характерно для злаків. Крім того, деякі види трав, що населяють пасовища, формують поліплоїдні комплекси, серед яких більша частина анеуплоїдів та рослин з непарними рівнями плоїдності, багато з яких є сегментними алополіплоїдами. Така структура популяції підтримується завдяки поєднанню статевого та вегетативного типів розмноження [9, 61, 62, 63].

Відомо, що поліплоїдні форми рослин частіше трапляються в екстремальних середовищах, включаючи субарктичні регіони, високогір’я і засушливі середовища [64, 65, 66]. Враховуючи гіпотезу, що поліплоїди можуть відрізнятися від своїх диплоїдних предків, такі форми вивчали за морфологією, фізіологією і ознаками розвитку, щоб знайти співвідносні підтвердження та пояснення підвищеної стійкості до стресу.

Маералі та спів. порівняли природні диплоїди, тетраплоїди та індуковані колхіцином тетраплоїди зніту вузьколистого (*Chamerion angustifolium*), щоб вивчити реакцію поліплоїдного геному на водний стрес. Автори виявили збільшений розмір продихів та діаметр стебла і судин, а

також знижену питому гідравлічну провідність у обох типів тетраплоїдів, порівняно із диплоїдами. Разом з тим, у тетраплоїдів було виявлено суттєво вищу толерантність до посухи, ніж у диплоїдів і неотетраплоїдів, що свідчить про незалежне формування такої стійкості вже після геномної дуплікації [67].

Рамзі та колеги за допомогою польових експериментів визначали ступінь виживання проростків, отриманих у тепличних умовах і перенесених у засушливе середовище. Автори виявили збільшення у 5 разів виживання проростків (отриманих із насіння гексаплоїдів, зібраних в полі), і на 70% збільшене виживання проростків, отриманих від насіння спонтанних неогексаплоїдів, порівняно з тетраплоїдами. Таким чином, вони показали, що рівень поліплоїдії може відігравати певну роль в адаптації до нових умов довкілля [68].

Нещодавні молекулярні дослідження показали варіювання експресії окремих генів у алополіплоїдів, порівняно з їхніми батьківськими формами [69, 70]. Однак, у багатьох випадках зв’язок між експресією генів і адаптивним значенням цього явища у відповіді на стрес до кінця ще не з’ясовано. Було проведено дослідження, спрямовані на з’ясування питання чи мають алополіплоїди, порівняно з їхніми батьківськими видами, більше різноманіття транскрипційних патернів експресії, що теоретично може підвищувати їхній адаптивний потенціал до змінених умов довкілля [71, 72]. Спершу автори за допомогою методу мікрочіпів порівняли генну експресію в *Coffea arabica* і двох предкових видів *C. eugenioides* та *C. canephora*. Аналіз показав, що гомологічні пари генів по-різному експресувались у відповідь на зміну температур в *C. arabica* [71]. В іншому дослідженні автори проаналізували внесок кожного з генів гомологічної пари до загальної експресії і виявили суттєві відмінності залежно від типу тканини і навколишніх умов. Це дослідження показало, що алополіплоїд відрізнявся за характером відповіді геному на зміну умов [72].

Відомо, що гомологічні гени алополіплоїда *Gossypium hirsutum* демонстрували відмінні рівні експресії кожного гена за дії різних абіотичних

стресів (підвищені чи низькі температури) [73, 74]. В алополіплоїда *Brassica napus* стресові умови довкілля призводили до змін в альтернативному сплайсингу значної кількості гомологічних генів порівняно із двома батьківськими видами *B. olaraceae* та *B. rapa* [75]. За альтернативного сплайсингу утворюються численні мРНК одного гена, з яких можуть синтезуватися білки з різними функціями. Загалом, такі дослідження надають чітке експериментальне підтвердження, що зміна умов існування може призводити до змін у регуляції експресії генів-гомологів у алополіплоїдів. Однак, поки не відомо чи є такі зміни адаптивними.

Ще один приклад відповіді на стрес у алополіплоїдів та їх батьківських форм виявлено для роду *Arabidopsis*. У алополіплоїда та його батьківських видів порівнювали стабільність мРНК. Дослідження виявили, що час існування мРНК генів, задіяних у відповіді на абіотичний та біотичний стрес, відрізнявся у алополіплоїда та предкових форм [76]. Такі дослідження підтвердили, що відмінність пост-транскрипційної регуляції між алополіплоїдами і батьками моделює їх відповідь на стрес і потенційно дозволяє виживати за складних умов.

Таким чином, поліплоїдизація (у розглянутих випадках алополіплоїдії) може спричиняти зміни у характері відповіді рослинного організму на широкий спектр потенційно можливих стресових умов довкілля. Вважається, що поліплоїдія відіграє ключову роль у видоутворенні [77, 78], адже такі організми часто є репродуктивно-ізольованими на відміну від їхніх предків: при схрещуванні диплоїдів і тетраплоїдів найчастіше утворюються триплоїдні нащадки із незбалансованим гаметами в мейозі [77], що призводить до безпліддя[79].

Відомо, що поліплоїдний чи гібридний стан геному супроводжується підвищеним рівнем нестабільності, в тому числі й епігенетичної. Тому характерною особливістю алополіплоїдів є нестабільність і перебудови геному. Для поліплоїдних гібридів *Brassica*, було виявлено численні хромосомні перебудови і втрату фрагментів хромосом протягом п’яти

поколінь [80, 81]. Геномні зміни було виявлено і в алополіплоїдів пшениці та арабідопсису через деякий час після їхнього отримання [82, 83, 84].

Поширеність поліплоїдів у природі підтверджує той факт, що це явище зазнало позитивного добору протягом еволюції і має важливе значення. Однак прямих доказів, що різноманіття, індуковане поліплоїдією, безпосередньо пов'язане із еволюційним потенціалом, поки що не існує. Тому, для чіткої відповіді на питання, чи поліплоїдія стимулює еволюцію через підвищення адаптивності, потрібні нові дослідження, які б інтегрували молекулярно-генетичні та екологічні підходи, спрямовані на з'ясування ролі певних генів в адаптації до модельованих стресових умов [29].

Отже, поліплоїдія, кратне збільшення набору хромосом, має особливий успіх протягом еволюції рослин. Підвищений рівень мінливості геномів поліплоїдних організмів пояснюється появою перебудов у ДНК, збільшенням хромосомного числа і розміру геному. Наслідком цього є зміни у морфології та фізіології рослин, зміні рівня експресії певних генів у відповідь на стрес та за несприятливих умов існування.

1.1.2. Значення додаткових або B-хромосом у каріотипі рослин.

B-хромосоми – необов'язкові надкомплектні (додаткові) хромосоми, що не рекомбінують з хромосомами основного набору й еволюціонують незалежно від нього. Їх знайдено у всіх основних груп еукаріот: більше ніж у 1300 рослин, 500 видів тварин, 10 видів грибів. Наявність B-хромосом не є обов'язковою, у більшості видів вони можуть бути присутні не у кожного організму і не у всіх популяціях, і навіть не у всіх клітинах одного організму [85, 86, 87, 89, 90, 91, 92].

Від хромосом основного набору B-хромосоми відрізняються за такими параметрами: менший розмір; їхні центромери часто дефективні, в більшості випадків гетерохроматинізовані і складаються із повторюваних послідовностей ДНК; кількість таких хромосом може змінюватись від однієї до декількох десятків в різних клітинах одного і того ж організму; вони часто розміщені на периферії метафазної пластинки; не кон'югують в мейозі з

хромосомами основного набору; успадковуються нерегулярно; мають здатність накопичуватись до, під час та після мейозу [88, 89, 91].

Додаткові хромосоми, в основному, відносяться до одного із двох морфологічних типів: метацентричного (B1) чи субметацентричного (B2). Відомо, що такі хромосоми є інертними, адже в більшості випадків гетерохроматинізовані та мають низьку транскрипційну активність. Однак, існують B-хромосоми, що містять транскрипційно-активні гени. Так, у більшості видів рослин B-хромосоми мають кластери генів рибосомної ДНК (рДНК) [91, 92]. Наприклад, припускають, що у *Plantago lagopus* походження B-хромосом асоційоване з масивною ампліфікацією послідовностей 5S рДНК після фрагментації A-хромосоми анеуплоїда (рис.1.1) [93]. Вважають, що сайти рДНК, що локалізовані на B-хромосомі, можуть бути частиною МГЕ [94]. У B-хромосомах виявлено також деякі регуляторні та інші структурні гени. Тому, деякі властивості таких хромосом можна пояснити безпосередньо продуктами їхніх генів [89, 91].

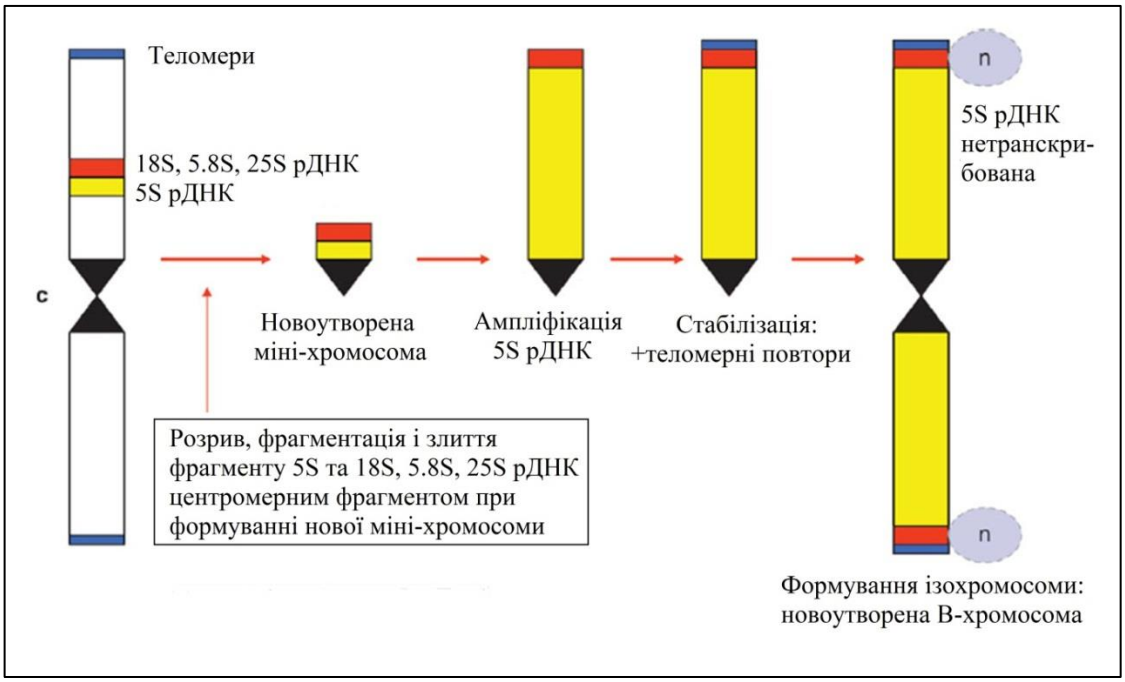

Рис. 1.1. Схематичне зображення гіпотетичного механізму утворення B-хромосоми у *Plantago lagopus*: масивна ампліфікація 5S рДНК та формування ізохромосоми

Додаткові хромосоми можуть впливати на різноманіття клітинних процесів. При цьому у одних видів наявність В-хромосом помітно не впливає на морфологію рослин, в інших – їхній вплив на фенотип може бути суттєвим. Так, наприклад, у валеріани (*Valeriana officinalis*) рослини з В-хромосомами відрізнялись за багатьма анатомічними, гістологічними і біохімічними ознаками. У гаплопаппуса *Haplopappus gracilis* наявність В-хромосом пов'язана із забарвленням сім'янок, а у зернових злаків, в тому числі, кукурудзи, рослини з В-хромосомами часто характеризуються смугастістю листя [9].

Вплив В-хромосом може бути зумовлений або їхньою наявністю, або активністю їхніх генів. Так, у проліску осіннього *Scilla autumnalis* [95] та шніт-цибулі *Allium schoenoprasum* [96] поява В-хромосом супроводжується зміною експресії (спектру білків) ізоферментів естераз та білків ендосперму. Виявлено зміни складу запасних білків в насінні ряду видів *Lotus* L. [97], що містять такі хромосоми; а також кількості фенолів у листі африканського проса *Pennisetum glaucum* [98].

У більшості видів рослин, особливо у кукурудзи, за наявності В-хромосом спостерігаються такі ефекти: підвищення частоти рекомбінацій і зміна кількості гетерохроматинових потовщень на А-хромосомах, підвищення частоти мутацій в А-хромосомах та міжклітинних хромосомних мутацій (цитоміксису), що призводить до зміни кількості хромосом в клітині, підвищення нестабільності А-хромосом і утворення мікро-ядер на різних стадіях розвитку [89].

Хоча основні механізми утворення додаткових В-хромосом до кінця не встановлено, однак вважають, що вони утворюються в результаті помилок мейозу з фрагментів А-хромосом, а потім стабілізуються завдяки додаванню теломерних повторів та інших послідовностей [87]. Так, наприклад, В-хромосоми *Zea mays* [99] мають багато послідовностей, що походять від різних А-хромосом [100, 101], а також від поліморфних та гетероморфних їх регіонів [102]. Для *Crepis capillaris* [103] та *Eyprepocnemis plorans* [104] теж

було показано, що В-хромосоми можуть утворюватись від хромосом основного набору.

Крім того, В-хромосоми можуть виникати спонтанно у відповідь на зміну умов існування, наслідуючи внутрішньовидову гібридизацію [105, 106]. Алополіплоїдизація геному здатна індуковати структурні перебудови на хромосомному рівні (елімінації, реорганізації чи ампліфікації послідовностей) [107, 108], за яких можливе утворення послідовностей, що потенційно здатні формувати В-хромосоми. Утворення і еволюція рослинних додаткових хромосом ймовірно асоційовані зі спонтанною ампліфікацією кодуючих і некодуючих тандемних повторюваних послідовностей, що походять від А-хромосом [86, 93].

Такі додаткові хромосоми можуть впливати на адаптивний потенціал рослин, що проявляється не лише в певних змінах фенотипу, але й у збільшенні рівня мінливості геному [87], що підвищує поліморфізм популяцій рослин за несприятливих умов зростання. Можливо, саме тому рослини, що мають В-хромосоми, частіше зустрічаються в екстремальних умовах, антропогенно-навантажених та забруднених середовищах [89, 109, 110, 111, 112, 113].

У більшості видів, що мають додаткові хромосоми, число В-хромосом є низьким (0-5 в природних популяціях). Однак, у деяких культурних злаків та інших видів рослин з широким ареалом В-хромосоми зустрічаються частіше, а їхня кількість може сягати більших значень. До прикладів можна віднести такі види як *Zea mays* (0–34), *Brachycome linearibola* (0–22), *Silene maritima* (0–15), а *Allium schoenoprasum* L., який поширений навіть в Арктиці, може мати до 20 В-хромосом в одній клітині [87]. В такому випадку висока екологічна пластичність видів супроводжується підвищеною частотою і кількістю В-хромосом в одному організмі.

При вивченні природних популяцій кукурудзи із Північної Аргентини, було виявлено, що вони належать до 13 аборигенних рас, які зростають на різних висотах – від 80 до 3620 м над рівнем моря. Частота поширення В-

хромосом варіювала в різних популяціях від 0 до 94 %, а кількість на одну рослину – від 0 до 8 (частіше зустрічались рослини з 0–3 В-хромосомами). Популяції, в яких кількість В-хромосом варіювала, мали позитивну і статистично-достовірну кореляцію середньої кількості додаткових хромосом від висоти зростання рослин. Через десять років повторний аналіз підтвердив, що чим вище зростала рослина, тим більшу кількість В-хромосом вона мала [114].

Таким чином, додаткові хромосоми досить поширені в природних популяціях рослин. При введенні в культуру *in vitro* кількість В-хромосом у клітинах, як правило, зростає порівняно з батьківським організмом саме на перших етапах вирощування, коли клітини піддаються найбільшому впливу стресу. При цьому морфологія таких хромосом, на відміну від більшості хромосом основного набору (А-типу), залишається без змін. У сформованих, адаптованих до умов росту, клітинних лініях рослин В-хромосоми зустрічаються рідко [115].

Отже, В-хромосоми мають ряд відмінностей від хромосом основного набору (А-типу). Причинами їх появи вважають порушення в мейозі та фрагментацію хромосом основного набору, що можуть виникати під впливом несприятливих умов довкілля. Додаткові хромосоми широко зустрічаються у багатьох видів злакових, а їх кількість може сягати 34 в одній клітині (як у *Zea mays*). Разом з тим, вважають, що В-хромосоми можуть мати адаптивне значення, що проявляється не лише в збільшенні рівня мінливості геному, а й у зміні фенотипу рослин.

1.2. Культура *in vitro* як модель стресового впливу на геном рослин

Високий рівень геномної мінливості – одна із характерних особливостей клітинних культур. Це проявляється не лише у змінах в ядерній,

хлоропластній і мітохондріальній ДНК, а також у мінливості кількості і морфології хромосом. Геномні зміни, що спостерігаються в культивованих *in vitro* рослинах, мають двояку природу. Певна їхня частина може існувати у клітинах рослини-донора експлантів іще до введення в культуру *in vitro*, де вони закономірно виникають в процесі диференціювання, а в онтогенезі накопичуються ще й незапрограмовані, випадкові зміни та мутації. Водночас, значну частину складають геномні зміни, що виникають *de novo*. Поранення, механічні пошкодження (без яких лише в окремих випадках отримують культуру *in vitro*) можуть викликати генетичні зміни. Під час індукції дедиференціювання і подальшої проліферації клітини *in vitro* знаходяться в умовах, що відрізняються від умов інтактного організму. Такі умови часто перевищують межі норми реакції вихідного генотипу, тобто є стресовими, що призводить до підвищення геномної мінливості. Тому калюсоутворення та умови вирощування клітин *in vitro* є мутагенними і обумовлюють підвищену мінливість (сомаклональну мінливість).

Значна частина геномних змін і порушень, що виникають під час дедиференціювання і калусоутворення, є наслідком запрограмованих в клітині процесів. Відомо, що диференціювання призводить до суттєвих змін в геномі. Внаслідок спеціалізації функцій, що супроводжується і обумовлюється такими змінами, багато диференційованих клітин в нормі не здатні до проліферації. Однак рослини часто потрапляють в такі умови, коли організм може вижити чи залишити потомство тільки внаслідок індукції проліферації диференційованих клітин. Такі умови, очевидно, й індукують роботу механізмів геномних перебудов, кінцевим наслідком яких є повернення клітинного геному до структурно-функціонального стану, властивого чи близького до стану меристемних клітин або стовбурових клітин. При цьому змінюється характер реалізації генетичної інформації (активуються репресовані чи сплячі гени, діють гени-модифікатори), завершується синтез одних і починається утворення інших речовин спеціалізованого обміну, клітини втрачають можливість виконувати

спеціалізовані функції. Без більшої частини таких змін, перебудов і відхилень геном диференційованої клітини, особливо високоспеціалізованої, не здатен забезпечити нормальну репродукцію, а разом з тим і тотипотентність [116].

В основі механізмів, що забезпечують перебудову геному при індукції дедиференціювання клітин (і редиференціювання) як *in vivo*, так і *in vitro* до і під час перших мітозів найчастіше лежать наступні процеси: додатковий, часто значний синтез ДНК; ампліфікація окремих послідовностей; ендоредуплікація, інші форми ендомітозу; екструзія (викидання ядерного матеріалу поза клітину); димінуція хроматину; втрата значної кількості ядерної ДНК; цитоміксис; зміна кількості В-хромосом (спочатку, як правило, збільшення їх кількості, а при подальшому пасивуванні – їх втрата); фрагментація та брунькування ядер (амітоз); аномалії мітозу і цитокінезу, особливо, утворення синцитіїв, що обумовлені аномаліями мікротрубочок; злиття ядер у багатоядерних клітинах; утворення мікроядер при відсутності аберантних анафаз; сегрегація ядерного матеріалу в профазах і метафазах не тільки поліплоїдних, а й диплоїдних клітин, що призводить до редукції числа хромосом; поява, а потім поступове зникнення політенних хромосом (зникнення може відбуватись поступово за рахунок зменшення кількості ниток в початкових політенних хромосомах); соматичний мейоз та кросинговер [15].

Важливо відмітити, що димінуція хроматину у відповідь на стресові умови, такі як поранення і культивування *in vitro,* є необхідною умовою перетворення соматичних клітин в тотипотентні, що здатні до регенерації [117, 118, 119]. Також відомо, що зміна кількості ДНК і певних повторюваних послідовностей в процесах диференціювання – дедиференціювання – редиференціювання є зворотною [120, 121, 122, 123, 124].

Отже, культивування рослинних тканин *in vitro* є моделлю дії стресових контрольованих умов на геном. За такого впливу відбувається підвищення сомаклональної мінливості. Перебудови геному, що при цьому виникають,

пов’язують з надсинтезом ДНК, ендоредуплікацією, цитоміксисом, наявністю В-хромосом. Разом з тим, зміни в геномі, що виникають при культивуванні *in vitro*, можуть мати зворотний характер.

1.3. *Deschampsia antarctica* E. Desv. – один із представників судинних рослин Антарктики

На відміну від Арктичної флори, яка налічує близько 2000 видів квіткових рослин, Антарктику наразі населяє лише 2 види судинних рослин – *Colobanthus quitensis* Kunth. Bartl та *Deschampsia antarctica* E. Desv. (рис.1.2), поширення яких обмежується Антарктичним півостровом та прилеглими острівними територіями [125, 126, 127, 128, 129].

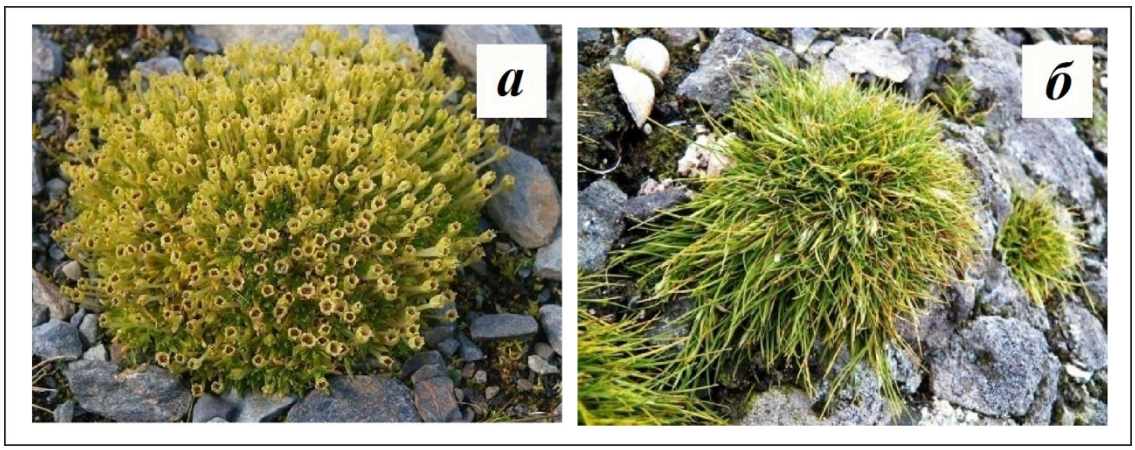

Рис. 1.2. Судинні рослини Антарктичного регіону: *а* – *Colobanthus quitensis* Kunth. Bartl., *б* – *Deschampsia antarctica* E. Desv.

Антарктичний злак *D. antarctica* є унікальною моделлю для дослідження стійкості рослин до стресових умов існування. Вважають, що рослина має особливі механізми адаптації, які дозволяють цьому виду виживати в складних кліматичних умовах Антарктики. Крім того, щучник антарктичний є джерелом генів, пов’язаних із стійкістю та пристосуванням до різного роду стресів, що зумовлює його потенційну цінність для створення та покращення агрономічно-цінних культур [130, 131, 131].

1.3.1. Таксономічне положення та поширення виду. *Deschampsia* P. Beauv. – рід рослин, що налічує від 30 до 40 видів [134, 135, 136, 137], до яких належать багаторічні та однорічні трави. Багато видів цього роду, такі як *D. alba*, *D. nubigena*, *D. alpina*, населяють екстремальні полярні середовища [136].

За морфологічними ознаками рід *Deschampsia* поділяють на дві секції чи роди: *Deschampsia* та *Avenella* [138]. Крім того, філогенетичні дослідження ядерного рибосомного внутрішньо-транскрибованого спейсеру (ITS) та пластидних *trnL* інтронних послідовностей також підтвердили незалежне походження цих двох секцій [139].

Представники роду поширені у Південній та Північній півкулі Землі. Окремої уваги заслуговує вид щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* E. Desv.), що опанував великий ареал малопридатних для існування умов: південь Патагонії в межах Аргентини та Чилі, Вогняну Землю, Субантарктику, а саме регіон Антарктичного півострова (Південні Оркнейські, Південні Шетлендські, Фолклендські, Аргентинські острови) та деякі острови Індійського океану (рис.1.3) [134, 139, 140, 141]. Рослини населяють схили (20-40°), де часто формують одну неперервну суцільну дернину. Рідше вони ростуть відокремлено, формуючи куртину до 1 м завширшки і 25 см заввишки на рельєфному каменистому морському березі [131, 142, 143].

На сьогодні виділяють дві гіпотези можливого поширення видів роду *Deschampsia*. Згідно з першою, рід виник на вищих чи середніх широтах Євразії і тільки з часом поширився на південь, де сформувався вторинний центр видоутворення (Південна Америка). Це підтверджує той факт, що рід існує в південній півкулі дуже давно [137]. Інша вказує на те, що поширення видів з Південної Америки до Антарктики могло відбуватись протягом пізнього Третинного періоду, коли Антарктичний льодовиковий щит ще не вкривав весь континент. Це в свою чергу не призвело до пригнічення росту, і одночасно сприяло поступовій адаптації (особливо через широке поширення

і банк насіння) на початку Плейстоценного максимуму. Припускають, що такі види могли пройти через значну дивергенцію, що привела до утворення нових підвидів [131].

Рис. 1.3. Ареал поширення виду *D. antarctica* в Південній півкулі Землі

Deschampsia – широко поширений рід рослин. Особливу увагу привертає вид *D. antarctica*, що населяє переважно Південну Америку та територію Антарктичного півострова. Центром появи виду вважають Євразію, хоча можливе поширення й з Південної Америки.

1.3.2. Морфологічні особливості та способи репродукції *D. antarctica*. *D. antarctica* – це багаторічний злак. За морфологічними особливостями – ксероморф [141, 144]. В умовах Антарктики розвиток *D. antarctica* починається в листопаді, коли відбувається проростання насіння і відновлення минулорічних дернин, і триває приблизно до березня [131, 145]. Рослина росте у вигляді щільної дернини, з якої з часом утворюються циліндричні висхідні пагони з трикутними листками. Представникам виду характерні сидячі лінійні листки (рис.1.4 *а*). Крім того, спостерігаються спіральні потовщення клітинних стінок епідермісу та паренхіми листків; виявлено великі, рідкі, щільно зімкнуті продихи.

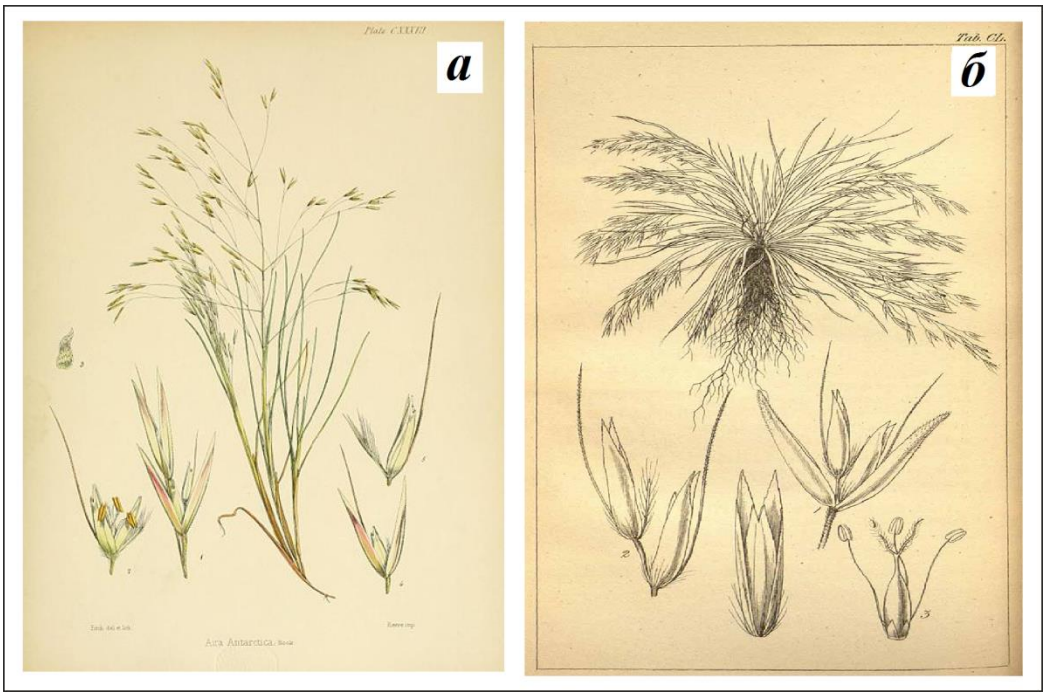

Рис. 1.4. Схематичне зображення будови рослин виду *D. antarctica* E. Desv.: *а* – пагін та колоски, *б* – дернина, будова квітки і насінини

Характерним для роду типом суцвіття є волоть із зібраними в пучок осями. На верхівці осі формуються по три колоски, з'єднаних загальною лускою, в кожному з яких диференціюються по дві квітки. Колоски утворюються великі, часто в одному колоску формується лише одна зернівка. У межах волоті спершу дозрівають нижні колоски, потім – середні. Квіти верхньої частини волоті частіше за все насінин не утворюють. Зернівка має типову для злаків будову. Формування елементів суцвіття відбувається в апексі, що перебуває в основі трубки, де й відбувається запилення.

Будова квітки типова для злаків: три тичинки, зав'язь із сидячою кислатою приймочкою. Особини мають близько розташовані двостатеві квітки і вважаються самозапильними, що й зумовлює клейстогамію. Однак, можливе й перехресне запилення, так як у Південній Америці були знайдені особини цього виду із клейстогамними та хазмогамними (здатними до перехресного запилення) квітами (рис. 1.4 *б*). Хазмогамія може іноді траплятись протягом помірних сезонів у Антарктиці, тоді як співвідношення

між формуванням клейстогамних і хазмогамних квітів у інших видів рослин залежить від кліматичних умов існування. Так, наприклад, у частухи подорожникової (*Alisma plantago-aquatica*), росички (*Drosera*), ковилю (*Stipa*) клейстогамні квіти розвиваються за пониженої температури та грунтової засухи. А в пшениці за теплих вологих умов формуються хазмогамні квіти, тоді як за підвищеної температури та засухи – клейстогамні [146].

В 1940-х в Антарктиці для виду *D. antarctica* були описані лише клейстогамні квіти [134]. Але в нещодавніх дослідженнях були виявлені також і хазмогамні квіти, здатні до перехресного запилення [147, 148, 149]. Автори вказують, що в щучника антарктичного клейстогамія може бути описана як кріоклейстогамія, тому що індукована впливом низьких температур і значною вологістю [150].

Відомо, що для *D. antarctica* характерні великі пилкові зерна, триклітинного типу, нечисельні, однопорові, гладенькі з масивною спородермою, що забезпечує швидке проростання пилкової трубки і запліднення. Чоловічий гаметофіт захищений завдяки добре розвинутій спородермі та каротиноїдним гранулам, що вистилають пилкову камеру. Фертильність пилку у досліджених представників виду *D. antarctica* варіює в межах 70-85 %. Крім того, було виявлено поліморфізм за розміром пилкових зерен. Як зазначають автори, утворення стерильного пилку може бути обумовлене порушеннями в мікроспорогенезі та утворенням незбалансованих мікроспор. Виявлено відхилення за типом андрогенезу з утворенням багатоклітинних пилкових зерен, що може бути наслідком впливу низьких позитивних температур. Гетерогенність і часткова стерильність пилку можуть свідчити про здатність даного виду як до статевого, так і до вегетативного розмноження [151, 152].

Рослини *D. antarctica* можуть розмножуватись вегетативно, шляхом відділення окремих частин дернини. Частіше за все, рослини утворюють скупчення, формуючи пучок. Відомо, що центральна частина такого пучка може бути сформована із відмираючих засохлих рослин. Неприкріплені

особини здатні до поширення в інші більш сприятливі місця зростання. Зокрема, було показано, що рослини можуть поширюватися вітром та птахами (останні використовують їх як гніздовий матеріал) [153, 154]. Разом з тим відомо, що у *D. antarctica* статеве розмноження із цвітінням відбувається рідко, а дозрівання насіння дуже залежить від кліматичних умов, що лімітує завершення утворення гамет [155].

Вважають, що адаптація *D. antarctica* до аридних умов зростання проявляється на рівні багатьох анатомічних рис (ксероморфність вегетативних органів, розвиненість повітроносної паренхіми, пластичність морфогенезу). З боку генеративних органів і репродуктивних процесів, які зазнають основного впливу низьких температур, адаптація проявляється у вигляді інтенсивної репродукції, клейстогамії, спеціальних пристосувань оцвітини та зав'язі, які створюють мікросередовище для успішного протікання репродуктивних процесів [151, 152, 153].

Отже, щучник антарктичний за морфологічними особливостями є типовим представником родини *Poaceae*. Для виду характерне як статеве, так і вегетативне розмноження, що можливо є одним із механізмів адаптації до несприятливих антарктичних умов.

1.3.3. Молекулярно-генетичні дослідження внутрішньовидового різноманіття *D. antarctica*. На відміну від Арктичного регіону, в Антарктиці виявлено низьке видове різноманіття рослин *D. antarctica* [154, 156, 157, 158, 159]. Суттєвою перешкодою для успішної колонізації Антарктичного регіону іншими видами вважають суворі кліматичні умови навколишнього середовища [160].

Антарктична біота мала б демонструвати суттєве генетичне різноманіття як результат накопичення мутацій та їх подальшого закріплення у нащадках. Однак, для популяцій *D. antarctica*, одного із двох видів судинних рослин регіону, виявлено низьке генетичне різноманіття. Хоча вид поширений майже на всіх островах Морської Антарктики, генетична мінливість серед

рослин є набагато меншою, ніж, наприклад, між особинами популяції одних лише Фолклендських островів [161].

Вперше популяції *D. antarctica* з острову Сайні (Південні Оркнейські острови) охарактеризували як такі, що мають низьке генетичне різноманіття (13 %) на основі AFLP аналізу [162]. Показник історичного потоку генів також виявився низьким ($N_m = 0,05$), вказуючи, що міграція між популяціями відбувалася дуже рідко. Разом з тим, різні автори зазначають, що малоймовірним є поширення виду *D. antarctica* на далекі відстані [153, 163]. Припускають, що нові популяції можуть виникати від однієї чи декількох особин, а вегетативне розмноження та самозапилення є ключовими факторами у становленні виду на нових регіонах Антарктики [162, 164].

Аналізуючи геномну мінливість *D. antarctica* за AFLP методом, було виділено чотири кластери на території Морської Антарктики, Фолклендських, Індійських та островів Південної Джорджії [160]. Загалом, відсоток різноманіття між популяціями складав лише 15,1 %, а показник потоку генів також виявився низьким. Досліджувані групи рослин з островів Індійського Океану та Фолклендських островів відрізнялись як між собою, так і від інших. Чітко виокремилась група рослин з островів Південної Джорджії, що мала подібність до популяцій Антарктичного регіону (показники індексу різноманітності Шеннона наведено на рис.1.5). Разом з тим, всередині Антарктичної групи було виявлено невелике внутрішнє різноманіття, але групування було незначним. Такі дані, відображають наскільки Антарктичне середовище є ізольованим. Зазначалось, що виключно низьке генетичне різноманіття популяцій з регіону островів Індійського океану вказує на проходження ними явища «шийки пляшки». Автори припускають, що невелика популяція *D. antarctica*, можливо, вижила на одному із островів під час останнього зледеніння, а звідти колонізувала інші групи островів. З часом за обмеженого потоку генів між такими острівними групами, відбулось утворення генетично різних популяцій.

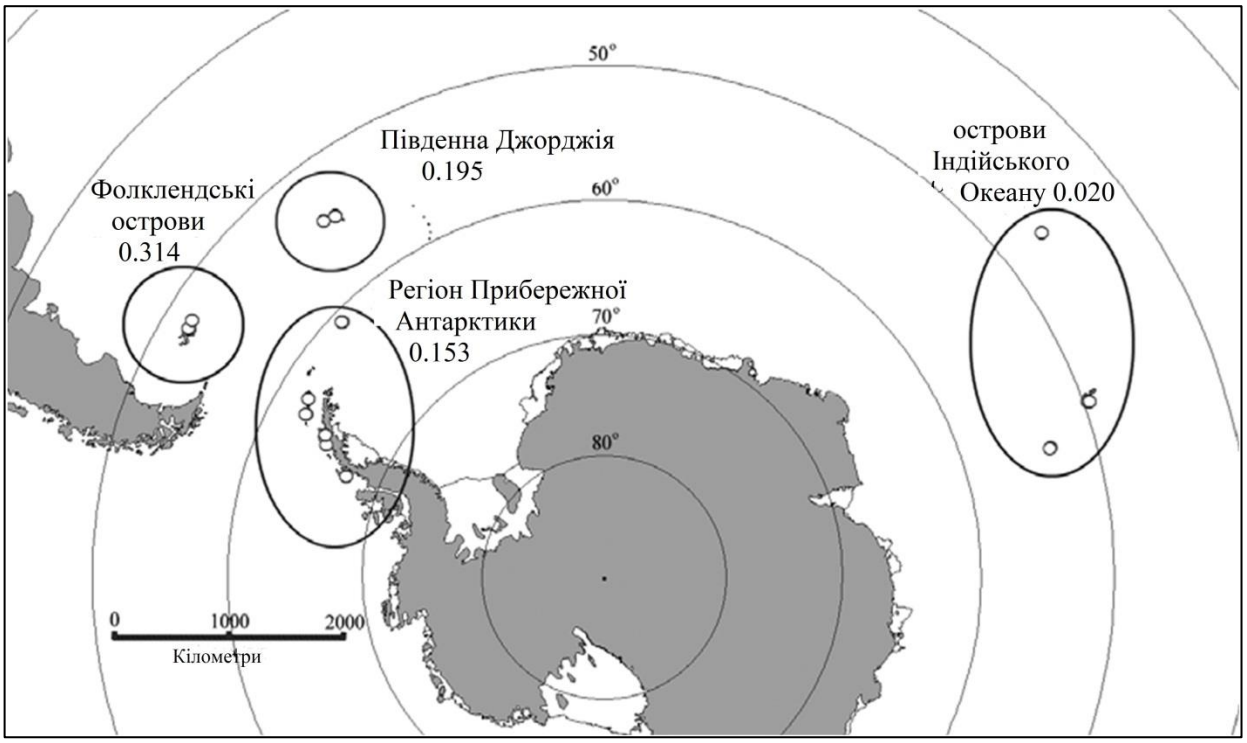

Рис. 1.5. Показники індексу різноманітності Шеннона, розраховані на основі даних AFLP аналізу для популяцій рослин *D. antarctica* з територій Південної півкулі

Автори також проаналізували градієнт різноманіття з півночі на південь між популяціями досліджуваного регіону. Найвищий показник було виявлено на Південних Оркнейських островах (0,083), тоді як найнижче різноманіття виявилось в регіоні затоки Маргарет Морської Антарктики (0,051) [160].

Аналіз некодуючих ділянок хлоропластної ДНК, виявив низький рівень різноманіття рослин досліджуваних регіонів. У проаналізованих послідовностях було знайдено лише 4 сайти із мінливістю, що відобразило існування трьох гаплотипів серед досліджуваної вибірки: групи А, що займає майже всю територію ареалу, островів Індійського океану (група В) та Південних Оркнейських островів (група С), див. рис.1.6 [160]. Як зазначають автори, серед інших підвидів рослин загалом виділяють набагато більше різноманіття хлоропластних гаплотипів, ніж це було виявлено для *D. antarctica* [160, 165, 166].

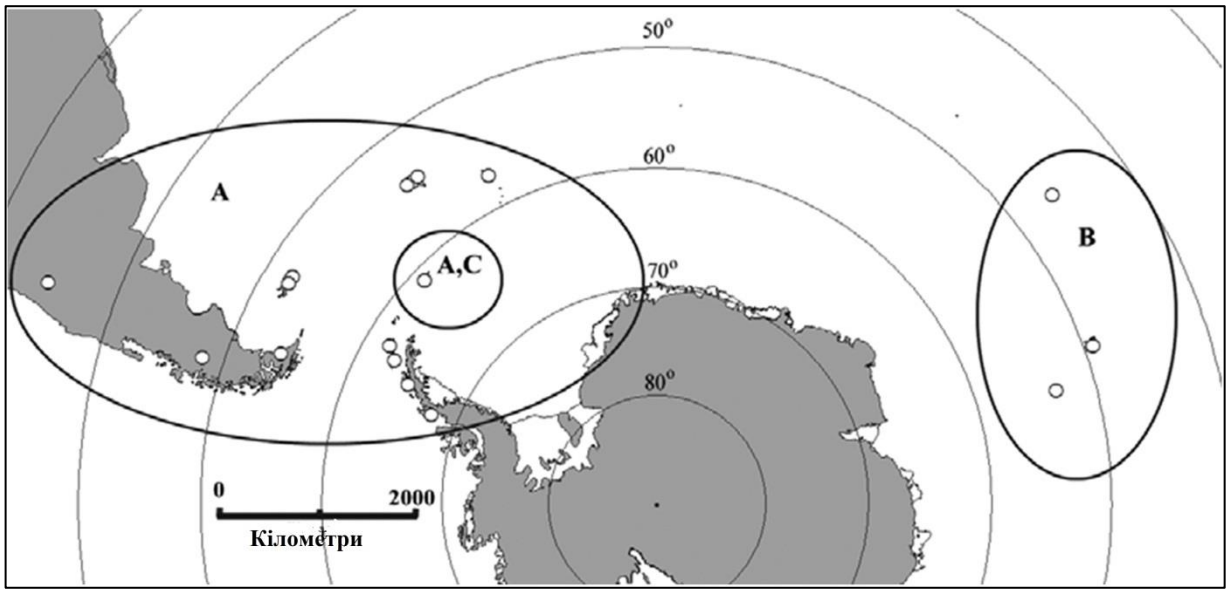

Рис. 1.6. Розподіл хлоропластних гаплотипів *D. antarctica* в Антарктичному регіоні

Філогенетична реконструкція зразків з різних частин ареалу виду, вказує на сходинкову модель колонізації, де потік генів відбувався переважно між сусідніми популяціями. А послідовні ефекти засновника, що впливали на популяції, могли суттєво вплинути на генетичне різноманіття [160, 167].

Досліджуючи популяції рослин *D. antarctica* з Південних Шетлендських, Фолклендських островів та Морської Антарктики методом AFLP-аналізу, також було встановлено, що рівень мінливості був низьким і становив лише 5,4 %, незалежно від відстані між дослідженими популяціями. Автори пояснюють низьке різноманіття відсутністю просторової ізоляції, впливом людської активності, а також птахів, що забезпечили потік генів в межах досліджуваних територій. Популяції, що були більш віддалені просторово, відрізнялись на молекулярному рівні, але відмінності між ними були незначними. Тоді як розташовані поблизу популяції були майже ідентичними [168, 169].

Порівняльний аналіз внутрішніх транскрибованих спейсерних послідовностей (ITS1 та ITS2) гену 45S рДНК у популяціях *D. antarctica* з двох географічно віддалених регіонів Морської Антарктики (території

Південних Шетландських островів та Аргентинських островів) виявив існування трьох різних груп. Подібність всередині кожної з груп складала 98-100 %, тоді як між іншими видами *Deschampsia* була 97 % чи менше. Результати підтверджують співіснування генетично-різних рослин всередині однієї чи близьких популяцій з Антарктичних островів. А існування різних варіантів ITS в одній і тій же популяції вказує на низький рівень гомогенізації 45S рДНК в *D. antarctica*. Автори стверджують, що це може бути пов'язано з стратегією поширення виду, адже, як відомо, самозапилення та вегетативне розмноження можуть сприяти збереженню внутрішньогеномної гетерогенності генів рДНК, тоді як перехресне запилення забезпечує їх гомогенізацію [170].

Ступінь подібності послідовностей між популяціями *D. antarctica* в Аргентині та Антарктиці варіював в межах 97-100 % для ITS1 та 98-100 % для ITS2 генів рДНК. Тому автори стверджують, що досліджувані антарктичні популяції можуть походити з Південної Америки, адже відрізняються від зразків з Фолклендських островів мутацією в ITS2. Разом з тим, є свідчення того, що колонізація Антарктики могла відбуватися шляхом декількох незалежних подій вихідцями з кількох різних популяцій [170].

Відомі на сьогодні дані щодо молекулярно-генетичного аналізу видового різноманіття *D. antarctica* вказують на низький рівень генетичного різноманіття. На основі AFLP аналізу виділено чотири групи популяцій рослин. Показник різноманіття змінювався відповідно з півночі на південь при дослідженні популяцій островів Антарктичного півострова. Відомо про існування трьох гаплотипів в антарктичному регіоні, що виявлені завдяки аналізу некодуючих регіонів хлоропластної ДНК. В результаті аналізу ITS1 та ITS2 послідовностей гену 45S рДНК двох віддалених популяцій було показано наявність різних груп, що підтверджує співіснування генетично-різних типів рослин всередині однієї чи близьких популяцій *D. antarctica* [160, 162, 168, 170].

1.4. Характеристика каріотипу представників роду *Deschampsia* P. Beauv.

Кожен вид має характерне число хромосом у ядрі, яке визначає кількість груп зчеплення під час мейозу. Такий набір відрізняється у різних видів організмів, і може як зростати, так і зменшуватись протягом еволюції та видоутворення [189, 190]. Хромосомне число є ефективним індикатором таксономічних зв'язків, що надає інформацію про можливі каріотипові перебудови і напрямок хромосомних змін у рослин одного чи близьких видів [190, 191]. Порівняно із широким різноманіттям, що спостерігається серед видів покритонасінних, голонасінні не мають видів з надзвичайно відмінними числами хромосом (зазвичай, це 2n=2x=14–28). Відомі лише декілька поліплоїдних видів у групі голонасінних [192]. Наприклад, 400–500 видів трав (*Poaceae*) в підтрибі *Triticaceae*, включаючи ячмінь, жито, пшеницю і численні кормові трави [193], мають базове число хромосом x=7, хоча деякі є поліплоїдами.

Рід *Deschampsia* P. Beauv (*Poaceae*) включає в себе більше 30 видів з широким ареалом поширення, високою морфологічною різноманітністю та інколи нез'ясованим таксономічним положенням [194, 195, 196]. Відомо, що більшість видів роду *Deschampsia* мають хромосомний набір 2n=2x=26 з базовим числом x=13, окрім *D. setacea* (2n = 2x = 14), *D. atropurpurea* (2n=2x=14) та *D. flexuosa* (2n=4x=28), що мають типове для злаків базове число x=7. Також виявлено поліплоїдні генотипи з 52 хромосомами і триплоїдні гібриди з 39 хромосомами (див. табл. Б.1 в Додатку Б). Два види *D. flexuosa* (2n=28) та *D. antropurpurea* (2n=14), заслуговують на особливу увагу, тому що молекулярні і морфологічні характеристики вказують на те, що вони можуть бути віднесені до окремого роду [139, 197].

Каріологічна мінливість у видів роду *Deschampsia*, особливо *D. caespitosa*, спричинена можливістю злиття малих за розмірами хромосом і

появи поліплоїдії [139]. На основі цього, у злакових виділяють різноманіття видів з різною плоїдністю, адже диплоїдні рослини мають менше переваг перед поліплоїдними [198]. Вважають, що таке явище лежить в основі появи нових форм, що мають тетраплоїдний каріотип, як наприклад, *D. obensis*, *D. mackenziana*, *D. mildbraedii* (див. табл. Б.1 в Додатку Б).

Високий відсоток анеуплоїдії та мінливість числа хромосом (від 18 до 26) було також відмічено при цитологічному аналізі *D. caespitosa* з популяції північної частини озера Онтаріо (Канада). Крім того, було виявлено особини, що містили додаткові хромосоми (2n=26+Bs), походження і причини виникнення яких залишаються невідомими [195].

Для *D. antarctica*, що населяє Антарктичний регіон, описано хромосомне число 2n=26 з каріотиповою формулою 2n=26=10m+6sm+8st+2t (рис.1.7) [197]. Для виду характерне явище анеуплоїдії, зміна каріотипу, при якій кількість хромосом у клітинах стає некратною гаплоїдному набору (n).

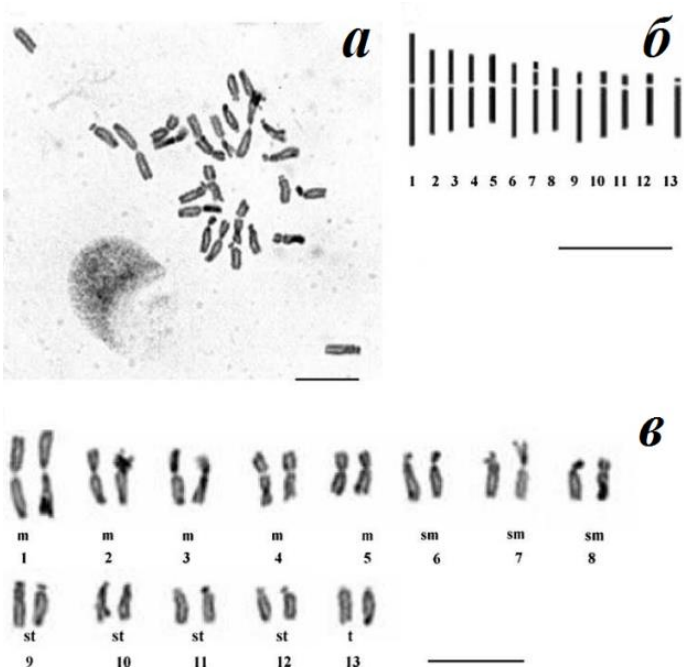

Рис. 1.7. Метафазна пластинка *D. antarctica* з типовим набором хромосом 2n=26 (*а*), ідіограма каріотипу (*б*) та каріограма з формулою 2n=26=10m+6sm+8st+2t (*в*). Масштаб 10 мкм [197]

Нещодавні дослідження виявили, що популяції *D. antarctica* з Патагонії мають більшу варіабельність за числом хромосом та молекулярними показниками. Тетраплоїдні рослини (2n=52) було вперше виявлено в

центральній Патагонії поблизу північного краю поширення виду [199]. Відомо, що суворі умови існування є рушійними силами, які пояснюють появу гібридних і поліплоїдних геномів у Арктиці, тому можуть бути характерні і для Антарктики [137, 200, 201].

Таким чином, до початку наших досліджень було відомо, що більшість видів роду *Deschampsia* мають хромосомний набір 2n=26, однак існують триплоїдні та тетраплоїдні види; мінливість числа хромосом та наявність додаткових хромосом було описано для деяких видів роду, в тому числі й для найрозпосюдженішого *D. caespitosa*.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об’єкти досліджень

У дослідженні використовували рослини *D. antarctica*. Вихідним матеріалом слугувало насіння рослин з регіону Аргентинських островів (розташування Української антарктичної станції «Академік Вернадський») Морської Антарктики: острови Барселот, Великий Ялур, Вінтер, Галіндез, Дарбо, Лейхел, Скуа та мису Расмуссен (місце збору, географічні координати та рік збору насіння наведено на рис. 2.1 та табл. 2.1).

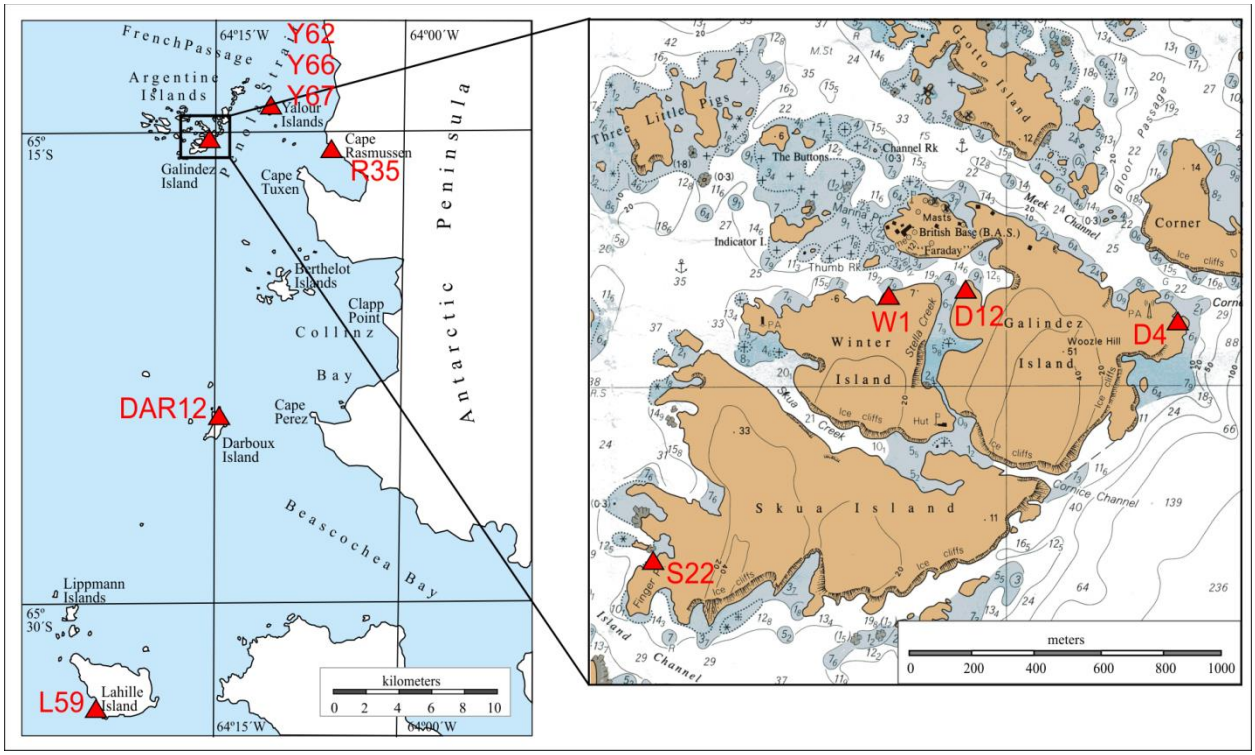

Рис. 2.1. Схема розташування місць збору насіння *D. antarctica* (помічено червоними трикутниками). Позначення та координати локалітетів наведено в табл. 2.1

Насіння було зібране та передане для досліджень учасниками експедицій Національного антарктичного наукового центру МОН України: д.б.н., професором Поліщуком В.П. (X Українська антарктична експедиція, сезон 2005 р.), зимівником к.б.н. Диким І.В. (XI Українська антарктична експедиція 2006/2007 рр. та XIV Українська антарктична експедиція 2009/2010 рр.) та к.б.н., ст.н.с. Парнікозою І.Ю. (XVIII Українська антарктична експедиція 2013/2014 рр.).

Таблиця 2.1

Відомості про місця та рік збору насіння рослин *D. antarctica*

№	Генотип	Місце збору матеріалу	Географічні координати	Рік збору матеріалу
1	BAR1	о. Барселот	S45°14.765´ W64°07.336´	2013/2014
2	Y62	о. Великий Ялур	S65°14.039´ W64°09.761´	2004/2005
3	Y66	о. Великий Ялур	S65°14.039´ W64°09.761´	2004/2005
4	Y67	о. Великий Ялур	S65°14.039´ W64°09.761´	2004/2005
5	W1	о. Вінтер	S65°14.851´ W64°15.482´	2013/2014
6	G/D4-1	о. Галіндез	S65°14.919´ W64°14.332´	2012/2013
7	G/D12-2a	о. Галіндез	S65°14.528´ W64°14.332´	2006/2007
8	G/D12-1	о. Галіндез	S65°14.528´ W64°14.332´	2013/2014
9	G/D-20	о. Галіндез	S65°14.528´ W64°14.332´	2006/2007
10	DAR12	о. Дарбо	S65°23.424´ W64°12.543´	2007
11	DAR32	о. Дарбо	S65°23.424´ W64°12.543´	2007
12	L59	о. Лейхел	S65°55.220´ W64°39.426´	2011
13	R35	м. Расмуссен	S65°14.819´ W64°05.156´	2004/2005
14	S22	о. Скуа	S65°14.039´ W64°09.761´	2009/2010

Для аналізу використовували рослини (рис. 2.2), вирощені з насіння в стерильних умовах (асептичні рослини), а також отримані від них культури тканин кореневого походження (рис. 2.3).

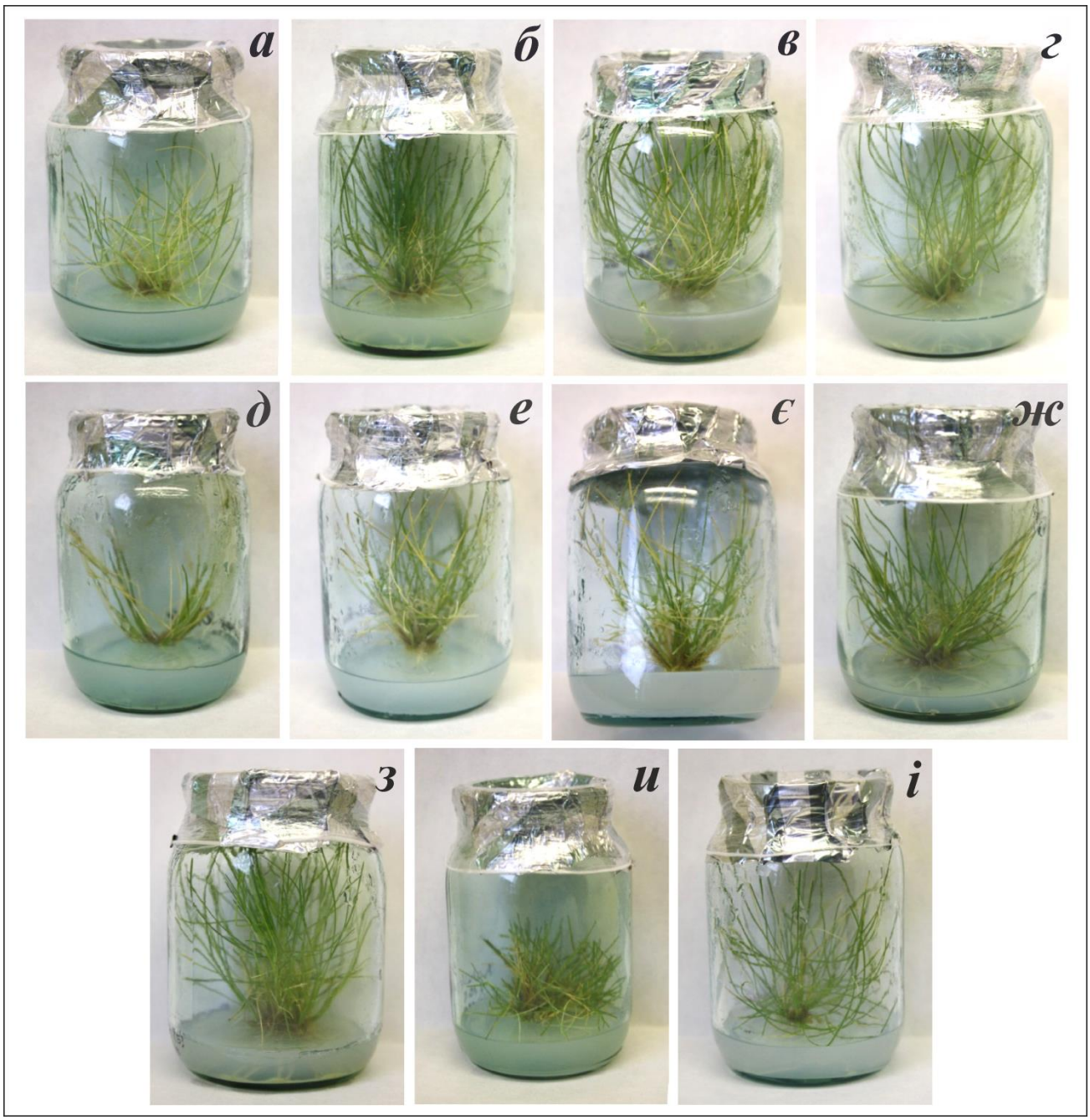

Рис. 2.2. Асептичні рослини виду *D. antarctica* таких генотипів: *а* – Y62, *б* – Y66, в – Y67, *г* – G/D12-2a, *д* – G/D4-1, *е* – G/D12-1, *є* – DAR12, *ж* – S22, *з* – R35, *и* – L59, *і* – W1

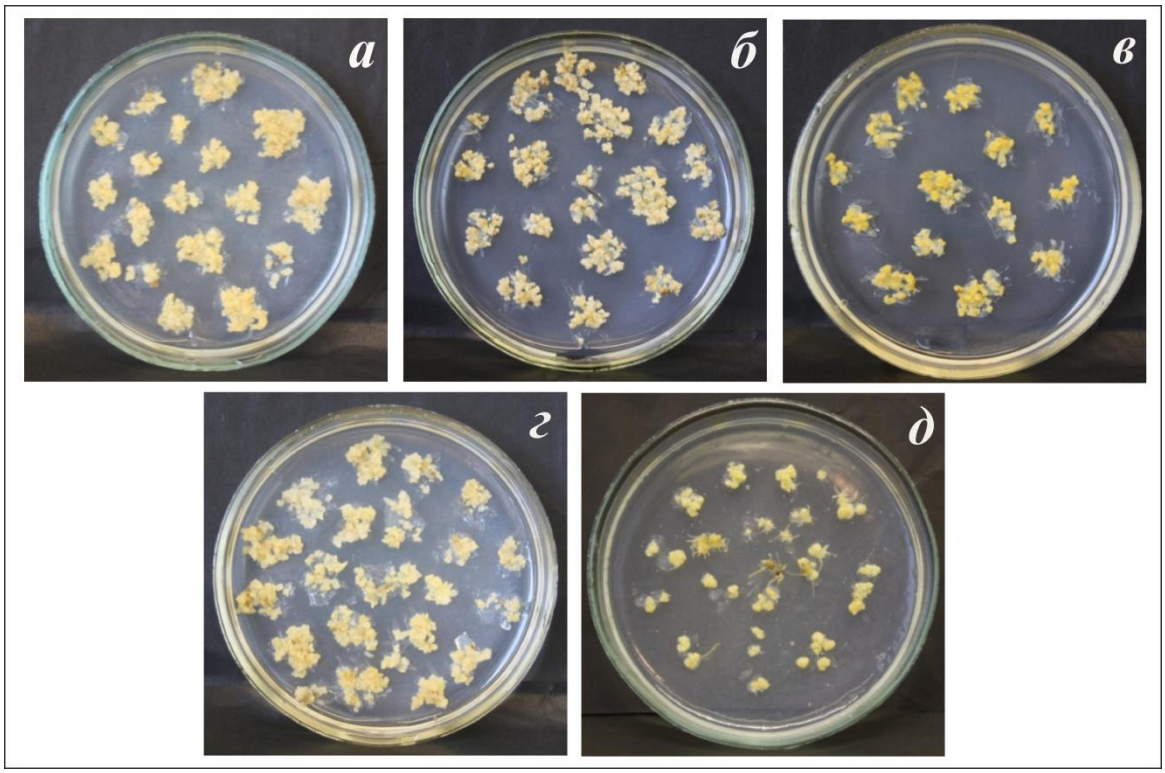

Рис. 2.3. Досліджувані калюсні культури *D. antarctica*, походженням від рослин генотипів: *а* – Y66, *б* – G/D12-2a, *в* – DAR12, *г* – S22, *д* – R35

2.2. Культивування рослин в умовах *in vitro*

2.2.1. Отримання асептичних рослин. Для отримання асептичних проростків, насіння *D. antarctica* стерилізували у розчині пероксиду водню за наступною схемою: (1) обробка розчином детергенту протягом 30 хв; (2) промивання проточною водою протягом 30 хв; (3) 2-3-разове промивання дистильованою водою; (4) поверхнева стерилізація 96 %-ним етанолом протягом 10 сек; (5) витримування у 3-5%-ному розчині H_2O_2; (6) 2-3-разове промивання стерильною дистильованою водою [202].

Асептичне насіння висаджували в чашки Петрі на агаризоване живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС) [203] без фітогормонів. Потім пророщували на світлі 3000 Лк та 16 годинному фотоперіоді при температурі 17-18°С та вологості 80 % до появи перших листочків (рис. 2.4 *а*).

Отримані проростки підрощували 1,5-2 місяці, а потім вкорінювали на живильному середовищі Гамборга-Евелей (B_5) [204], доповненому 0,1 мг/мл НОК (рис. 2.4 *б*). Розмноження рослин проводили клонуванням, шляхом поділу отриманих дернин на фрагменти.

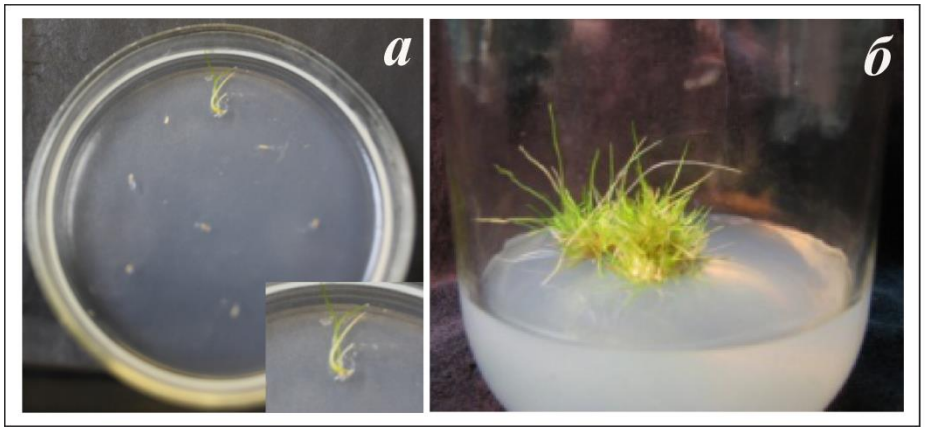

Рис. 2.4. Зображення проростка *D. antarctica*, отриманого з насіння, культивованого на середовищі МС [203] без фітогормонів (*а*) та рослина вирощена на середовищі B_5 [204] з 0,1 мг/мл НОК (*б*)

2.2.2. Отримання та культивування рослин-клонів. Досліджували рослини п’яти генотипів, походженням з популяцій островів Великий Ялур, Галіндез, Дарбо, Скуа та мису Расмуссен. Від кожної асептичної рослини було отримано по п’ять клонів, шляхом мікроклонального розмноження. Загалом початково було отримано 25 рослин. Їх культивували в окремому посуді з живильним середовищем B_5 з додаванням 0,1 мг/л НОК (табл. 2.2) за світлового режиму 3000 Лк, 16 годинного фотоперіоду, температури 17-18°С та вологості 80 %. Поділ дернин проводили залежно від швидкості наростання біомаси. Тривалість пасажу становила в середньому біля 4 тижнів. Перший відбір матеріалу для ДНК та цитологічного аналізу проводили приблизно через 5 років від початку культивування рослин в умовах *in vitro*. Кожен наступний відбір проводили через рік від останнього (ще два рази). Таким чином, ми відбирали невелику частину дернини, а решту рослини продовжували культивувати і розмножувати в тих же умовах

Таблиця 2.2

Склад живильного середовища за Гамборг-Евелей (B_5) [204] **для культивування асептичних рослин, мг/л**

Компоненти	Середовище для укорінення	Середовище для калюсогенезу	Середовище для регенерації
Макроелементи			
$(NH_4)_2SO_4$	134		
KNO_3	2500		
$CaCl_2$ x $2H_2O$	150		
$MgSO_4$ x $7H_2O$	250		
NaH_2PO_4 x H_2O	150		
Мікроелементи			
KI	0,75		
H_3BO_3	3		
$MnSO_4$ x H_2O	13,2		
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	2		
Na2MoO4 x $2H_2O$	0,25		
$CuSO_4$ x $5H_2O$	0,025		
$CoCl_2$ x $6H_2O$	0,025		
Fe-хелат			
Na_2ЕДТА x $2H_2O$	1,495 г		
$FeSO_4$ x $7H_2O$	1,114 г		
Вітаміни			
ТіамінHCl (B_1)	10		
Піридоксин HCl (B_6)	1		
Нікотинова кислота (PP)	1		
Інші компоненти			
Мезоінозит	100		
Сахароза	20000		
Агар	10000		
Фітогормони			
НОК (1 мг/л)	100 мкл		
Дікамба (30 мг/л)		100 мкл	
БАП (1 мг/л)			1 мл
НОК(1 мг/л)			100 мкл

протягом близько 2 років (20-24 пасажів). Схема експерименту наведена на рис. 2.5.

Рис. 2.5. Схема експерименту отримання, культивування та відбору матеріалу від рослин-клонів *D. antarctica*

2.2.3. Індукція та культивування калюсних культур. З метою індукції калюсоутворення було відібрано асептичні рослини п’яти генотипів, походженням з популяцій островів Великий Ялур, Галіндез, Дарбо, Скуа та мису Расмуссен. Подальші маніпуляції проводили притримуючись схеми наведеної на рис. 2.6. Відбирали експланти кореневого походження, довжиною 1-1,5 см. Висаджували їх на живильне середовище B_5 [204], доповнене 0,1 мг/мл дікамба, гербіциду з ауксиновою дією (див. табл. 2.2), з розрахунку 50 експлантів на одну чашку Петрі [205].

В якості контролю експерименту, експланти культивували на вищезазначеному середовищі без додавання дікамба. Калюсні культури вирощували в темряві при температурі 24-25°С та вологості 80 %, субкультивування проводили через кожні 4 тижні. Для дослідження відбирали калюс щонайменше через 7 тижнів від моменту закладання експлантів на живильне середовище. Для кожного дослідженого зразку було використано три повторності. Отримані дані опрацьовували статистично.

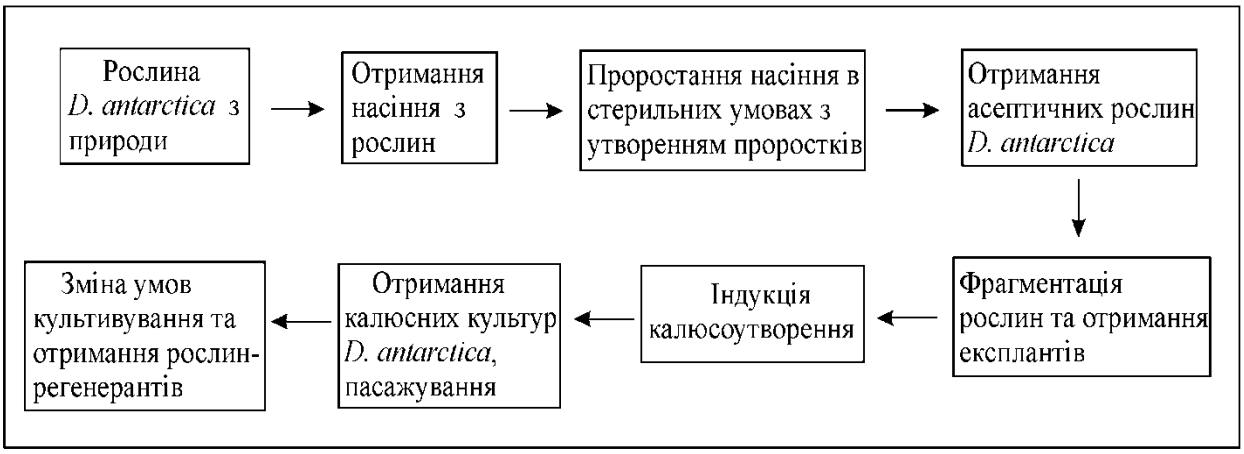

Рис. 2.6. Схема отримання калюсних культур та рослин-регенерантів *D. antarctica*

2.2.4. Отримання та культивування рослин-регенерантів. Індукцію регенерації проводили згідно [205]. Для цього шматочки досліджуваних калюсних культур (від генотипів рослин Y66, G/D12-2a, DAR12, S22, R35) після 6 тижнів культивування від моменту утворення переносили на агаризоване живильне середовище МС [203] з додаванням 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК. Зразки культивували за освітлення в 3000 Лк, 16-годинного фотоперіоду, температури 17-18°С та вологості 80 % протягом 4-6 тижнів. Після появи та утворення проростків, новоутворені рослини пересаджували в окремі ємкості із живильним середовищем МС з додаванням 0,1 мг/л БАП, і культивували ще 4 тижні. Потім рослини пересаджували у горщики з ґрунтом і підтримували у контрольованих умовах.

2.3. Цитогенетичний аналіз

Одним із універсальних методів цитогенетичного аналізу є метод давлених препаратів. При цьому як барвник використовують розчини орсеїну і карміну в оцтовій, або пропіоновій, молочній чи інших кислотах. Широке використання вказаного методу в цитогенетичних дослідженнях рослинних

об’єктів зумовлене чітким забарвленням хромосом, відносно швидким приготуванням тимчасових і постійних препаратів, можливістю порівняно легко перевести тимчасові препарати в постійні. Це забезпечує надійність визначення числа хромосом в клітині, на відміну від класичного методу приготування постійних препаратів. Проте, при виготовленні цитологічних препаратів з рослинних тканин виникає ряд труднощів, що пов’язані з особливостями будови клітинної оболонки, складністю мацерації (розділення тканини на окремі клітини), слабким профарбовуванням компонентів клітини, малими розмірами хромосом, конденсацією хромосом та труднощами при їх підрахунку [206, 207].

Вибір методики виготовлення давлених препаратів залежить від виду рослини та типу досліджуваної тканини. Тому для цитогенетичного дослідження рослин *D. antarctica* було проведено підбір умов та використано модифікований метод давлених препаратів.

Для аналізу використовували корінці асептичних рослин, довжиною 1-1,5 см, які з метою накопичення та синхронізації мітозів перед фіксацією витримували в крижаній воді при 0°С протягом доби. Зразки фіксували у суміші етанол : льодяна оцтова кислота у співвідношенні 3:1 протягом доби, а потім поміщали в 1%-ий розчин ацетоорсеїну на 3-7 днів.

Калюсні тканини *D. antarctica* досліджували на 7-му добу росту (у період найвищої мітотичної активності). Також інкубували в крижаній воді та фіксували. Отриманий матеріал переносили у 70° етанол і зберігали при кімнатній температурі.

Для приготування препаратів профарбовані корінці або шматочки калюсу (близько 5 мм) переносили на предметне скло в 1-2 краплі 45%-ї оцтової кислоти, подрібнювали препарувальною голкою і нагрівали до 70-80°С. Оцтову кислоту змінювали двічі, щоб знебарвити цитоплазму з включеннями та мацерувати тканину. Після цього препарат накривали покривним скельцем, а потім розформовували в тонкий шар, постукуючи сірником та відбираючи надлишок оцтової кислоти. Препарат накривали

фільтрувальним папером і роздавлювали. Після чого підраховували кількість хромосом.

Для цитологічного аналізу використовували мікроскоп «NU-2E Carl Zeiss». Мікрофотографування проводили цифровим фотоапаратом Canon 1000D. На кожному препараті аналізували лише метафазні пластинки, у яких можна було достовірно підрахувати кількість хромосом (при аналізі калюсних тканин підрахунок проводили у 100 метафазних пластинках).

2.4. Флуоресцентна гібридизація *in situ*

Метод флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH), вперше запропонуваний Галлом і Пардью в 1969 [208], дозволяє детектувати і локалізувати специфічні ДНК послідовності, гени та їхні складові за допомогою комплементарних їм ДНК-зондів (не більше 1 т.п.н.) на метафазних хромосомах, інтерфазних ядрах чи нитках ДНК *in situ*. Такий підхід дозволяє ідентифікувати та охарактеризувати хромосоми чи їх сегменти, здійснити фізичне картування генів на хромосомах, виявити перебудови у геномі (делеції, дуплікації, транслокації). Крім того, використання цього методу дозволяє ідентифікувати та порівняти організацію геномів видів незалежно від їхнього розміру [209, 210].

В якості маркерів для FISH-аналізу використовують консервативні послідовності геному (наприклад, гени 5S рРНК і 25S рРНК), структурні ділянки хромосом (повторювані послідовності центромер і теломер), диспергувані та тандемні повтори, МГЕ та видоспецифічні унікальні послідовності.

Такий підхід є вартісним і потребує особливих флюорофорів – хімічних речовин, що здатні флуоресціювати при потраплянні на них квантів світла. Проте, загалом це високоспецифічний швидкий метод аналізу хромосомного

набору клітин, який дозволяє виявляти якісні і кількісні перебудови геному [211].

2.4.1. Приготування препаратів метафазних хромосом з апікальної меристеми кореня. Для мацерації тканин апікальної меристеми корінців *D. antarctica* та накопичення деконденсованих С-метафаз на одному препараті дотримувались методики [212] з деякими модифікаціями.

Корінці асептичних рослин довжиною 1-2 см, зафіксовані протягом доби у фіксаторі Кларка (етанол : льодяна оцтова кислота, 3:1), відмивали в 1 мМ цитратному буфері (0,1 М $C_6H_8O_7$ х H_2O; 0,1 М $C_6H_5O_7Na_3$ х $2H_2O$; pH 4.8) тричі по 5 хвилин. Рослинний матеріал переносили на годинникове скельце з сумішшю ферментів (1% целюлози Onozuka RS та 20% пектинази Sigma P4802 в 10 мМ цитратному буфері) та інкубували протягом 1,5-2 годин при 37°С. Після мацерації суміш ферментів замінювали на 1 мМ цитратний буфер. Корінці переносили на інше годинникове скло з 45%-ою оцтовою кислотою, та відділяли зону меристеми від іншої частини кореня препарувальними голками під стереомікроскопом Nikon SM 2645. Меристематичні тканини переносили в центр предметного скельця, накривали покривним скельцем і придавлювали. Препарати перевіряли на наявність і якість метафазних пластинок з використанням фазово-контрастного мікроскопу Olympus CH30 за збільшення об’єктива 20× та 40×. Для аналізу використовували лише препарати, в яких клітини утворювали гомогенний моношар та можна було знайти щонайменше 10 метафазних пластинок з чітко видними хромосомами. Такі препарати заморожували на сухому льоді, знімали покривне скельце лезом та залишали висихати при кімнатній температурі.

2.4.2. ДНК-зонди та їх мічення. В роботі було використано наступні ДНК-зонди:

- **5S рДНК** послідовність, походженням з клону pTa749 *Triticum aestivum* [213], шляхом ампліфікації та мічення. Реакційна суміш для проведення ПЛР об’ємом 50 мкл містила: 30нг ДНК, 2,5 мМ dNTP, 1,75 мкл

дігоксигенін-11-dUTP (1 мМ, Roche), 0,2 нМ М13 універсального прямого праймера, 0,2 нМ М13 універсального зворотнього праймера, 2,5 uTaq-полімерази (Sigma), 10× ПЛР-буфер з $MgCl_2$ (Sigma), 23,5 мкл dH_2O.

- **послідовність HT100.3 теломерних повторів** ($(TTTAGGG)_n$) з *A. thaliana* [214] було одержано шляхом ПЛР-мічення із тетраметилродамін-4-dUTP (Roche). Реакційна суміш об'ємом 50 мкл містила: 30нг ДНК HT100.3, 2,5 мМ dNTP, 1,75 мкл дігоксигенін-11-dUTP (1 мМ, Roche), 0,2 нМ М13 універсального прямого праймера, 0,2 нМ М13 універсального зворотнього праймера, 2,5 uTaq-полімерази (Sigma), 10× ПЛР-буфер з $MgCl_2$ (Sigma), 23,5 мкл dH_2O.

- **центромерну послідовність злаків CCS1** (260 bp) з *Brachypodium sylvaticum* [215] мітили за допомогою ПЛР з дігоксигенін-11-dUTP (Roche). Реакційна суміш об'ємом 50 мкл містила: 30нг ДНК CCS1, 2,5 мМ dNTP, 1,75 мкл дігоксигенін-11-dUTP (1 мМ, Roche), 0,2 нМ праймера CCS-A, 0,2 нМ праймера CCS-B, 2,5 U Taq-полімерази (Sigma), 10× ПЛР-буфер з $MgCl_2$ (Sigma), 23,5 мкл dH_2O.

Реакції ампліфікації проводили в термоциклері «Thermo Cycler Applied Biosystems» протягом 2 годин при такому температурному режимі: 94°C – 1 хв, 35× (94°C – 40 сек, 55°C – 40 сек, 72°C – 1 хв), 72°C – 5 хв.

- **25S рДНК** мітили тетраметилродамін-4-dUTP шляхом нік-трансляції 2,3 kb *Cla*I фрагменту кодуючої ділянки 25S рДНК *A. thaliana* [216] і використовували для візуалізації локусу 45S рДНК (18S, 5.8S та 25S рРНК).

Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила: 25-100 нг/мкл ДНК, по 0,05 мМ кожного з дАТФ, дЦТФ, дГТФ та 0,03 мМ дТТФ, 0,83 мкл тетраметилродамін-4-dUTP (1 мМ, Roche), 4 мкл ферментної суміші для нік-трансляції (Roche), що включала суміш ферментів ДНКази та фрагмента Кленова. Реакцію проводили в термоциклері «BIO-RAD» протягом 2 год при такому температурному режимі: 15°C – 1,5 год, 65°C – 15 хв, 12°C – 5 хв. Всі зонди очищали від домішок невключених нуклеотидів шляхом осадження

високомолекулярного міченого продукту етанолом. Осад розчиняли в 10 мкл буферу ТЕ і зберігали при –20°С.

2.4.3. Денатурація та гібридизація. Перед денатурацією хромосомну ДНК обробляли РНКазою для видалення РНК, яка може призводити до появи фонового сигналу. Для цього на кожен препарат наносили по 200 мкл розчину РНКази А (100 мкг/мл), накривали пластиковим покривним скельцем та інкубували при 37°С протягом 1 години. Знявши покривне скельце, промивали в 2× SSC двічі по 5 хв. Препарати поміщали в свіжоприготовлений 1 % розчин формальдегіду в 1× PBS на 10 хв. Потім промивали 2× SSC двічі по 5 хв. Всі операції проводили при кімнатній температурі. Препарати зневоднювали (серія промивок по 3 хв в етанолі 70%, 90%, 100%) і залишали висихати. Після чого відразу використовували для аналізу чи залишали при +4°С до використання.

На наступному етапі проводили денатурацію ДНК зонду і хромосом, та їх гібридизацію. Для високоефективного зв’язування (за умови ідентичності послідовностей, що гібридизуються ≥ 77%) гібридизаційну суміш готували як описано в табл. 2.3 з розрахунку на кожен препарат. Денатурацію проводили при 75°С на водяній бані, а потім залишали при +4°С на 10 хв.

На кожний препарат метафазних хромосом наносили по 40 мкл гібридизаційної суміші з денатурованим міченим зондом та накривали пластиковим покривним скельцем. Гібридизацію проводили при 70°С протягом 2 хв у термоциклері OmniSlide Thermal Cycler (ThermoElectron Corporation) з подальшим охолодженням до 37°С. Далі препарати витримували в герметично закритій вологій камері при 37°С протягом 16-20 год.

Після гібридизації з препаратів знімали покривні скельця, і відмивали від неспецифічно зв’язаного зонду спочатку в 2× SSC двічі по 5 хв, потім в розчині 15 % формаміду в 0,1× SSC протягом 10 хв, і знову в 2× SSC двічі по 5 хв при 42°С. Наступне промивання здійснювали в 2× SSC двічі по 5 хв при 37°С [212].

Таблиця 2.3

Склад реакційної суміші для проведення *in situ* гібридизації

Реагент	Концентрація	мкл/ препарат	З розрахунку на 10 препаратів, мкл
dH_2O		1,5	15
100% Формамід	50%	20	200
20× SSC	2x	4	40
50% Декстран сульфат	10%	8	80
10% SDS	0,5%	2	20
ДНК-зонд1*	25-100 нг/препарат	2,5	25
ДНК-зонд2*	25-100 нг/препарат	2	20
Сума:		40	400

* Примітки: як ДНК-зонд 1 і ДНК-зонд 2 використовували послідовності 5S рДНК і 25S рДНК, а в іншому випадку ДНК центромерних і теломерних повторів

2.4.4. Імунодетекція ДНК-зондів. Імунодетекція дозволяє виявляти зонди, мічені дігоксигеніном, за допомогою флуоресцентних антитіл. Для цього попередньо отримані препарати промивали в розчині 0,2 % Tween в 4× SSC протягом 5 хв. Далі підсушували, додавали блокуючий агент та інкубували у вологій камері протягом 30 хв в темряві. До кожного препарату додавали FITC-коньюговані антитіла до дігоксигеніну (у розведенні 1:11 до 5%-го блокуючого агенту) та інкубували при 37°C протягом 1 год. Відмивання антитіл, що не зв’язались із ДНК-зондом, здійснювали в розчині 0,2 % Tween в 4× SSC три рази по 10 хв при 37°C.

2.4.5. Візуалізація та обробка зображень. Кожен препарат зневоднювали (по 1 хв в етанолі 70 %, 90 %, 100 %) і залишали висихати протягом 15-20 хв на повітрі. Потім наносили 7-10 мкл розчину DAPI : Vectashield (9:1) та накривали покривним скельцем, розміром 24 × 24 мм. Препарати зберігали близько 24 год в темному місці при 4°C для

кращого зв'язування зонду з хромосомною ДНК і стабілізації сигналу. Аналіз і мікрофотографування препаратів здійснювали за допомогою мікроскопа Olympus Provis AX70 з CCD камерою Hamamatsu C5810. Початкову локалізацію хромосом здійснювали під DAPI фільтром (450 нм, синій) при малих збільшеннях об'єктива (25×) з наступним переключенням на більші (40×, 63×, 100× з імерсією). Для ідентифікації сигналів генів рРНК, цетромерних та теломерних повторів, препарати розглядали під FITC (515 нм, зелений) та Tetramethyl-rhodamine (575 нм, червоний) фільтрами.

2.5. Проточна цитофлюориметрія

Розмір ядерного геному (2C) всіх досліджуваних рослин *D. antarctica* було виміряно за допомогою методу проточної цитофлюориметрії. В експерименті використовували 2-3 рослини кожного з генотипів. Зразки, що були ізольовані з молодих листків *D. antarctica*, та внутрішній стандарт подрібнювали разом за допомогою леза і поміщали в чашку Петрі з 500 мкл буферу для екстракції ядер (CyStain PI Precision P Sysmex 05-5022) з 1%-м β-меркаптоетанолом (Sigma) і 1% Тритон X-100 (Sigma). Суспензію ядер фільтрували через сіточку з діаметром пор 30 мкм (CellTrics, Sysmex) в чисту пробірку. Далі проби фарбували, використовуючи 2 мл буферу, що містить пропідій йодид і РНКазу (Staining Buffer CyStain PI Sysmex Precision P 05-5022). Зразки інкубували протягом 45 хв при кімнатній температурі в темряві. Далі проводили аналіз, використовуючи проточний цитометр CyFlow Space (Sysmex), обладнаний зеленим лазером (532 нм). Для кожного зразка (генотипу) було проаналізовано щонайменше 10 000 ядер. Як внутрішній стандарт для диплоїдних генотипів було обрано *Secale cereale* L. subsp. *cereale* (2C=16.01 пг, Genebank Gatersleben accession number: R737), тоді як *Vicia faba* L. cv 'Tinova' (2C=26.21 пг, Genebank Gatersleben accession

number: FAB602) використовували в якості внутрішнього контролю для гіпотриплоїдного генотипу *D. antarctica*.

2.6. Молекулярно-генетичний аналіз

2.6.1. Виділення ДНК із рослинних тканин. Процедура виділення ДНК є основою більшості молекулярно-генетичних досліджень. Основна проблема при виділенні рослинної ДНК полягає в ефективному руйнуванні клітинної стінки. Крім того, рослинні тканини містять велику кількість полісахаридів, танінів, пігментів, які в багатьох випадках дуже складно відділити від ДНК. Ці речовини заважають кількісному визначенню нуклеїнових кислот спектрофотометричними методами. Крім того, вони інгібують дію багатьох ферментів, які використовуються при подальшому дослідженні генетичного матеріалу. Тому вибір оптимальних умов виділення ДНК є важливим етапом роботи.

ДНК *D. antarctica* виділяли за ЦТАБ-методом [217]. Виділення проводили із листків асептичних рослин та калюсних культур на 20-25 день росту. Свіжу тканину розтирали в ступці з рівним об’ємом 2× ЦТАБ буферу (0,1М трис-HCl, pH 8.0; 20-40 мМ ЕДТА, pH 8.0; 1,4М NaCl, 2% ЦТАБ). Надмірно в’язку суспензію рослинного препарату розводили додаванням одного об’єму 1× ЦТАБ буферу. Екстракцію проводили протягом години при 65°С при обережному перемішуванні. До грубого екстракту додавали рівний об’єм суміші хлороформ : ізоаміловий спирт (у співвідношенні 24:1) і перемішували протягом 5 хв до утворення гомогенної суспензії. Для розділення водної і органічної фаз суспензію центрифугували при 9000 об/хв протягом 3-5 хв. До водної фази додавали рівний об’єм суміші хлороформ : ізоаміловий спирт (24:1) і повторювали екстракцію. До водної фази додавали рівний об’єм ізопропанолу, перемішували і осаджували при 9000 об/хв протягом 5 хв. Отриманий осад двічі промивали 70%-им

етанолом. Після чого центрифугували при 9000 об/хв протягом 2-3 хв, відбирали спирт і підсушували. Осад ДНК розчиняли в 1×ТЕ буфері (10мМ трис-HCl, pH 8.0; 1мМ ЕДТА, pH 8.0) і зберігали при температурі -20°С. Якість отриманих зразків ДНК оцінювали за допомогою гель-електрофорезу шляхом порівняння з ДНК фага λ відомої концентрації або із використанням спектрофотометра Nanodrop ND-1000.

2.6.2. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Молекулярно-генетичний аналіз проводили методом полімеразної ланцюгової реакції послідовностей ДНК, фланкованих мікросателітними повторами (ISSR), та послідовностей, що розташовані між ретроелементами (IRAP). Відомо, що ПЛР-аналіз із такими типами праймерів відображає переважно мінливість некодуючих ділянок ДНК і чутливий до багатьох типів мутацій. Крім того, метод не потребує інформації про послідовність ДНК досліджуваних видів. Завдяки високій чутливості для аналізу достатньо малих кількостей ДНК, що має особливе значення при роботі з унікальними чи рідкісними видами рослин.

У дослідженні використовували ISSR- та IRAP-праймери, нуклеотидні послідовності яких наведено у табл. 2.4. Ампліфікацію проводили в термоциклері Терцик МС2 («Біотехнологія», РФ). Для реакції використовували реактиви фірми АмпліСенс, РФ. Реакційна суміш для проведення ПЛР об’ємом 20 мкл містила: 20 нг ДНК, 0,2 мМ дНТФ, 1,25U Taq-полімерази, 0,25 мкМ відповідного праймера, 1× ПЛР-буфер з 1,5 мМ $MgCl_2$. Як негативний контроль у реакційну суміш замість розчину ДНК додавали рівний об’єм води. На реакційну суміш нашаровували 15 мкл мінеральної олії.

Для ампліфікації фрагментів при ПЛР застосовували наступний температурний режим: 94°С – 2 хв, 35× (94°С – 30 с, 53°С – 30 с, 72°С – 1 хв 30 с), 72°С – 5 хв. Реакцію з кожним праймером повторювали щонайменше двічі.

Таблиця 2.4

Характеристика використаних праймерів та отриманих ПЛР-продуктів

№	Тип праймера	Назва праймера	Нуклеотидна послідовність, 3'–5'
1	ISSR	UBC#03	$(AC)_8TT$
2		UBC#04	$(AC)_8AG$
3		UBC#05	$(AC)_8TG$
4		UBC#23	$(AC)_8TA$
5		UBC#59	$(AG)_8GC$
6		UBC#807	$(AG)_8T$
7		UBC#810	$(GA)_8T$
8		UBC#811	$(GA)_8C$
9		UBC#836	$(AG)_8YC$
10		UBC#840	$(AG)_8YA$
11	IRAP	1651	TGACCAAGGGCGCGTATCGTG
12		1681	ATACCTGGAGGCTGCACCTG
13		642	TTTGAAAACTGGCGGCAACG
14		866	ACCAGCCCGGGCCGTCGACC

2.6.3. Електрофорез ДНК в агарозному гелі. Для приготування агарозного гелю 1,5 %-у суміш агарози нагрівали на водяній бані до повного розчинення порошку, охолоджували до 50°С і додавали 20× SB буфер (100 мМ $Na_2B_4O_7$, pH 8.5) [218] до кінцевої концентрації в 1×. Для візуалізації фрагментів ДНК в агарозний розчин вносили бромистий етидій в кількості 0,5 мкг/мл. Готовий розчин агарози заливали в горизонтально встановлену плашку з поміщеною в неї гребінкою. Гель після повного затвердіння переносили в електрофорезну камеру, куди заливали 1× SB буфер для розділення.

Для приготування зразків, ПЛР продукти в кількості 15-20 мкл змішували з 2 мкл буферу для нанесення проб, який складався із 5-10 % гліцерину і 0,025 % бромфенолового синього. Приготований таким чином препарат вносили в лунки під буфер [219].

Електрофорез проводили при напрузі електричного струму 3-4 В/см протягом 4-6 годин. Гелі фотографували в проникаючому УФ світлі

цифровим фотоапаратом з використанням фільтра «О-2,8×». Для визначення розміру фрагментів використовували ДНК-маркер «100 bp+1.5 Kb+3 Kb» (СибЭнзим, РФ).

2.7. Статистичні методи обробки результатів досліджень

При визначенні числа хромосом та розміру геному рослин результати вимірювань представляли у вигляді $x \pm s$, де x – середнє арифметичне результатів окремих вимірів, s – стандартна похибка виміру [220].

Для кількісної оцінки генетичного поліморфізму електрофоретичні спектри ПЛР-продуктів записували у вигляді бінарної матриці, у якій наявність чи відсутність у спектрі однакових за розміром ампліконів позначали відповідно як «1» чи «0». Враховували тільки добре помітні і відтворювані у повторних реакціях амплікони. На основі отриманої матриці за допомогою програми FAMD1 розраховували генетичні відстані за Жакардом [221].

Відносну кількість клітин з різним числом хромосом у калюсних тканинах виражали у відсотках (%), а похибку розраховували за формулою 2.1:

$$m = \sqrt{P.q/n} \qquad (2.1)$$

де P – відсоток клітин з визначеним числом хромосом, q – різниця (100 – P), n – число проаналізованих клітин (100).

Обробку даних та побудову графіків виконували за допомогою програм Microsoft Excel та CorelDRAW.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Генетичні дослідження рослин *D.antarctica*

3.1.1. Дослідження цитогенетичних особливостей каріотипу виду. Для встановлення хромосомного числа виду доцільним є вивчення його представників з різних популяцій чи місць поширення. Наведені у літературі дані стверджують, що 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 [125, 197, 199]. Разом з тим, на о. Кінг Джордж були виявлені рослини з міксоплоїдією [197].

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

Результати цитогенетичного аналізу рослин *D. antarctica* представлені в табл. 3.1. У каріотипі 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. 3.1). Водночас, рослини генотипів DAR12, Y66 та Y67 виявилися міксоплоїдами з анеуплоїдними клітинами.

Таблиця 3.1

Цитогенетичний аналіз рослин *D. antarctica* з району Аргентинських островів Морської Антарктики

№	Генотип	Локалітет	К-сть досліджених			Число хромосом (2n)*	Модальне число хромосом	К-ть метафаз з модальним числом, %
			рослин	корінців	метафаз			
1	BAR1	о. Барселот	1	9	45	26 (45)	26	100
2	G/D12-2a	о. Галіндез	3	18	61	26 (61)	26	100
3	G/D4-1		1	15	21	26 (21)	26	100
4	G/D12-1		1	9	24	26 (24)	26	100
5	G20		1	5	43	26 (43)	26	100
6	DAR12	о. Дарбо	3	24	92	13(3), 18(3), 23(5), 26(55), 26+1-2B(22), 27(3), 28(1)	26	59,8
7	DAR32		1	5	15	26 (15)	26	100
8	L59	о. Лейхел	1	3	32	26 (32)	26	100
9	R35	мис Расмусен	3	16	37	26 (37)	26	100
10	S22	о. Скуа	3	18	45	26 (45)	26	100
11	Y62	о. Великий Ялур	1	7	67	26 (67)	26	100
12	Y66		4	28	144	13(1), 36(52), 37(3), 38(80), 39(9)	38	55,2
13	Y67		1	7	45	26(43), 38(1)	26	97,7
14	W1	о. Вінтер	1	7	17	26 (17)	26	100

*Примітка: у дужках вказано кількість метафаз із зазначеним числом хромосом

77

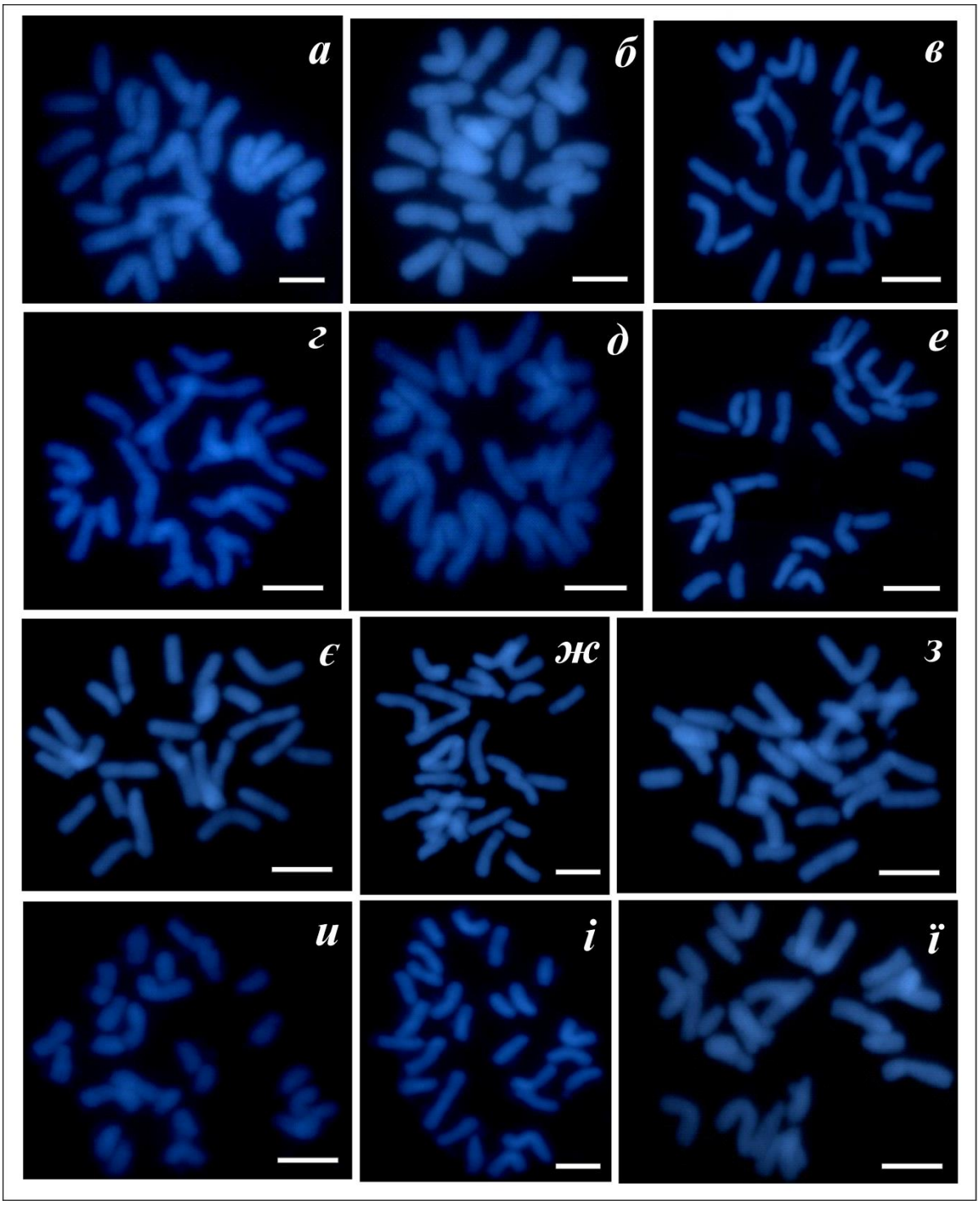

Рис. 3.1. Метафазні пластинки клітин апікальної меристеми кореня рослин *D. antarctica* з диплоїдним набором хромосом (2n=26) таких генотипів: *а* – BAR1, *б* та *в* – G/D12-2a, *г* – G/D4-1, *д* – G/D12-1, *е* – G20, *є* – DAR32, *ж* – L59, *з* – R35, *и* – S22, *і* –Y62, *ї* – W1. Забарвлення DAPI. Масштаб 10 мкм

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 досліджуваних рослин, поряд із клітинами з 26 хромосомами, було виявлено клітини з додатковими хромосомами (2n=26+0-2B). Кількість додаткових хромосом у каріотипі становила одну-дві (табл. 3.1, рис. 3.2, 3.3).

Подібно до *D. antarctica*, B-хромосоми також були знайдені у інших видів роду *Deschampsia*, зокрема в *D. caespitosa* (2n=26+0–2B) та *D. wibeliana* (2n=26+0–5B) [195]. Серед злаків B-хромосоми описані також для жита 2n=2x=14+B [86, 88], кукурудзи 2n=2x=20+B та інших видів [89]. Хоча наявність у каріотипі B-хромосом є досить поширеним явищем серед покритонасінних, найчастіше їх виявляють у рослин, що зростають в суб-оптимальних чи екстремальних умовах. Тому існує гіпотеза про існування зв'язку між наявністю B-хромосом та адаптивним потенціалом рослин, що можливо забезпечує підвищену стійкість до посухи та низьких температур. Не можна виключити той факт, що поява у каріотипі рослин додаткових хромосом може сприяти заселенню нових екологічних ніш, а висока екологічна пластичність видів пов'язана із зростанням частоти організмів із B-хромосомами [89].

Рослини генотипу Y66, що походили 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 (табл. 3.1, рис. 3.2, 3.3). Розмах мінливості за числом хромосом у таких рослин становив від 13 до 39 хромосом, що відповідає гаплоїдному та триплоїдному набору цього виду. У генотипу Y66 модальний клас формували клітини з 36 хромосомами (однак, були виявлені також клітини з 37, 38 та 39 хромосомами). Аналіз інших зразків з о. Великий Ялур виявив диплоїдний (Y62) та міксоплоїдний (Y67) генотипи (табл. 3.1).

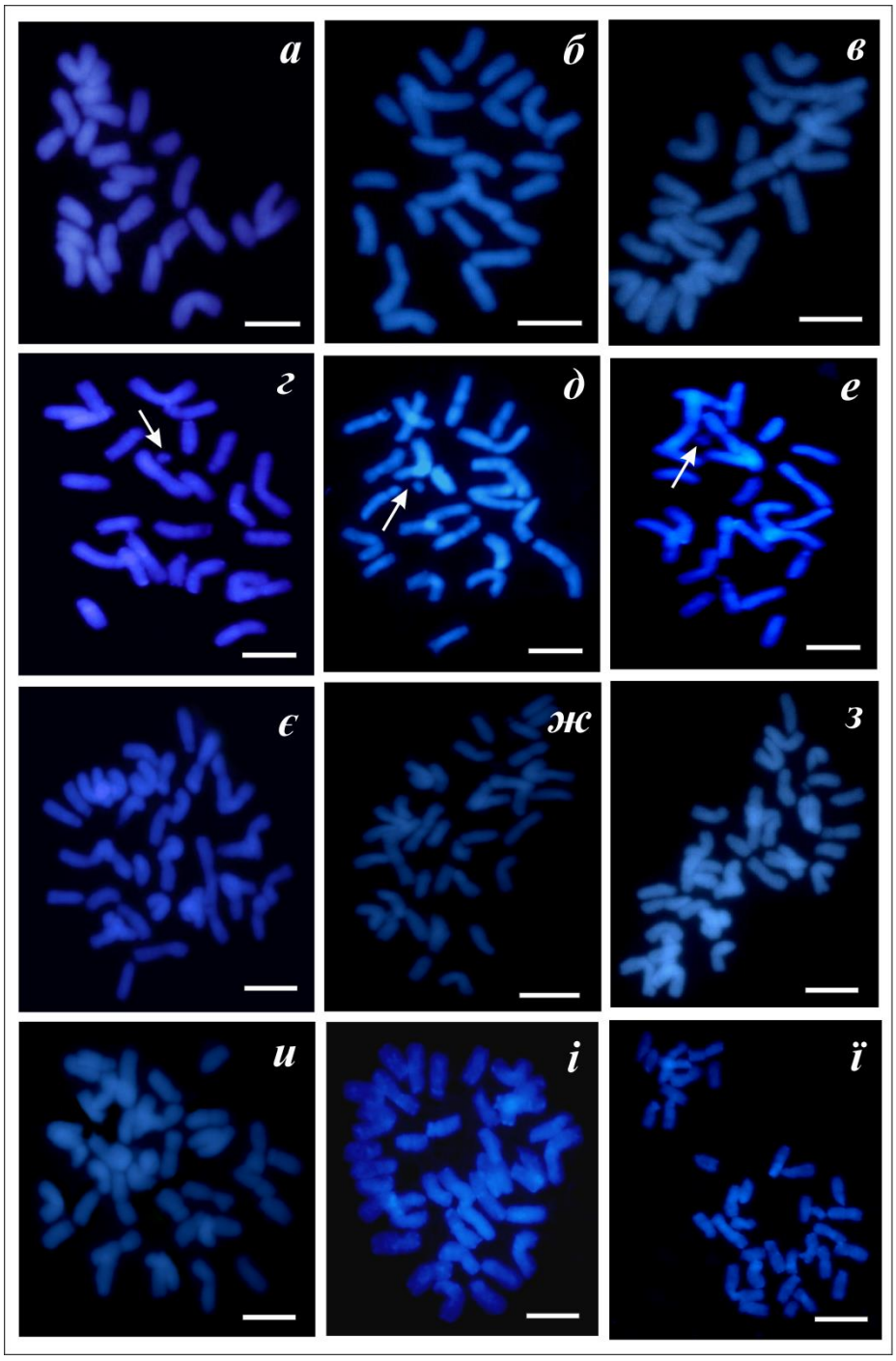

Рис. 3.2. Метафазні пластинки клітин апікальної меристеми кореня міксоплоїдних рослин *D. antarctica* таких генотипів: *а*, *б*, *в* – DAR12 (2n=26), *г*, *д*, *е* – DAR12 (2n=26+1B), *є*, *ж*, *з* – Y66 (2n=36), *и* – Y66 (2n=38), *і* – Y66 (2n=39), *ї* – Y67 (2n=38). Забарвлення DAPI. B-хромосоми вказано стрілками. Масштаб 10 мкм

Диплоїдний набір хромосом 2n=26, тобто основне хромосомне число x=13, є найхарактернішим для представників роду *Deschampsia*. Водночас, у

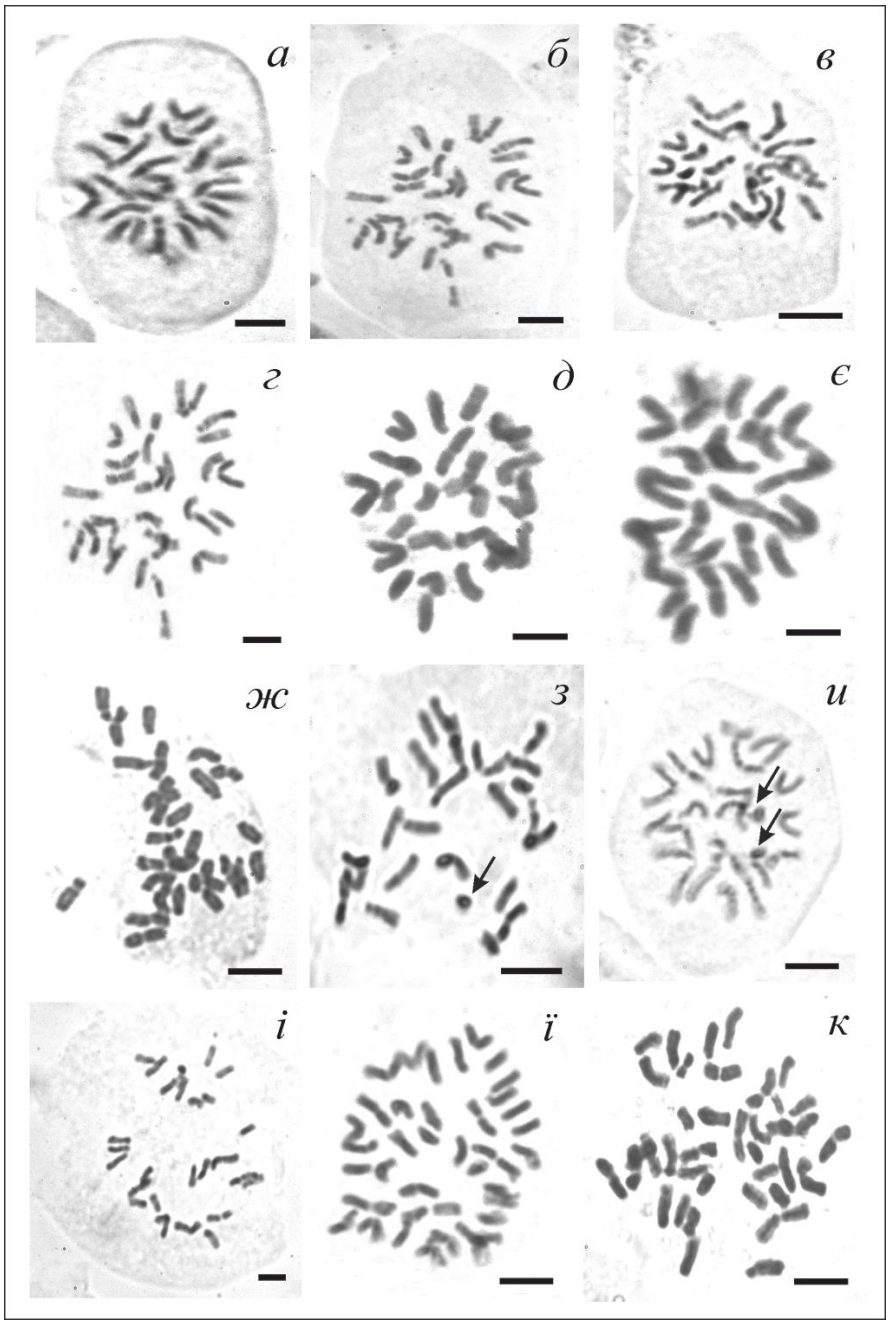

Рис. 3.3. Метафазні пластинки клітин апікальної меристеми кореня рослин *D. antarctica* таких генотипів: *а* – BAR1 (2n=26), *б* – G/D12-2a (2n=26), *в* – L59 (2n=26), *г* – R35 (2n=26), *д* – W1 (2n=26), *є* – S22 (2n=26), *ж* – DAR12 (2n=26), *з* – DAR12 (2n=26+1B), *и* – DAR12 (2n=26+2B), *і* – DAR12 (2n=23), *ї* – Y66 (2n=36), *к* – Y66 (2n=38). Забарвлення ацетоорсеїном. B-хромосоми вказано стрілками. Масштаб 10 мкм

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, які

характеризуються найбільшим різноманіттям основного хромосомного числа (x=2–13) [222, 223]. Для представників роду *Deschampsia* відомі також поліплоїдні та триплоїдні генотипи, які мають 52 (*D. brevifolia* R. Br., *D. mackenzieana* Raup., *D. mildbraedii* Pilg.) чи 39 хромосом (*D. alpine* (L.) Roem et. Schult.) [125, 197]. 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 втрати хромосом чи дисплоїдії (28–26) від поліплоїдних видів [196, 224]. Вважають, що *D. antarctica* – один із видів, еволюція якого йшла саме в напрямку дисплоїдії [197].

Наразі екологічне і адаптивне значення існування хромосомних форм з різним рівнем плоїдності у рослин роду *Deschampsia* невідоме. Цілком ймовірно, що їх формування зумовлене особливостями місць існування: диплоїдні цитотипи зростають переважно в нормальних природних умовах, тоді як тетраплоїди зазвичай зустрічаються в середовищах з субоптимальними умовами, що свідчить про їх підвищену здатність до заселення нових територій [225]. Рослини з різним рівнем плоїдності було виявлено раніше і в інших видів *Deschampsia*, головним чином в декількох таксонів (підвидів) комплексу *D. caespitosa*, що включає диплоїдні, триплоїдні і тетраплоїдні цитотипи [137, 225]. Вищенаведені дані дозволяють провести паралель між хромосомними формами північної та південної груп роду. Хоча частина ареалу *D. antarctica* займає достатньо специфічний за своїми умовами регіон Антарктики, у цього виду наразі знайдено весь спектр хромосомної мінливості, описаний для роду *Deschampsia*, та близькоспорідненого виду *D. caespitosa*, зокрема.

Хромосомну нестабільність та міксоплоїдію у *D. antarctica* було знайдено й іншими дослідниками при аналізі рослин з о. Кінг Джордж (Південні Шетлендські острови), міксоплоїдними виявились п’ять із чотирнадцяти рослин. У них, поряд із клітинами з хромосомним набором 2n=26, знайдено метафази з 28 хромосомами [197].

У літературі є повідомлення про наявність міксоплоїдії у близькоспорідненого виду – *D. caespitosa* (L.) Beauv. У клітинах апікальної меристеми корінців проростків поряд із диплоїдними клітинами (2n=26), було знайдено клітини з різним рівнем плоїдності (від 2n=26 до 4n=52) [195, 197]. Деякі дослідники для *D. caespitosa* наводять й інші числа хромосом – 2n=27, 28, 39, 49, 52. Такі дані вказують на те, що описані для цього виду міжіндивідуальні та внутрішньоідивідуальні зміни числа хромосом, анеуплоїдія та анеусоматія пов'язані здебільшого з поліплоїдією. Окрім того, знайдена мінливість числа хромосом може бути зумовлена явищем анеусоматії [197].

Виявлена у рослин *D. antarctica* анеуплоїдія може бути пов'язана з особливостями біології та системи розмноження виду. Як відомо, розмноження *D. antarctica* відбувається шляхом вегетативної та статевої репродукції. Високий рівень анеуплоїдії зазвичай спостерігається у видів, які розмножуються вегетативно [151, 226].

Міксоплоїдію описано й для багатьох інших рослин, зокрема, для *Plukenetia volubilis* L. [227], *Santalum album* L. [228], видів родини *Brassicaceae* [229, 230, 231], видів роду *Bromus* L. [232], *Cupressaceae* [233]. У меристемах різних видів частка клітин з кількістю хромосом, відмінною від диплоїдного набору, може сягати 77 % [9].

Вважають, що міксоплоїдія може підвищувати адаптивний потенціал рослин. Ймовірно, що вона є відображенням підвищеної адаптаційної здатності організму, яка проявляється у виживанні особин, що несуть значну частку клітин із зміненою кількістю хромосом [9]. Відомо, що особини з різним числом хромосом, які спонтанно виникають у популяціях, забезпечують генетичний матеріал для виникнення нових форм, рас та навіть видів. Варіювання числа хромосом (міксоплоїдія, анеуплоїдія, поліплоїдія) розглядають також як один із факторів еволюції рослин [113].

Таким чином, у результаті цитогенетичного аналізу нами підтверджено хромосомне число 2n=26 для більшості досліджених рослин *D. antarctica* з

регіону Аргентинських островів Морської Антарктики. Нові форми хромосомного поліморфізму, рослини з міксоплоїдією, анеуплоїдією, гіпотриплоїдією та додатковими хромосомами у каріотипі *D. antarctica*, виявлено вперше.

3.1.2. Визначення розміру геному рослин *D. antarctica*. Вміст ДНК в гаплоїдному геномі (значення C) є важливою біологічною характеристикою організму. Кожен вид рослин має характерне число пар нуклеотидів в ядерному геномі або ядерний вміст ДНК, які переважно є сталою величиною [234].

Згідно з Беннет та Лейтч, розмір геному покритонасінних видів варіює в межах від 63 Mb у видів роду *Genlisea* (*G. aurea*, 2n=52; *G. margaretae*, 2n=40) до 149 000 Mb у виду *Paris japonica* (2n=8x=40) [235]. Види з найменшими геномами < 200 Mb належать до однодольних і 13 різних родин дводольних. Середній розмір геному покритонасінних складає 5800 Mb [30, 236].

Дані про розмір геному представників родини *Deschampsia*, що наведені в літературі, досить обмежені. Значення 2C встановлено не для всіх видів. Ядерний вміст ДНК виду *D. antarctica* наведено лише в одній роботі [237]. 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.

В результаті аналізу проточної цитофлюориметрії, 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 (табл. 3.2, рис. 3.4 *а–з*). Ядерний вміст ДНК у зразків DAR12 (2n=26+0-2B), які містили додаткові хромосоми в каріотипі, був близьким до 10,86 пг/2C, що знаходиться в межах діапазону значень, отриманих для диплоїдних рослин (табл. 3.2, рис. 3.4 *и*).

Таблиця 3.2

Розмір геному рослин *D. antarctica*, відмінних за числом хромосом

Генотип	Кількість проаналізованих рослин	Число хромосом	Плоїдність	Вміст ДНК (пг/2С), x ± s*
G/D4-1	2	26	2x	11,01±0,03
G/D12-2a	2	26	2x	10,84±0,09
G/D12-1	2	26	2x	11,02±0,06
L59	2	26	2x	11,01±0,12
R35	3	26	2x	10,77±0,02
S22	2	26	2x	10,94±0,04
W1	3	26	2x	10,91±0,04
Y62	2	26	2x	10,85±0,10
Y67	2	26	2x	10,79±0,07
DAR12	3	26+0-2B	2x	10,86±0,04
Y66	2	36-39	3x	16,46±0,23

*Примітки: x – середнє значення, s – стандартне відхилення

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 (табл. 3.2, рис. 3.4 *і*). Це ще раз підтвердило гіпотриплоїдну природу рослин генотипу Y66.

Значення розміру геному, встановлені для рослин *D. antarctica* з регіону Аргентинських островів Морської Антарктики, узгоджуються з даними, що були описані раніше: вміст 2С ДНК для рослин *D. antarctica* (2n=26) з о. Галіндез становив 9,95 пг, а для тетраплоїдної форми *D. caespitosa* (2n=52) з району Британських островів Морської Антарктики було встановлене значення 9,0 пг ДНК [237]. Крім того, відомо, що для *D. cespitosa* (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 [238].

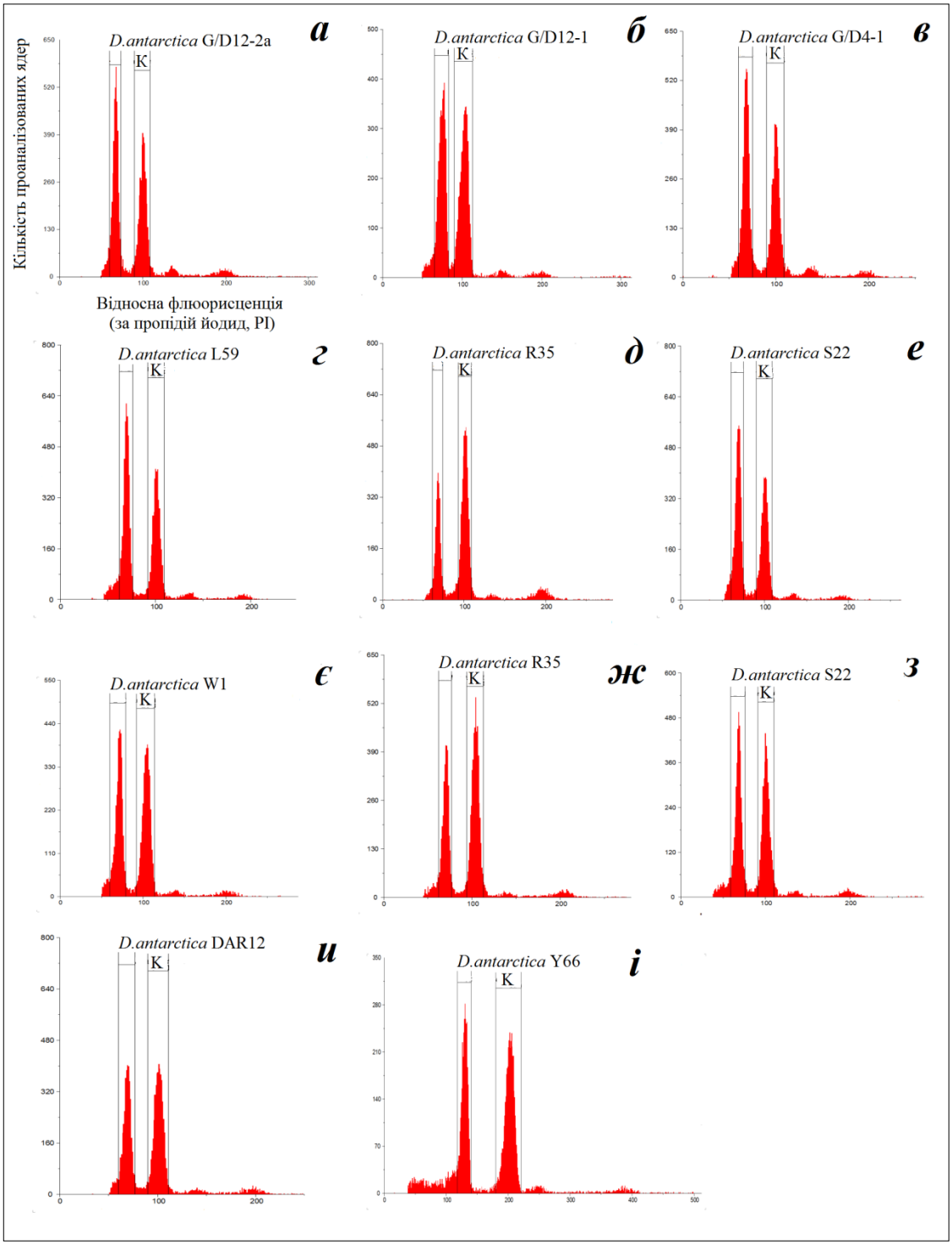

Рис. 3.4. Гістограми розподілу за вмістом ДНК (2C) рослин *D. antarctica* таких генотипів: *а* – G/D12-2a (2n=26), *б* – G/D12-1 (2n=26), *в* – G/D4-1 (2n=26), *г* – L59 (2n=26), *д* – R35 (2n=26), *е* – S22 (2n=26), *є* – W1 (2n=26), *ж* – Y62 (2n=26), *з* – Y67 (2n=26), *и* – DAR12 (2n=26+0-2B), *і* – Y66 (2n=36-39). Як внутрішній контроль (К) для диплоїдних рослин (*а* – *и*) використано *Secale cereale* L. subsp. *cereale* (2C=16,01пг), а для гіпотриплоїда (*і*) – *Vicia faba* L. cv 'Tinova' (2C=26,21 пг)

Таким чином, нами було встановлено розмір геному рослин *D. antarctica* з району Аргентинських островів Морської Антарктики, що відрізнялись за числом хромосом. Середній вміст ядерної ДНК у досліджуваних диплоїдних рослин та генотипу з В-хромосомами дорівнював 10,88 пг/2С, тоді як у гіпотриплоїда значення 2С було в 1,5 рази більше і становило 16,46 пг.

3.1.3. Молекулярно-генетичні дослідження мінливості геному. Для комплексної оцінки мінливості геному рослин поряд із цитологічними використовують молекулярно-генетичні підходи. Як відомо з літератури, геномну мінливість рослин виду *D. antarctica* з популяцій Антарктичного регіону за допомогою ПЛР-аналізу досліджувало кілька груп вчених. Методами AFLP [160, 162, 168] та RAPD аналізу [239] було виявлено низький рівень геномного поліморфізму рослин в цьому регіоні порівняно із популяціями Південної Америки. Враховуючи відмінності за числом хромосом між представниками виду, виявлені методом цитогенетичного аналізу, одним із завдань цієї роботи було дослідити їхній поліморфізм із використанням ПЛР-маркерів.

Для аналізу рослин *D. antarctica* восьми генотипів (DAR12, L59, R35, S22, Y62, Y66, Y67, W1) 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 результатами ПЛР-аналізу було розраховано генетичні відстані між дослідженими генотипами за Жаккардом, які знаходились у межах 0,0323– 0,1803 (рис. 3.5, табл. 3.3).

Найбільш відмінними виявились генотипи W1 і DAR12, генетична відстань між якими дорівнювала 0,1803. Найменше значення, в межах 0,0323–0,0645, було встановлено для групи генотипів Y62, Y66, Y67, R35, S22, куди входили гіпотриплоїд, міксоплоїд та диплоїди, походженням із близько розташованих острівних популяцій району Аргентинських островів (див. рис. 2.1). Водночас, генотип W1 із диплоїдним набором хромосом

виявився генетично віддаленим як від генотипу з географічно-близької популяції (S22), так і від інших досліджених рослин (Y62, Y66, Y67, R35, L59).

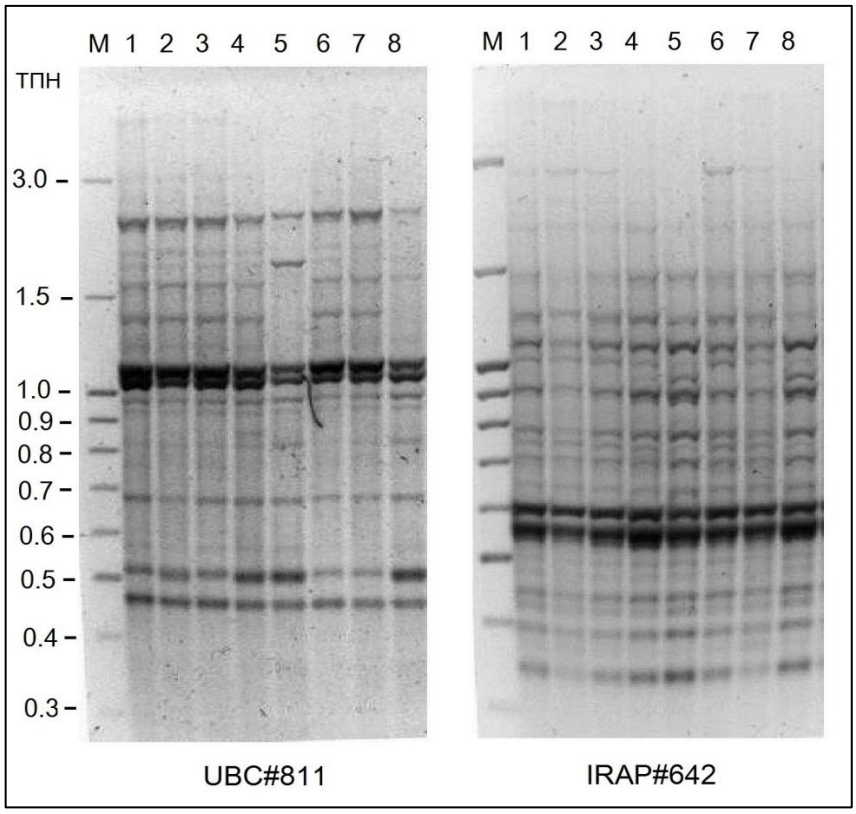

Рис. 3.5. Електрофоретичні спектри продуктів ISSR- та IRAP-ПЛР аналізу рослин *D. antarctica* таких генотипів*:* 1 – DAR12, 2 – L59, 3 – R35, 4 – S22, 5 – Y62, 6 – Y66, 7 – Y67, 8 – W1; M – маркер молекулярних розмірів ДНК. Під електрофореграмами наведено назви праймерів, які використовували для аналізу

Генетичні відстані за Жаккардом між рослинами з диплоїдними генотипами коливалися в широких межах від 0,0476 до 0,1746. Значення генетичних відстаней між рослиною з B-хромосомами та гіпотриплоїдом – DAR12 і Y66 (0,0968), як і між DAR12 та диплоїдами, не виходили за межі цього діапазону (табл. 3.3). Це свідчить про те, що особини із нетиповим каріотипом є генетично подібними до диплоїдних рослин. Ймовірно, їхнє утворення в досліджуваному регіоні відбувається з певною частотою,

Таблиця 3.3

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

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

можливо дещо вищою, ніж в більш північних популяціях, оскільки там їх знайти поки що не вдалося. Водночас, очевидно, що час їхнього існування виявляється недостатнім для дивергенції та появи нових форм або рас, які б істотно відрізнялися від решти рослин за молекулярно-генетичними ознаками. Таким чином, ці форми можна розглядати як початкові етапи мікроеволюції, які починаються із каріотипових змін, що створюють передумови для репродуктивної ізоляції [240, 241, 242].

Отже, отримані результати ISSR- та IRAP-ПЛР аналізу вказують на те, що відмінності між диплоїдними рослинами та гіпотриплоїдом чи генотипом з B-хромосомами не перевищують рівня молекулярно-генетичних відмінностей між окремими диплоїдними рослинами.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **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.

2. Твардовська М.О., Андрєєв І.О., Амосова А.В., Спірідонова К.В., **Навроцька Д.О.**, Саматадзе Т.Е., Зощук С.А., Муравенко О.В., Кунах В.А. Вивчення геномів рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з різних локалітетів Прибережної Антарктики за допомогою хромосомних та молекулярних маркерів // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2014. – Т. 14. – С. 133-137.
3. **Навроцька Д.О.**, Твардовська М.О., Андрєєв І.О., Загричук О.М., Парнікоза І.Ю., Дробик Н.М., Кунах В.А. Хромосомний поліморфізм рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з району Аргентинських островів (Прибережна Антарктика) // Вісник Українського товариства генетиків та селекціонерів. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 184-190.
4. Парнікоза І.Ю., Мірюта Н.Ю., Ройек М., Бетєхтін А.А., Пороннік О.О., Мирюта Г.Ю., **Навроцька Д.О.**, Хастерок Р., Кунах В.А. Рослини *Deschampsia antarctica* E. Desv. з різним числом хромосом в умовах вирощування *in vitro*. Зв'язок розміру геному та двох показників пристосовуваності // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2017. – Т. 20 – С. 304-309.
5. **Навроцька Д.О.**, Твардовська М.О., Кунах В.А. Молекулярно-цитогенетичний аналіз рослин *Deschampsia antarctica* з різних локалітетів Прибережної Антарктики // І Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів з міжнародною участю "Сучасні проблеми викладання та наукових досліджень у ВНЗ України", 9 жовтня, 2014, Дніпропетровськ, Україна, С. 42-44.
6. **Navrotska D.O.**, Twardovska M.O., Andreev I.O., Betekhtin A.A., Hasterok R., Kunakh V.A. Cytogenetic and molecular analisys of *Deschampsia antarctica* Desv. from the Maritime Antarctic // 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, 26-27 May, 2015, Kyiv, Ukraine, P. 7.

7. Олійник М., **Навроцька Д.**, Пороннік О., Парнікоза І. Цитологічний аналіз *Deschampsia antarctica* Desv. з острову Вінтер (Прибережна Антарктика) // XII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і Поступ Біології", 19-21 квітня, 2016, Львів, Україна, С. 131-132.
8. **Навроцька Д.О.**, Андрєєв І.О., Парнікоза І.Ю., Пороннік О.О., Кунах В.А. Каріологічна гетерогенність рослин *Deschampsia antarctica* E. Desv. в регіоні Аргентинських островів Морської Антарктики // VIII Міжнародна Антарктична Конференція, присвячена 25-річчю приєднання України до договору про Антарктику, 16-18 травня, 2017, Київ, Україна, С. 80-81.

3.2. Дослідження структурних особливостей каріотипу *D. antarctica:* аналіз хромосомної локалізації генів 5S рРНК та 45S рРНК, теломерних та центромерних повторів

Дослідження каріотипу рослин методом флуоресцентної *in situ* гібридизації має важливе значення, адже дозволяє шляхом прямої локалізації послідовностей ДНК на хромосомах здійснювати фізичне картування геному, вивчати як структурну організацію індивідуальних хромосом, так і розташування всього їх набору в ядрі, ідентифікувати та порівнювати види між собою, виявляти хромосомні мутації (делеції, дуплікації, транслокації), проводити спектральне каріотипування геному (multicolour FISH) та аналізувати хромосоми в інтерфазних ядрах. Частіше за все, в якості маркерів для FISH-аналізу використовують консервативні (гени 5S рРНК і 45S рРНК) та структурні (повторювані центромерні і теломерні) ДНК послідовності, диспергувані і тандемні повтори, видоспецифічні та унікальні

ділянки геному, послідовності мобільних генетичних елементів [209, 211, 236].

Гени рибосомної РНК (рРНК) є консервативними ділянками геному, що відповідать за синтез молекул РНК, що входять до складу рибосом. В геномі рослин зазвичай існують два окремих локуси, що містять гени 5S рРНК і 45S рРНК. Локус 45S рРНК складається з тандемно-повторюваних блоків генів 18S, 5.8S та 26S рРНК, а також транскрибованих та нетранскрибованих спейсерів, що розташовані між ними. В геномі можуть бути присутніми сотні чи тисячі копій таких повторів, складаючи близько 10 % його розміру. Наприклад, в геномі *A. thaliana* вони присутні 360 раз на 2 парах хромосом і займають 5-8 % всього геному [190, 243, 244]. В інших видів з більшими геномами гени рРНК утворюють кілька дискретних локусів на хромосомах, наприклад, в гексаплоїдної пшениці кількість копій повтору складає 1200 на один локус [30]. 5S рРНК гени також представлені в геномі у вигляді тандемних повторів. Гени обох типів (5S рРНК та 45S рРНК) можуть бути розташовані в одному чи різних сайтах, які використовують для ідентифікації хромосом [245]. Разом з тим, 5S рРНК та 45S рРНК є високо-консервативними, а зміни їхньої хромосомної локалізації загалом корелюють з швидкістю видоутворення, і відіграють важливу роль в еволюції, саме тому їх використовують для визначення еволюційних подій в *Triticaceae* [57].

Відповідно до літературних даних, хромосомна локалізація генів рРНК була відома лише для виду *D. caespitosa*, у якого було виявлено дев’ять локусів 5S рРНК та шість локусів 45S рРНК. У цього виду сайти 5S рРНК локалізовані на семи парах хромосом, з яких дві пари мали по два локуси гена. А сайти 45S рРНК знаходились на п’яти парах хромосом, два з шести сайтів були виявлені на одній хромосомі по різні боки від центромери [246].

На момент початку наших досліджень, інформації про структурну організацію геному *D. antarctica* не було. Тому завдання нашої роботи полягало в ідентифікації та локалізації генів 5S рРНК і 45S 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 двохколірної флуоресцентної *in situ* гібридизації з послідовностями генів 5S рРНК і 45S рРНК, було виявлено десять сайтів 5S рДНК і чотири сайти 25S рДНК у каріотипі диплоїдних рослин генотипів G/D12-2a, R35, S22, DAR12, що дозволило маркувати 14 з 26 хромосом комплементу. 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. 3.6 *а–г*).

У каріотипі гіпотриплоїдного зразка Y66 було виявлено чотирнадцять сайтів 5S рДНК і шість сайтів 25S рДНК. У цьому випадку рДНК-FISH дозволив маркувати 20 з 36 хромосом. 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. 3.6 *д*). Виявлені відмінності за числом сайтів рРНК, ймовірно, спричинені збільшенням загального числа хромосом в гіпотриплоїдному генотипі. Загалом рДНК сигнали були дискретними та локалізувались на різних хромосомах кожного набору.

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. 3.6 *е, є*). Центромерний зонд гібридизувався безпосередньо з ділянкою первинної перетяжки всіх хромосом як диплоїдних, так і гіпотриплоїдного генотипу (рис. 3.6 *ж, з*). Такий аналіз свідчить про відсутність хромосомних перебудов у досліджуваних генотипів рослин.

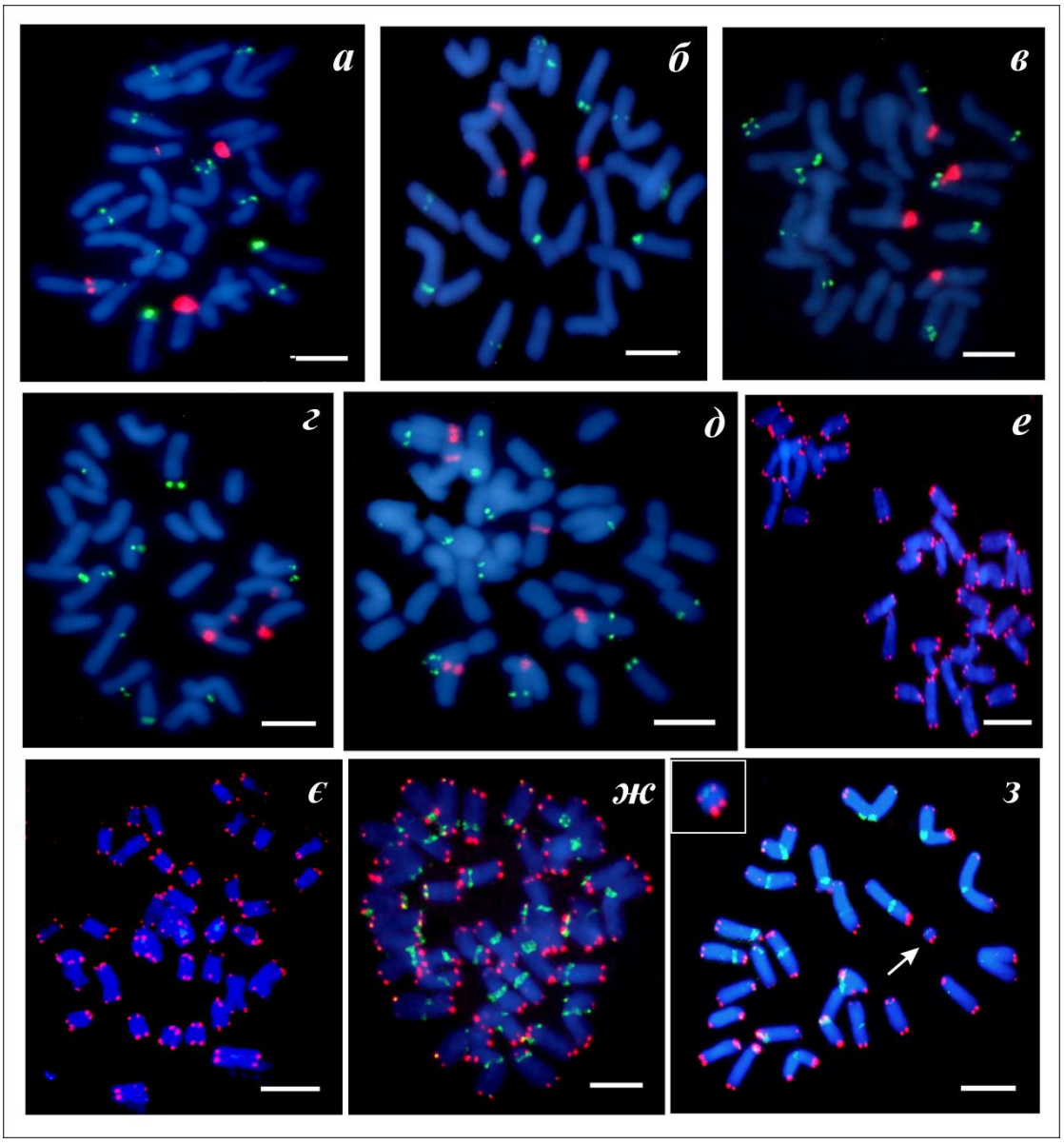

Рис. 3.6. Локалізація генів 5S рРНК (зелений) та 45S рРНК (червоний) на метафазних хромосомах *D. antarctica* (*а – д*): *а* – DAR12 (2n=26), *б* – G/D12-2a (2n=26), *в* – R35 (2n=26), *г* – S22 (2n=26), *д* – Y66 (2n=36). Розташування теломерних повторів HT100.3 *A. thaliana* (червоний) у каріотипі гіпотриплоїдного генотипу Y66, 2n=36 (*е* та *є*). Локалізація теломерних повторів HT100.3 *A. thaliana* (червоний) і центромерних повторів CCS1 *Brachypodium sylvaticum* (зелений) у каріотипі гіпотриплоїдного генотипу Y66, 2n=39 (*ж*) та каріотипу з B-хромосомою DAR12, 2n=26+1B (*з*). Додаткову хромосому вказано стрілкою. Хромосоми забарвлені DAPI (синій). Масштаб 10 мкм

Використання в якості зондів теломерних та центромерних послідовностей дозволило підтвердити наявність додаткової хромосоми в каріотипі рослин DAR12. Незважаючи на те, що B-хромосома була значно менше решти хромосом за розміром, вона мала чіткі сигнали гібридизації в центромерній та обох термінальних теломерних ділянках (рис. 3.6 З). Це вказує на структурну цілісність додаткової хромосоми, яка, в іншому випадку, могла б бути розпізнана як мітотично-нестабільний хромосомний фрагмент [87, 247]. Ідіограму каріотипу *D. antartica* генотипу DAR12 (2n=26+1B) з локалізацією теломерних повторів HT100.3 *A. thaliana* на хромосомах основного набору та додатковій хромосомі наведено на рис. 3.7.

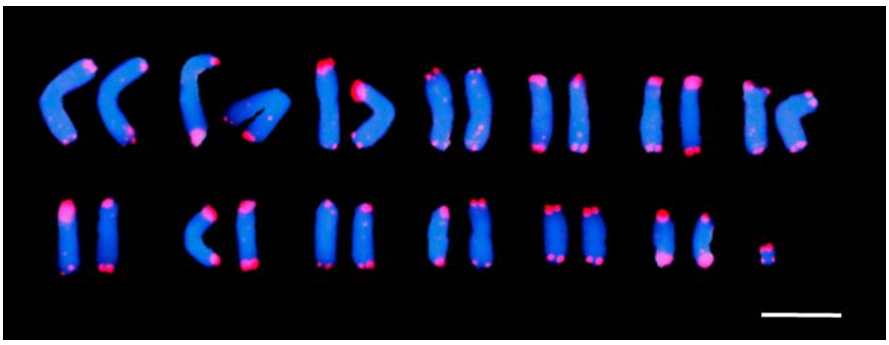

Рис. 3.7. Ідіограма каріотипу *D. antartica* генотипу DAR12 (2n=26+1B) з локалізацією теломерних повторів HT100.3 *A. thaliana* (червоний). Хромосоми забарвлені DAPI (синій). Масштаб 10 мкм

Ми припускаємо, що рослини з гіпотриплоїдним генотипом могли виникнути через порушення в мейозі, чи в результаті вегетативного розмноження через цитогенетичні порушення, що зазвичай поширені у рослин, які ростуть в несприятливих умовах середовища на краю ареала [9, 22, 247, 248]. Порушення мейозу при мікрогаметогенезі у *D. antarctica*, як припускається, може призводити до значної стерильності пилку [63, 152].

Таким чином, з використанням методу флуоресцентної *in situ* гібридизації, було ідентифіковано окремі хромосоми, встановлено

локалізацію та кількість генів 5S рРНК та 45S рРНК, теломерних і центромерних повторів в каріотипі рослин *D. antarctica* з району Аргентинських островів Морської Антарктики. Виявлено відмінності в розташуванні локусів генів рРНК у рослин з диплоїдним та гіпотриплоїдним хромосомним набором. Встановлено наявність додаткових хромосом у каріотипі рослин генотипу DAR12 – виявлено наявність теломерних та центромерної ділянок у структурі додаткових хромосом. Каріотипова мінливість, детектована у гіпотриплоїда та генотипу з В-хромосомами, може вказувати на нестабільність геному *D. antarctica* та демонструє основні можливі зміни в його структурі.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **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. Comprehensive characterization of cultivated *in vitro Deschampsia antarctica* E. Desv. plants with different chromosome numbers // Cytology and Genetics. – 2017. – Vol. 51, № 6. – P. 422-431
2. Kunakh V., **Navrotska D.**, Twardovska M., Hasterok R., Betekhtin A., Andreev I., Parnikoza I. Cytogenetic features of *Deschampsia antarctica* Desv. plants in different microclimate condition of the Argentine Islands of Maritime Antarctic // 26-th International Congress on Polar Research “High latitude and high mountains: driver of or driven by global change?”, 6-11September, 2015, Munich, Germany, P. 92.
3. **Navrotska D.O.**, Twardovska M., Andreev I., Parnikoza I., Betekhtin A., Hasterok R., Kunakh V. Pecularities of genome variability of antarctic hairgrass *Deschampsia antarctica* Desv. from the Maritime Antarctic // The 41-st FEBS Congress “Molecular and System Biology for a Better Life”, Vol. 283, Sup.1, 3-8 September, 2016, Ephesus/Kusadasi, Turkey, P. 335.

4. **Navrotska D.**, Andreev I., Kunakh V. Research of genome plasticity the *Deschampsia antarctica* Desv. plants from populations the Argentine Islands region of Maritime Antarctic // The Mind the Gap 5 Conference 'Bridging the gap between theoretical and empirical population genetics', 30 October – 1 November, 2016, Vienna, Austria, P.12.
5. **Navrotska D.**, Andreev I., Betekhtin A., Rojek M., Hasterok R., Kunakh V. Peculiarities of genome variability of *Deschampsia antarctica* E. Desv. from the marginal populations of Maritime Antarctic // EMBO Workshop "Evolution in the time of genome architecture", 13-15 September, 2017, Naples, Italy, P. 36.

3.3. Вивчення мінливості геному *D. antarctica* в умовах *in vitro*

3.3.1. Дослідження генетичної мінливості рослин-клонів за мікроклонального розмноження. Культивування рослин на штучних живильних середовищах створює значний стрес, який впливає на організм у цілому і може спричинювати певні зміни його спадкового матеріалу, що проявляються в формі хромосомних перебудов, метилування ДНК, точкових мутацій та ін. [9]. Крім того, вегетативне розмноження призводить до накопичення соматичних мутацій [249]. Однак, до цього часу досліджень спрямованих на вивчення генетичної мінливості *D. antarctica* за мікроклонального розмноження та довгострокового культивування *in vitro* проведено не було.

Для первинної характеристики матеріалу нами було проведено молекулярно-генетичний аналіз вихідних рослин *D. antarctica* (див. розділ 3.1.2) – G/D12-2a, DAR12, R35, S22, Y66, що були обрані серед усіх досліджених як відмінні за цитологічними характеристиками (диплоїди, гіпотриплоїд, з В-хромосомами). Генетичний поліморфізм оцінювали методом ПЛР-аналізу з використанням 10 ISSR-праймерів. Загалом для

зразків нараховано 106 ампліконів, 39 (35 %) з яких були поліморфними (рис. 3.8).

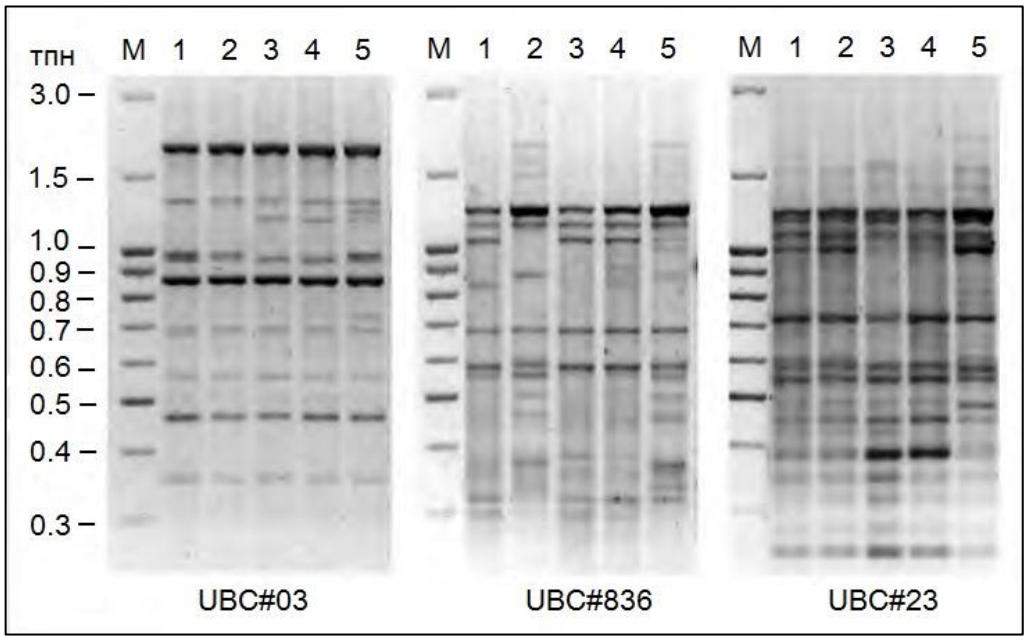

Рис. 3.8. Електрофоретичні спектри продуктів ISSR-ПЛР аналізу рослин *D. antarctica* таких генотипів*:* 1 – G/D12-2a, 2 – R35, 3 – DAR12, 4 – Y66, 5 – S22; M – маркер молекулярних розмірів ДНК. Під електрофореграмами наведено назви праймерів, які використовували для аналізу

Значення попарних генетичних відстаней Жаккарда між різними генотипами, розраховані на основі результатів ISSR-аналізу, були в межах 0,1446–0,2772 (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Генетичні відстані Жаккарда між рослинами, розраховані за результатами ISSR-аналізу

Генотип	G/D12-2a	R35	DAR12	Y66	S22
G/D12-2a	–	–	–	–	–
R35	0,1446	–	–	–	–
DAR12	0,1818	0,2553	–	–	–
Y66	0,1765	0,2135	0,1667	–	–
S22	0,2577	0,2347	0,2451	0,2772	–

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 *D. antarctica* (рис. 3.9). Мінливість рослин у динаміці вивчали через 57-79 пасажів культивування.

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 диплоїдів, ані для гіпотриплоїда та рослини з В-хромосомами. Не вдалося виявити відмінностей і при порівнянні між собою клонів рослин окремих генотипів, які культивували відокремлено впродовж певного часу.

Рис. 3.9. Культивовані *in vitro* рослини-клони *D. antarctica* таких генотипів: *а* – G/D12-2a, *б* – DAR12, *в* – R35, *г* – S22, *д* – Y66

Для встановлення наслідків тривалого культивування на хромосомному рівні було проведено цитогенетичний аналіз рослин-клонів *D. antarctica* (табл. 3.5). Встановлено, що у рослин генотипу G/D12-2a (2n=26), який культивували впродовж 57, 66 і 79 пасажів, відмінностей за числом хромосом

Таблиця 3.5

Цитогенетичний аналіз рослин *D. antarctica* за тривалого культивування *in vitro*

Геноти-п	Цикл розмно-ження	К-сть дослід-жених рослин	Досліджені		Число хромосом (2n) *	К-сть корінців		К-сть метафаз з модальним класом, %
			корінці	мета-фази		дипло їдних	міксо-плоїдних	
G/D12-2a	57	5	19	36	26 (36)	36	–	100
	66	5	15	20	26 (20)	20	–	100
	79	5	19	42	26 (42)	42	–	100
DAR12	49	5	12	46	26(26), 26+1B(15), 27(5)	26	20	56,5
	57	5	15	44	26(39), 26+1B(5)	39	5	88,6
	70	5	17	34	26(30), 26+1B(1), 27(2), 28(1)	30	4	88,2
R35	57	5	16	52	26 (52)	52	–	100
	67	5	19	42	26 (42)	42	–	100
	81	5	21	51	26 (51)	51	–	100
S22	55	5	19	30	26 (30)	30	–	100
	67	5	18	42	26 (42)	42	–	100
	79	5	14	34	26 (34)	34	–	100
Y66	43	5	35	82	27(1), 33(2), 34(1), 35(1), 36(14), 37(1), 38(37), 39(20), 45(1), 48(1), 52(2)	–	35	45,1
	50	5	19	34	33(7), 36(15), 38(10), 39(2)	–	34	44,1
	73	5	29	75	13(2), 16(1), 18(3), 21(1), 23(3), 26(7), 28(4), 33(8), 36(35), 39(7), 42(3), 46(1)	–	29	46,6

*Примітка: у дужках вказано кількість метафаз із зазначеним числом хромосом.

100

як між сомаклонами, так і в порівнянні з предковою рослиною не було. У зразків диплоїдного генотипу R35, які аналізували на 57, 67, 81 пасажах, змін за числом хромосом не спостерігали. Відсутність мінливості в процесі культивування на 55, 67 та 79 пасажах було встановлено і для диплоїдного генотипу S22.

На відміну від рослин з типовим для виду хромосомним набором (2n=26), у яких за тривалого культивування число хромосом не змінювалось, у рослин із В-хромосомами та гіпотриплоїда (DAR12 та Y66) було виявлено хромосомну мінливість. У зразків DAR12 (2n=26+0-2B), відібраних для аналізу на 49, 57 й 70-му пасажах, було виявлено мінливість відсотку клітин з анеуплоїдією та додатковими хромосомами. Для рослин-клонів генотипу Y66, які аналізували на 43, 50 та 73 пасажах, також встановлено мінливість кількості анеуплоїдних клітин залежно від пасажу культивування (табл. 3.5, рис. 3.10).

Результати наших досліджень узгоджуються з даними інших авторів щодо генетичної мінливості у рослин, отриманих мікроклональним розмноженням. Зокрема, за допомогою молекулярно-генетичного аналізу рослин *Gerbera jamesonii* Bolus [250], *Swertia chirayita* [251], *Allium ampeloprasum* L. [252], трьох сортів банана (*Musa* spp.) [253], п’яти високорослих сортів чорниці, двох брусниці і шести малини [254], *Trichodesma indicum* (L.) [255] встановлено ідентичність профілів ПЛР-продуктів, отриманих із використанням RAPD- та ISSR-праймерів для клонів, мікроклонально розмножених *in vitro*, і вихідної рослини. При дослідженні клонованих *in vitro* рослин цінного лікарського виду *Viola pilosa* за допомогою RAPD- і ISSR-маркерів сомаклональної мінливості у них не виявлено [256]. Серед мікроклонів лікарської рослини *Satureja avromanica* також не було виявлено мінливості за даними RAPD-аналізу, що дало авторам підстави рекомендувати таку методику мікроклонування для масштабного розмноження виду [257].

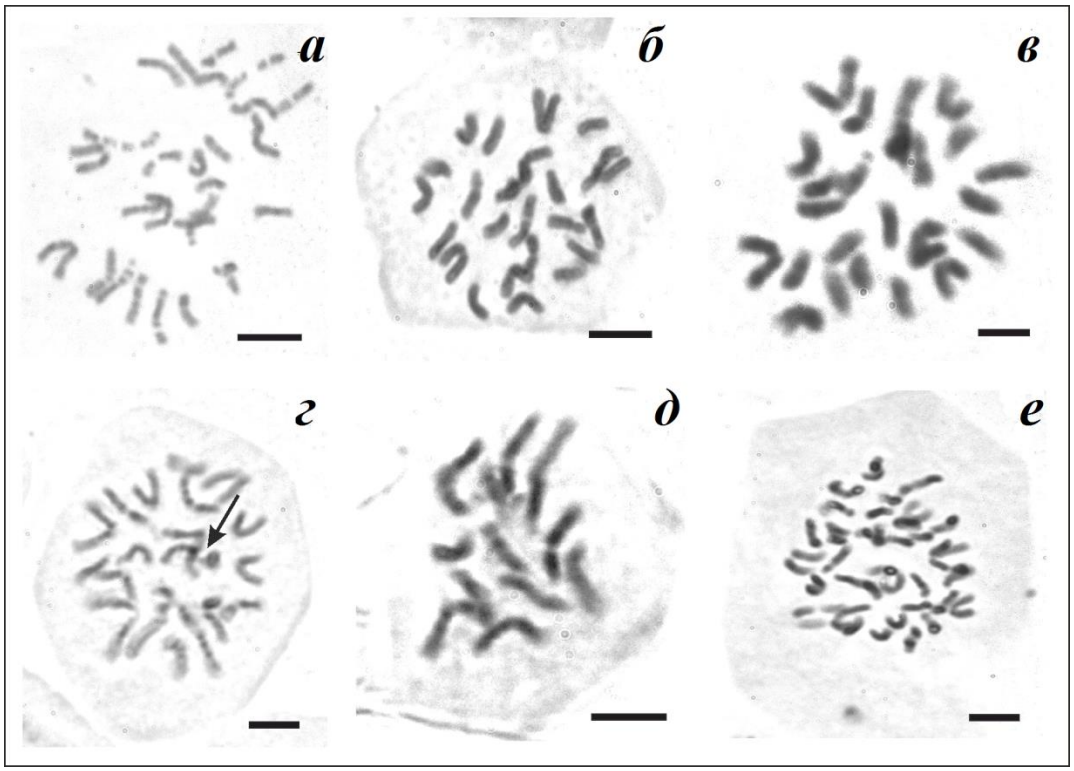

Рис. 3.10. Метафазні пластинки клітин апікальної меристеми кореня рослин-клонів *D. antarctica* таких генотипів: *а* – G/D12-2a (2n=26), *б* – R35 (2n=26), *в* – S22 (2n=26), *г* – DAR12 (2n=26+1B), *д* – Y66 (2n=13), *е* – Y66 (2n=38). Забарвлення ацетоорсеїном. Додаткову хромосому позначено стрілкою. Масштаб 10 мкм

Отже, показано збереження генетичних характеристик при ISSR-ПЛР та цитогенетичного аналізу у рослин-клонів *D. antarctica* за мікроклонального розмноження та тривалого культивування *in vitro*. Генетичних відмінностей ні всередині кожної з груп рослин одного генотипу, ні з вихідним предком не виявлено. Рослини, які походили від диплоїдного предка, так і залишались диплоїдними, а міксоплоїди зберігали клітини з різним рівнем плоїдності, але їх співвідношення змінювалось в залежності від пасажу культивування. Використовуючи такий підхід можна, за відсутності достатньої кількості рослинного матеріалу з Антарктики, клонувати рослини із стабільними генетичними характеристиками *in vitro*. А також використовувати їх в подальших модельних експериментах, спрямованих на вивчення фізіолого-біохімічних параметрів рослин виду *D. antarctica*.

3.3.2. Особливості генетичної мінливості в культурі тканин. Культура рослинних тканин і клітин є експериментальною моделлю для вивчення клітинного поділу, диференціації та морфогенезу [258] та стрес-опосередкованої мінливості геному рослин [9, 15]. Згідно з Барбарою МакКлінток, культура тканин *in vitro*, подібно до впливу біотичних та абіотичних стресових факторів, а також міжвидової гібридизації, є видом стресу, що спричиняє широкомасштабну реорганізацію геному [16, 17, 22].

Як відомо, у процесі дедиференціації та проліферації клітин в ізольованих умовах відбувається дестабілізація генетичних та епігенетичних програм розвитку тканин, що призводить до морфологічних, фізіологічних, біохімічних і молекулярних змін. На хромосомному рівні спостерігаються зміна кількості (анеу- та поліплоїдія) і морфології хромосом, структурні перебудови каріотипу [9, 15, 259].

Результати досліджень хромосомної мінливості при калюсоутворенні досить суперечливі. З одних публікацій відомо, що вже серед перших мітозів після індукції дедиференціювання спостерігається міксоплоїдія з широким розмахом за кількістю хромосом та наявністю різних аномалій мітозу у калюсних культурах арабідопсису, гороху, тютюну, томатів [259, 260, 261]. Водночас інші стверджують, що серед перших клітинних поділів рівень порушень невеликий і лише при подальшому субкультивуванні відбувається збільшення хромосомних аномалій [259]. Істотний, іноді навіть визначальний вплив на наявність і рівень таких порушень серед перших мітозів *in vitro* спричиняє генотип вихідної рослини. Проте досліджень, що присвячені вивченню можливого впливу стану каріотипу вихідної рослини (експланту) на особливості хромосомної мінливості на перших етапах культивування *in vitro,* на сьогодні проведено мало; дані такого характеру наведено в книзі [9].

Важливим є збереження виявлених генотипів *D. antarctica* та й загалом генофонду цього рідкісного й унікального злаку методами культури *in vitro* як за допомогою клонального мікророзмноження, так і у вигляді культури тканин, як це описано в роботах [142, 202]. Проте, генетичну реакцію рослин

D. antarctica з різним каріотипом на введення в культуру *in vitro*, особливо при індукції калюсоутворення, досі не досліджено. Тому, нашим завданням було з'ясувати особливості генетичної мінливості в калюсних тканинах *D. antarctica*, отриманих від рослин п'яти генотипів з різним числом хромосом – диплоїдних, гіпотриплоїда та рослини з додатковими хромосомами.

В результаті вивчення числа хромосом у клітинах досліджуваних тканин виявлено їхню нестабільність за цією ознакою: частка клітин з різним рівнем плоїдності змінювалась від пасажу до пасажу у кожному дослідженому варіанті калюсу (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

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 ± 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

Процес адаптації клітинних популяцій до росту за умов *in vitro* поділяють на три періоди: первинної популяції, становлення та сформованого штаму. Клітини, що перебувають на стадії первинної популяції (первинний калюс і перші 1–2, інколи до 4-го пасажу) загалом характеризуються незначними генетичними змінами. Більш істотні зміни, у тому числі зміни числа хромосом, відбуваються пізніше, у періоді становлення штаму [9, 90]. Аналіз даних, наведених у табл. 3.6 , свідчить про нестабільність вивчених нами калюсних культур, а тому дозволяє припустити, що вони знаходяться в періоді становлення.

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 (табл. 3.6). У клітинах калюсу генотипу з В-хромосомами DAR12 (2n=26+0-2B) відмічали наявність метафаз, що містили додаткові хромосоми (рис. 3.11 *а, б*). Слід підкреслити, що появу мікро-хромосом, морфологічно подібних до В-хромосом, відмічали також у калюсних клітинах, отриманих як від диплоїдного генотипу G/D12-2a (рис. 3.11 *в*), так і в калюсі гіпотриплоїдного генотипу Y66.

Культура тканин, отримана від кореневої тканини рослин генотипу DAR12, каріотип якого має додаткові В-хромосоми, характеризувалась розмахом мінливості за числом хромосом від 18 до 52 із середнім значенням на метафазу 25,7. Модальний клас так само складали диплоїдні клітини та клітини з білядиплоїдним числом хромосом (93,9 ± 1,4 %). Відсоток поліплоїдних клітин був низьким – 3,6 %, анеуплоїдні клітини складали майже половину (47,6 %) від загального проліферативного пулу (табл. 3.7, рис. 3.12 *б*). У табл. 3.7 наведено усереднені дані вивчення числа хромосом впродовж 2 – 4-го пасажів. Аналіз узагальнених даних показав, що розмах мінливості за числом хромосом у калюсних тканинах, отриманих від диплоїда G/D12-2a, був найбільшим серед досліджених калюсів і становив від 18 до 63 хромосом з середнім значенням на метафазу 24,9.

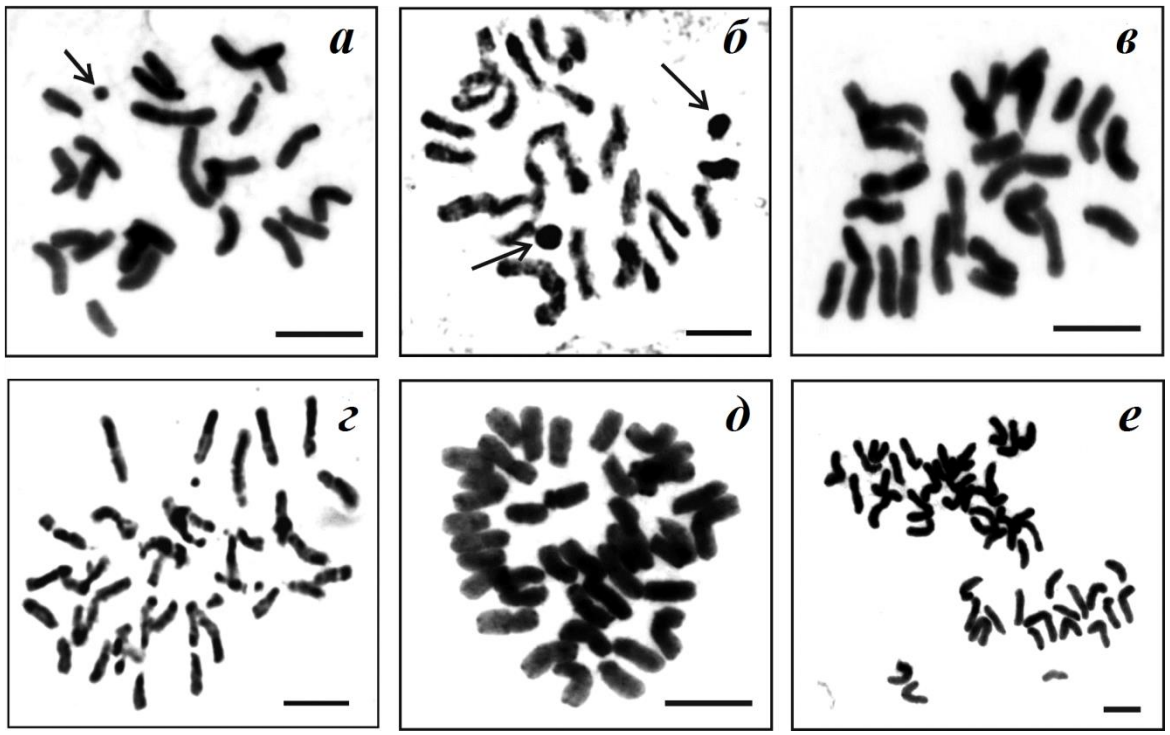

Рис. 3.11. Метафазні пластинки з різним числом хромосом у клітинах калюсних культур *D. antarctica* таких генотипів: *а* – DAR12 (2n=26+1B), *б* – DAR12 (2n=26+2B), *в* – G/D12-2a (2n=26), *г* – G/D12-2a (2n=36), *д* – Y66 (2n=38), *е* – R35 (2n=52). В-хромосоми вказано стрілками. Масштаб 10 мкм

Модальний клас формували клітини з диплоїдним та білядиплоїдним числами хромосом (92,9 ± 1,5 %). Частка поліплоїдних клітин становила 5,6 %, тоді як анеуплоїдних – 44,6 % (табл. 3.7, рис. 3.12 *а*).

Розмах мінливості за числом хромосом у калюсній культурі диплоїдного генотипу R35 (2n=26) становив 16 – 52 хромосом із середнім значенням на метафазу 25,7. Модальний клас так само складався із диплоїдних та білядиплоїдних клітин, частка яких становила 94,3 ± 1,3 %. Частка поліплоїдних клітин була найнижчою серед усіх досліджуваних калюсів (2,3 %). Поряд із цим, кількість анеуплоїдних клітин у цій культурі тканин була найбільшою (60,6 %) з-поміж аналізованих (табл. 3.7, рис. 3.12 *г*).

У культурі тканин рослини S22 з диплоїдним набором хромосом (2n=26) встановлено наявність клітин із кількістю хромосом від 15 до 55 із середнім числом хромосом на метафазу 24,6. Модальний клас складали диплоїдні та

клітини з білядиплоїдним числом хромосом (90 ± 1,7 %). Відсоток поліплоїдних клітин становив 8,0 %, частка анеуплоїдних клітин – 44,0 % (табл. 3.7, рис. 3.12 *д*).

Таблиця 3.7

Кількість клітин різних рівнів плоїдності у калюсних тканинах *D. antarctica* (усереднені дані)

Генотип та число хромосом	Кількість вивчених метафаз, шт.	Кількість наборів хромосом – n (%), x ± s*								
		1	<2	2	>2	3	>3	4	>4	5
G/D12-2a, 2n=26	300	–	24,3 ±2,5	49,6 ±2,9	19,0 ±2,3	2,3 ±0,9	1,3 ±0,7	1,7 ±0,7	–	1,7 ±0,7
Y66, 2n=36-39	300	–	18,3 ±2,2	35,0 ±2,8	28,0 ±2,6	12,3 ±1,9	6,3 ±1,4	–	–	–
DAR12, 2n=26+ 0-2B	300	–	25,6 ±2,5	49,0 ±2,9	19,3 ±2,3	2,7 ±0,9	2,3 ±0,9	1,0 ±0,6	–	–
R35, 2n=26	300	–	33,3 ±2,7	37,0 ±2,8	24,0 ±2,5	1,7 ±0,7	3,3 ±1,0	0,7 ±0,5	–	–
S22, 2n=26	300	0,3 ±0,3	24,3 ±2,5	47,7 ±2,9	18,0 ±2,2	6,3 ±1,4	1,3 ±0,6	1,7 ±0,7	0,3 ±0,3	–

*Примітки: x – середнє значення, s – стандартне відхилення

Калюсна культура гіпотриплоїду Y66 (2n=36-39) характеризувалась найменшим розмахом мінливості за числом хромосом від 18 до 46, проте найвищим середнім значенням хромосом на метафазу – 31,2. Модальний клас і тут формували диплоїдні та білядиплоїдні клітини, частка яких становила понад 50 %. У цій культурі був найвищий серед усіх досліджених калюсів відсоток поліплоїдних клітин – 12,3 %, а також частка анеуплоїдних клітин – 52,7 % (табл. 3.7, рис. 3.12 *в*).

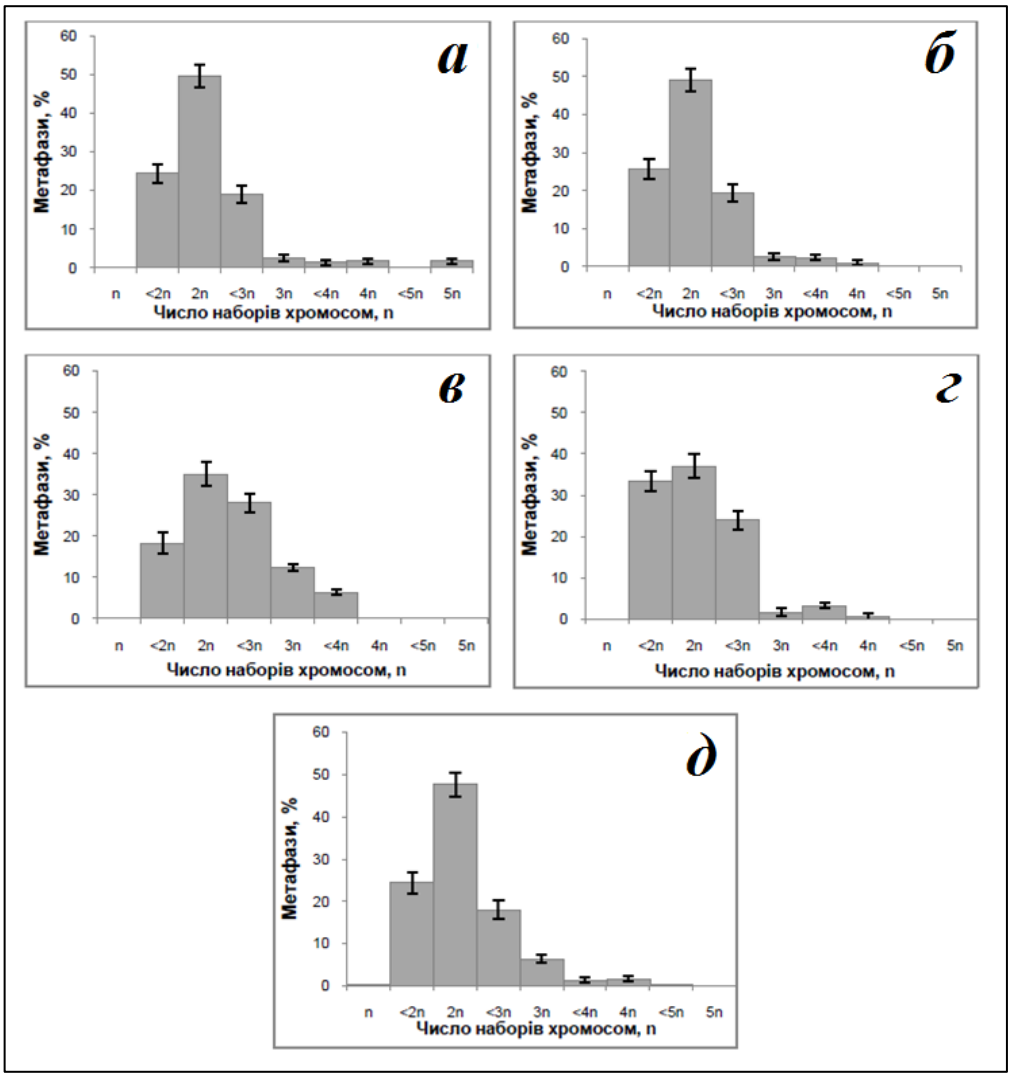

Рис. 3.12. Розподіл за кількістю наборів хромосом клітин калюсних культур *D. antarctica* таких генотипів: *а* – G/D12-2a (2n=26), *б* – DAR12 (2n=26+1B), *в* – Y66 (2n=36-39), *г* – R35 (2n=26), *д* – S22 (2n=26). У калюсних культурах від рослин кожного генотипу проаналізовано по 300 метафаз

Як відомо, сукупна дія стресових впливів при культивуванні рослинних клітин *in vitro* часто перевищує межі норми реакції клітини і призводить до істотного збільшення мінливості геному [9, 16]. Ступінь прояву геномної нестабільності в клітинах калюсних культур залежить від генотипових особливостей рослини, типу експланта, розміру геному, віку культури та впливу зовнішніх гормональних чинників [9, 90, 259]. Причинами змін і перебудов геному за індукції калюсогенезу і під час перших пасажів вважають ендоредуплікацію, інсерції, делеції, інверсії та транспозиції

мобільних генетичних елементів, зміну кількості гетерохроматину та його розподілу по хромосомах, появу та варіювання кількості В-хромосом, зміну числа і морфології хромосом внаслідок порушень та відхилень від нормального перебігу мітозу [9, 29, 90, 259].

Рівень гетерогенності калюсів значною мірою залежить від рівня плоїдності вихідної рослини та первинного експланта. Наприклад, у клітинах калюсу томату *Lycopersicon esculentum*, отриманих від гаплоїдної, диплоїдної і тетраплоїдної рослин, відмінності за числом хромосом спостерігали лише у первинному калюсі. За подальшого культивування у результаті процесів як поліплоїдизації, так і редукції числа хромосом ці калюси сформували практично однакові міксоплоїдні тканини з переважанням поліплоїдних (тетраплоїдних) клітин [260]. Дослідження калюсних культур, отриманих від диплоїдних (2n=10) та аутотетраплоїдних (2n=40) проростків *A. thaliana*, виявили високий рівень поліплоїдизації протягом калюсогенезу і їх подальшого культивування, незважаючи на походження [261]. У клітинах первинного калюсу виду *Carex capillaris*, отриманого від гаплоїдної рослини, рівень поліплоїдії був набагато вищим, ніж у тих, що були отримані від диплоїдних рослин-донорів. А у гороху, при вивченні первинного калюсу, отриманого із сегментів коренів проростків (гетерогенної за рівнем плоїдності тканини), модальний клас формували диплоїдні клітини [9]. Очевидно, що у випадку, коли клітини вихідного експланта мали відмінне від диплоїдного число хромосом, мінливість культивованих клітин була вищою, особливо це характерно для клітин у період становлення штаму.

У нашому дослідженні, у культурі тканин рослини *D. antarctica* гіпотриплоїдного генотипу Y66 (2n=36-39), відмічено високу частоту як анеуплоїдних (52,6 %), так і поліплоїдних клітин (18,6 %). А у калюсах, отриманих від генотипу з В-хромосомою DAR12 (2n=26+0-2B), спостерігали збільшене, порівняно з іншими аналізованими культурами диплоїдного походження, число анеуплоїдних клітин (47,0 %). Розмах мінливості за

числом хромосом у обох досліджуваних калюсних культурах не виходив за межі середніх значень порівняно із іншими аналізованими генотипами.

Отримані експериментальні дані свідчать про наявність хромосомної мінливості в клітинах калюсних культур *D. antarctica* на початкових етапах культивування та підтверджують явище збереження цитогенетичних особливостей 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 Також, останні калюсні культури, можливо, більш інтенсивно реагують на умови культивування *in vitro* [9, 90].

Отже, аналіз калюсних тканин, отриманих від п’яти відмінних за числом хромосом генотипів рослин *D. antarctica*, дозволив вперше з’ясувати цитогенетичну структуру калюсних культур цього виду, виявити міксоплоїдію та появу В-хромосом в калюсах деяких рослин. Ступінь прояву хромосомного поліморфізму клітин *in vitro* залежить від особливостей каріотипу вихідних рослин. 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 DAR12, Y66 та S22. Найменша мінливість числа хромосом була виявлена у калюсі R35 (16–52 хромосом).

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 найменшою кількістю анеуплоїдних клітин характеризувалася калюсна тканина S22 (44,0 %). В культурі тканин *D. antarctica* на перших етапах її культивування незалежно від стану каріотипу вихідної рослини (диплоїд,

гіпотриплоїд чи з В-хромосомами) модальний клас складали диплоїдні клітини та клітини з близьким до диплоїдного числом хромосом.

3.3.3. Дослідження сомаклональної мінливості рослин-регенерантів. Мінливість певної ознаки в клітинах, групах клітин чи рослинах, регенерованих з культури соматичних клітин або тканин, називають сомаклональною мінливістю. Головними причинами виникнення сомаклональних варіантів є генетична гетерогенність клітин вихідного експланта, а також генетична та епігенетична мінливість, індуковані умовами культивування. Частота виникнення сомаклонів залежить від генотипу вихідного експланта, а також умов індукції та вирощування калюсних культур. Механізми виникнення такої мінливості полягають в зміні кількості і морфології, а також появі перебудов хромосом, соматичному кросинговері та обміні між сестринськими хроматидами; метилюванні, ампліфікації чи редукції повторюваних послідовностей ДНК; транспозиції МГЕ у сомаклонів у порівнянні з вихідною рослиною [9].

Отримання рослин-регенерантів *D. antarctica*, шляхом непрямого органогенезу, вже описано в літературі. Такі сомаклони, одержані від рослин з регіону Південних Шетландських островів, були морфологічно подібними до материнських. За допомогою AFLP-аналізу автори показали відсутність генетичної різниці між регенерантами і донорними рослинами з природи: за використання 15 різних комбінацій праймерів було виявлено молекулярну мінливість в 0,05 % [262]. В іншому дослідженні було підібрано умови для ефективного отримання калюсу *D. antarctica* з соматичними ембріоїдами, проведено електронну скануючу мікроскопію таких глобулярних структур в культурі та наведено схему отримання регенерантів. Отримані сомаклони демонстрували фенотипову подібність до материнських особин [205]. Однак, досліджень, які б вивчали каріологічні особливості рослин-регенерантів *D. antarctica* досі не проводилось. Тому, враховуючи вищезазначене, нашим

завданням було отримати і дослідити геномну мінливість рослин-регенерантів на хромосомному рівні.

В результаті проведеного дослідження було отримано регенеранти, походженням від рослин диплоїдних генотипів G/D12-2a (2n=26), R35 (2n=26) та гіпотриплоїда Y66 (2n=36-39). За допомогою цитогенетичного аналізу встановлено, що в проліферативному пулі апікальної меристеми коренів всіх досліджуваних сомаклонів модальний клас формували диплоїдні клітини. Разом з тим, у регенеранта R-1 (походженням від диплоїда G/D12-2a) було виявлено анеуплоїдію, а рослина R-2 (диплоїдного походження від генотипу R35), характеризувалась як диплоїд з числом хромосом 2n=26. У регенерантів R-3, R-4, R-5, R-6, R-7, R-8, R-9 (походженням від гіпотриплоїда Y66) число хромосом становило 2n=26, 28, 33, 36 (див. табл. 3.8, рис. 3.13, рис. 3.14).

Наведені дані підтверджують той факт, що здатністю до органогенезу у генетично-гетерогенній клітинній популяції і утворенні регенерантів характеризуються переважно диплоїдні клітини без видимих хромосомних аберацій. Разом з тим, у рослин із гіпотриплоїдним генотипом у культурі можуть утворюватись анеуплоїдні або міксоплоїдні регенеранти [15].

З літератури відомо, що основним джерелом відмінностей між сомаклонами є різні зміни та перебудови в каріотипі рослин [259]. Більшість культивованих клітин із каріологічними змінами не здатні до регенерації повноцінних рослин. Наприклад, в культурі тканин скереди *C. capillaris* та гаплопапусу *H. gracilis* в їхніх гетерогенних за числом хромосом клітинних популяціях здатністю до спонтанного органогенезу володіли переважно диплоїдні клітини без видимих хромосомних аберацій [9].

Таблиця 3.8

Цитогенетичний аналіз рослин-регенерантів *D. antarctica*

Генотип	Регенерант	Походження	К-сть дослі-джених корін-ців	Число метафаз	Число хромосом (2n) *	Модаль-не число хромо-сом	К-сть метафаз з модаль-ним числом, %
G/D12-2a	R-1	корені	18	107	18(18), 21(11), 23(1), 26(74), 27(1), 28(2)	26	69,1
R35	R-2	корені	5	25	26 (25)	26	100
Y66	R-3	корені	8	14	26(12), 28(2)	26	85,7
	R-4		14	42	26(32), 28(2), 36(8)	26	76,1
	R-5		4	6	26(4), 28(1), 36(1)	26	66,6
	R-6		12	20	26(9), 28(5), 36(6)	26, 28	45
	R-7		9	33	26(8), 28(11), 33(7), 36(7)	28	33,3
	R-8		7	39	26(18), 28(9), 33(9), 36(5)	26	46,1
	R-9		11	61	26(38), 28(10), 33(6), 36(5)	26	62,3

*Примітка: у дужках вказано кількість метафаз із числом хромосом

Диплоїдні, триплоїдні та тетраплоїдні рослини-регенеранти було отримано з калюсів диплоїдного та тетраплоїдного екотипів *A. thaliana*. Більшість регенерантів, отриманих від диплоїдних рослин, мали таке ж хромосомне число, як і донорна рослина, а частка тетраплоїдів та триплоїдів була незначною – 18 % та 7 %, відповідно. Тоді як більшість регенерантів від калюсних ліній тетраплоїдного походження були диплоїдами, а частота рослин з хромосомним числом як у материнської рослини складала біля 20 %. Рівень плоїдності регенерантів корелював з типом та числом хромосом

експланту. Автори пояснюють це міксоплоїдією в тканинах досліджуваних рослин, що виникла в результаті ендоредуплікації протягом диференціації соматичних клітин [261].

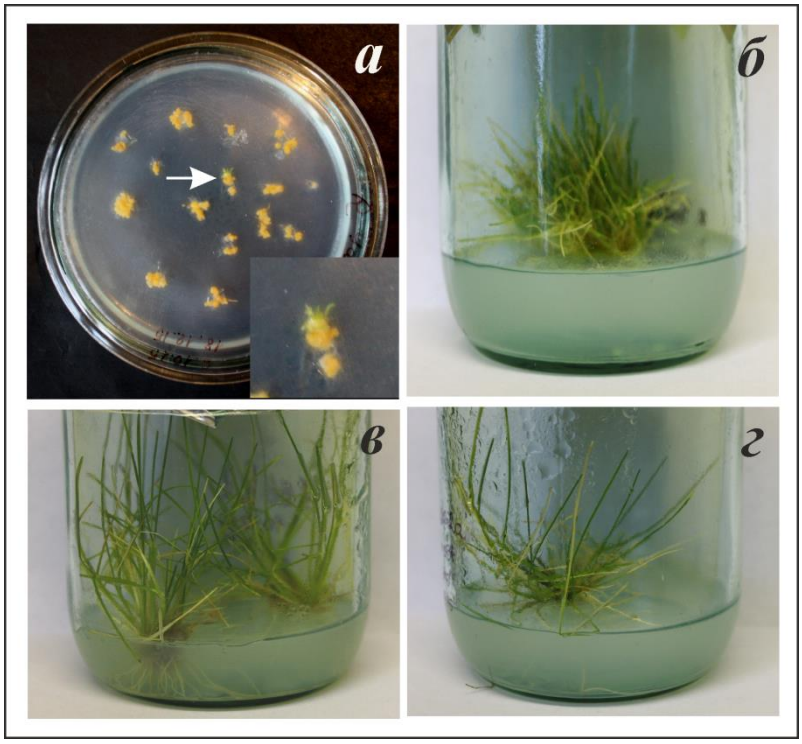

Рис. 3.13. Утворення перших листочків з калюсної тканини *D. antarctica* на регенераційному середовищі (*а*); досліджені рослини-регенеранти, походженням від диплоїдних генотипів G/D12-2a (*б*), R35 (*в*) і гіпотриплоїда Y66 (*г*)

При дослідженні регенерантів від аутотетраплоїда *Allium tuberosum* (2*n*=4*x*=32) з 163 досліджених рослин: 100 (61,3 %) були типовими тетраплоїдами (2*n*=32), 61 (37,4 %) були гіпотетраплоїдами і 2 (1,2 %) гіпертетраплоїдами. Використовуючи FISH-аналіз з 5S рРНК та 45S рРНК, автори виявили відмінності в каріотипі регенерантів. В порівнянні з вихідною рослиною дикого типу, було встановлено втрату двох хромосом, що спричинило втрату одного з сайтів 45S рРНК у сомаклону [263].

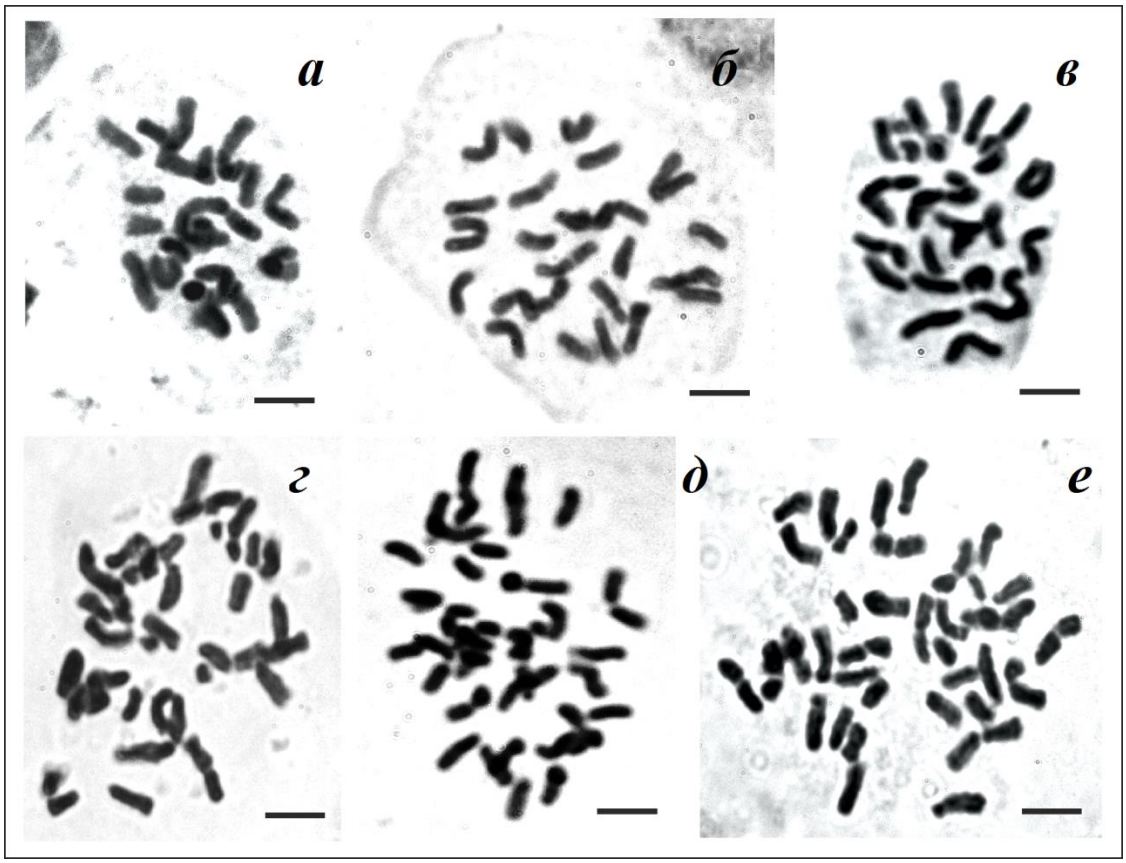

Рис. 3.14. Метафазні пластинки клітин апікальної меристеми корінців рослин-регенерантів *D. antarctica*; досліджувані зразки та виявлене число хромосом: *а* – R-1 (2n=21), *б* – R-1 (2n=23), *в* – R-2 (2n=26), *г* – R-3 (2n=28), *д* – R-7 (2n=33), *е* – R-9 (2n=36)

У різних видів ірисів *Iris pseudacorus, I. pumila, I. versicolos, I. setosa* регенеранти зберігали в основному генетичні характеристики вихідної рослини, зокрема хромосомне число виду, від якого вони були отримані, проте в них зустрічали приховані зміни – транслокації, делеції, інверсії [264]. Тому, у сомаклонів можливе виникнення змін на молекулярному рівні, що проявляються у вигляді зміни ступеня метилування ДНК, регуляції експресії генів, точкових мутацій, ампліфікації певних генів чи повторів ДНК, варіабельності певних ділянок геному [259].

Вивчення мінливості ДНК за використання RAPD та ISSR ДНК-маркерів у кукурудзи виявило чисельні відмінності між рослинами регенерантами та

вихідною лінією. Присутність спільних ознак у різних груп сомаклонів, які виявляються різними методами, свідчить, що вже на ранніх етапах культивування відбуваються подібні генетичні зміни, які можуть сприяти адаптації рослинних клітин до умов *in vitro*. Можливим є й добір клітин адаптованих до тривалого культивування, які й можуть утворювати регенеранти. Разом з тим, сомаклони, отримані від калюсів більш тривалого культивування, характеризувались вищим поліморфізмом фрагментів ДНК. Встановлено значний рівень поліморфізму за RAPD-маркерами у регенерантів рису, томатів, кукурудзи, гороху, часнику [265]. Вивчення генетичних дистанцій між рослиною-донором *Iris pseudacorus* і регенерантами, та між отриманими регенерантами виявило існування різниці, але показало, що вона у 1,5-1,7 раза менше рівня внутрішньовидових відмінностей [264]. А у клонів картоплі було виявлено зміни в генах рибосомної РНК, які не проявлялись фенотипово, але зберігались у вегетативного потомства [266].

Як відомо, варіації, що спостерігаються серед рослин-регенерантів, значно розширюють межі існуючої мінливості і з успіхом використовуються в селекційно-генетичній роботі. Тому, наведені результати дослідження сомаклональної мінливості у антарктичного злаку *D. antarctica* можуть мати особливе прикладне значення для виокремлення рослин, стійких до певних стресових чинників. Крім того, маніпуляції з такими рослинами *in vitro* є простим і ефективним методом для швидкого отримання достатньої кількості матеріалу, цікавого як з генетичної, так і фізіологічної точки зору, без нанесення шкоди природним екосистемам та порушення домовленостей, прописаних в Протоколі про охорону навколишнього середовища до Договору про Антарктику (Мадридському протоколі) [267].

Таким чином, в результаті проведеного дослідження було охарактеризовано сомаклональну мінливість рослин-регенерантів. Встановлено, що здатність до регенерації притаманна як для диплоїдних, так і для гіпотриплоїдного генотипу *D. antarctica*. За допомогою

цитогенетичного аналізу встановлено, що у всіх досліджуваних сомаклонів, незалежно від плоїдності вихідного експланту, у проліферативному пулі переважали клітини з диплоїдним числом хромосом. У одного з регенерантів, що походив від диплоїдного генотипу G/D12-2a, спостерігали анеуплоїдію. А у решти сомаклонів гіпотриплоїдного походження було виявлено мінливість за числом хромосом з переважанням диплоїдних клітин, яких не було виявлено у донорних рослин, що свідчить про підвищену нестабільність досліджуваного гіпотриплоїдного генотипу. Отримані дані підтвердили, що здатність до органогенезу та утворення регенерантів більш характерна для клітин з нормальним хромосомним набором (диплоїдних) у генетично-гетерогенній клітинній популяції, та дозволили виявити підвищену нестабільність хромосомного числа гіпотриплоїдного генотипу.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. Спірідонова К.В., Андрєєв І.О., Загричук 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. 36-43.
2. Кунах В.А., **Навроцька Д.О.**, Твардовська М.О., Андрєєв І.О. Особливості хромосомної мінливості в культурі тканин рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з різним числом хромосом // Вісник Українського товариства генетиків та селекціонерів. – 2016. – Т. 14, № 1 – С. 36-43.
3. **Navrotska D.O.**, Twardovska M.O., Andreev I.O., Betekhtin A.A., Hasterok R., Kunakh V.A. Karyotypic variation in *Deschampsia antarctica* Desv. plants and tissue culture // The 5-th International Conference for Young Scientists “CYS-2015”, September 21 – 25, 2015, Kyiv, Ukraine, P. 89.

4. **Navrotska D.**, Twardovska M.O., Andreev I.O., Kunakh V.A. Cytogenetic studies of *Deschampsia antarctica* Desv. tissue culture // Ukrainian Society of Cell Biology International Conference “Advances in cell biology and biotechnology”, October 11 – 13, 2015, Lviv, Ukraine, P. 127.
5. **Navrotska D.**, Andreev I., Twardovska M., Kunakh V. Genome variability of *Deschampsia antarctica* Desv. plants with different chromosome numbers in tissue culture // X Parnas Conference. Young Scientist Forum «Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine», Vol. 63, Sup.1, 10-12 July, 2016, Wroclaw, Poland, P. 14.
6. Спірідонова К.В., Андрєєв І.О., **Навроцька Д.О.**, Загричук О.М., Дробик Н.М., Кунах В.А.Цито- та молекулярно-генетичні дослідження мікроклонально розмножених рослин *Deschampsia antarctica* E. Desv. за тривалого культивування *in vitro* // VIII Міжнародна Антарктична Конференція, присвячена 25-річчю приєднання України до договору про Антарктику, 16-18 травня, 2017, Київ, Україна, С. 98-99.
7. **Навроцька Д.О.**, Андрєєв І.О., Кунах В.А. Цитогенетичне дослідження рослин-регенерантів *Deschampsia antarctica* E. Desv. // Міжнародна конференція молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології», 5 – 10 вересня, 2017, Луцьк, Україна, С. 77.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Рослини як прикріплені організми здатні адаптуватись до несприятливих умов навколишнього середовища, щоб забезпечити собі виживання та репродуктивний успіх. Частіше за все, пристосування до стресових умов довкілля може відбуватися за рахунок зміни фізіологічних функцій. Але якщо регуляторні системи рослини не спроможні компенсувати дію зовнішніх факторів, тоді можлива активація генетичної мінливості. Такі специфічні механізми пристосування до стресових умов існування здатні проявлятись як всередині окремого організму, так і на популяційному рівні [7, 8].

В географічно-периферійних популяціях організмів відмічають низький рівень генетичного різноманіття і високі показники генетичної диференціації, порівняно з популяціями з центральних частин ареалу [1, 2]. Під впливом несприятливих екологічних умов, в маргінальних популяціях можуть відбуватися інтенсивні процеси видоутворення, що сприяють підтриманню біологічного різноманіття [3, 4]. Нові форми чи навіть раси організмів можуть виникати на краю ареалу внаслідок молекулярно-генетичної та/чи хромосомної мінливості за дії інтенсивного добору під тиском несприятливих чинників навколишнього середовища [5].

Одним із найсуворіших за кліматичними умовами регіоном планети є Антарктика. Екосистема цього континенту є моделлю адаптації організмів до полярних екстремумів – низької температури, шквального вітру, незначної вологості повітря (в деяких антарктичних оазах знижується навіть до 5%), впливу УФ випромінювання, снігових буревіїв, бідних на органічні сполуки та наповнених важкими металами ґрунтів. Тому, дослідження *D. antarctica* –

єдиного представника злаків в Антарктиці, що колонізував північно-західну частину Антарктичного півострова (південний край ареалу виду), є особливо актуальним. Вважають, що пристосування виду могло відбуватись завдяки активації механізмів геномної мінливості, які в несприятливих умовах забезпечують зростання різноманіття і, відповідно, адаптивного потенціалу популяції.

В цій роботі ми ставили за мету з'ясувати особливості мінливості геному на хромосомному та молекулярно-генетичному рівні в рослин *D. antarctica* з крайових популяцій регіону Аргентинських островів Морської Антарктики.

У результаті генетичних досліджень рослин *D. antarctica* показано, що каріотип більшості проаналізованих зразків з регіону Аргентинських островів Морської Антарктики має типовий для виду набір хромосом 2n=26. Вперше виявлено нові форми хромосомного поліморфізму – рослини з міксоплоїдією, анеуплоїдією, гіпотриплоїдією та додатковими хромосомами. З літератури відомо, що диплоїдний набір хромосом 2n=26, тобто основне 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, які характеризуються найбільшим різноманіттям основного хромосомного числа (x=2–13) [222, 223]. Для роду *Deschampsia* відомі також поліплоїдні та триплоїдні генотипи, які мають 52 (*D. brevifolia* R. Br., *D. mackenzieana* Raup., *D. mildbraedii* Pilg.) чи 39 хромосом (*D. alpine* (L.) Roem et. Schult.) [125, 197]. B-хромосоми також були знайдені й у інших видів роду *Deschampsia*, зокрема в *D. caespitosa* (2n=26+0–2B) та *D. wibeliana* (2n=26+0–5B) [195]. Відповідно до гіпотези Кавано і Альбертса поліплоїдні види роду виникли внаслідок дуплікацій (x=7–14), тоді як види з хромосомним числом 2n=26 з'явились внаслідок дисплоїдії (28–26) від поліплоїдних видів [141, 196]. Вважають, що *D. antarctica* – один із видів, еволюція якого йшла в напрямку дисплоїдії

[197]. Поява таких рослин може бути наслідком підвищеної геномної нестабільності виду, зумовленої несприятливими антарктичними умовами зростання чи вегетативним способом розмноження.

При вимірюванні розміру геному *D. antarctica* за допомогою проточної цитофлуориметрії було встановлено, що ядерний вміст ДНК досліджуваних диплоїдних рослин (10,88 пг/2C) узгоджувався з наведеними в літературі значеннями. У зразку з B-хромосомами в каріотипі, вміст ДНК (10,86 пг/2C) знаходився в межах діапазону значень отриманих для диплоїдів. А у рослин гіпотриплоїдного генотипу середнє значення 2C (16,46 пг) було в 1,5 рази більше, ніж у диплоїдних рослин. Згідно з літературними даними, вміст 2C ДНК у диплоїдних рослин *D. antarctica* з о. Галіндез складав 9,95 пг, а для тетраплоїдної форми *D. caespitosa* з району Британських островів Морської Антарктики було встановлене значення 9,0 пг [237]. Відомо, що у диплоїдів *D. caespitosa*, *D. chapmania* і *D. tenella* з Нової Зеландії, значення 2C складали 10,43 пг, 11,05 пг і 10,07 пг, відповідно [238]. Тому, отримані дані, можуть свідчити про стабільність розміру геному у представників виду *D. antarctica* та роду *Deschampsia* в тому числі. Таким чином, проведене дослідження дозволило розширити відомості про розмір геному антарктичного злаку з інших локалітетів Антарктики, визначити значення для рослин з популяцій південного краю ареалу, порівняти вміст ДНК у рослин, що відрізнялись за числом хромосом, та може бути корисним при подальшому вивченні геному цього виду.

При дослідженні мінливості рослин за молекулярними маркерами, за допомогою ПЛР-аналізу з ISSR та IRAP праймерами, було отримано 63 амплікони, серед яких 16 (25,4 %) були поліморфними. За ПЛР-спектрами досліджуваних генотипів було розраховано генетичні відстані за Жаккардом, які знаходились у межах 0,0323–0,1803. Отримані результати вказують на те, що відмінності між диплоїдними рослинами та гіпотриплоїдом чи генотипом з B-хромосомами не перевищують рівня молекулярно-генетичних відмінностей між окремими диплоїдними рослинами.

В результаті вивчення особливостей структури геному *D. antarctica*, використовуючи метод флуоресцентної гібридизації *in situ,* було ідентифіковано окремі хромосоми, встановлено локалізацію генів 5S рРНК та 45S рРНК, теломерних і центромерних повторів у каріотипі досліджених рослин. Разом з тим, виявлено відмінності в розташуванні локусів генів рРНК у рослин з диплоїдним і гіпотриплоїдним хромосомним набором. Також нами підтверджено наявність В-хромосом – виявлено центромерну та теломерні ділянки у будові таких додаткових хромосом, що вказує на їхню структурну цілісність.

Отримані результати згодом були підтверджені іншими дослідженнями [268]. Було встановлено, що хромосоми *D. antarctica* в наборі можна поділити на чотири групи на основні їх морфології і положення центромери: перша включає шість метацентричних, друга – дві субметацентричні, третя – три субтелоцентричні, четверта – дві телоцентричні хромосоми. С-диференційне забарвлення за Гімза дозволило виявити подібність розташування гетерохроматинових ділянок у каріотипах рослин з чотирьох різних острівних популяцій: великі бенди розташовувались у перицентромерних і теломерних регіонах хромосом, а невеликі були виявлені в інтерстиціальних (проміжних) регіонах. В результаті С-фарбування за Гімза та DAPI/C-бендінгу автори виявили низьку мінливість досліджених рослин за розміром, числом проміжних (інтеркалярних) і теломерних смуг гетерохроматину.

Разом з тим, автори продемонстрували наявність метафазних пластинок з трьома В-хромосомами у каріотипі рослин з о. Дарбо. А також показали присутність чітких гетерохроматинізованих ділянок в теломерних регіонах таких додаткових хромосом. Використовуючи FISH-аналіз, вони виявили, що 45S рРНК локуси були розташовані на двох парах хромосом – проксимальному регіоні короткого плеча метацентричної пари хромосом і дистальному регіоні короткого плеча субметацентричної пари хромосом. 5S рДНК сайти були локалізовані на п’яти парах хромосом і розташовувались у

проксимальному регіоні короткого плеча найбільшої метацентричної хромосоми, субтеломерних регіонах довгих плечей двох метацентричних хромосом, проксимальних регіонах довгих плечей пари субтелоцентричних хромосом і пари телоцентричних хромосом. Слабкі сигнали 5S рДНК було виявлено в субтеломерних регіонах B-хромосом. Також було виявлено чотири активні ядерце-організуючі ділянки на чотирьох хромосомах каріотипу.

В результаті такого дослідження було показано, що теломерні повторювані послідовності розташовуються на термінальних регіонах всіх хромосом більшості досліджуваних рослин. Генотип, виявлений на о. Великий Ялур, де переважали метафази з 38 хромосомами, раніше міг бути триплоїдом, але зазнав хромосомних перебудов. Використовуючи GISH-аналіз із міченою геномною ДНК *D.caespitosa* в якості зонду, авторам вдалось показати наявність Робертсонівської транслокації між гомологічними хромосомами дванадцятої пари в цьому каріотипі [268].

Разом з тим, в іншому дослідженні було виявлено подібність каріотипів *D. antarctica*, *D. cespitosa*, *D. elongata* та *D. sukatschewii*, на відміну від *D. flexuosa* [250]. Хромосоми *D. flexuosa* не відрізнялись за розміром та розташуванням центромери, тоді як каріотипи інших видів містили хромосоми різного розміру, в тому числі одну пару хромосом більшого розміру. Автори стверджують, що така метацентрична хромосома виникла завдяки транслокації (чи центричному злиттю) двох акроцентричних хромосом, утворивши каріотип з нетиповим для злаків набором хромосом 2n=26 [269].

Варто зазначити, що при дослідженні рослин *D. antarctica* на території Аргентини, а саме в Патагонії (Chubut Province) на північному краю поширення виду, було знайдено популяцію рослин з тетраплоїдним цитотипом (2n=52) [199]. При вивченні зразків з Антарктичного півострова та суб-антарктичних островів було виявлено лише диплоїдні рослини. Загальний розмір основного хромосомного комплементу (x=13) у

досліджених рослин варіював в межах від 44,36 до 56,62 мкм, при цьому найменший розмір було виявлено у рослин тетраплоїдної популяції, а найбільший – у диплоїдних рослин з популяції суб-антарктичних островів. За допомогою FISH аналізу було встановлено, що розташування локусів генів рРНК було відносно сталим, але з невеликими варіаціями. Кількість сайтів 45S рДНК складала від одного до трьох: перший локалізувався у інтеркалярному регіоні короткого плеча у всіх досліджуваних зразків, за виключенням одного з популяції Патагонії, у рослин з якої такий сайт розміщувався в термінальній позиції; другий тип локусу був розміщений на короткому плечі метацентричної хромосоми диплоїдних каріотипів рослин з двох популяцій Патагонії; третій – локалізувався в термінальній області короткого плеча субметацентричної хромосоми і були виявлені лише в каріотипі рослин тетраплоїдної популяції.

Досліджувані каріотипи всіх диплоїдних популяцій мали п’ять сайтів 5S рДНК з відмінностями в їх розташуванні. В зразках однієї з популяцій Патагонії було виявлено локус в субтеломерному регіоні короткого плеча метацентричної хромосоми п’ятої пари та відсутність сайту розташованого на довгому плечі однієї акроцентричної хромосоми дев’ятої пари, що був присутній у диплоїдних популяціях. В каріотипі рослин поліплоїдної популяції спостерігали сім локусів гібридизації, що розташовувались в однакових позиціях на хромосомах, на противагу диплоїдним популяціям [199].

При аналізі літературних даних було виявлено відмінності в структурі каріотипу рослин щучника антарктичного з різних локалітетів ареалу поширення виду. Вперше описаний каріотип рослин, що походив з о. Кінг Джордж Морської Антарктики, складався з 5 метацентричних, 3 субметацентричних, 4 субтелоцентричних і 2 телоцентричних пар хромосом (2n=26=2(5m+3sm+4st+1t) [197]. Інші дослідження виявили також 5 пар метацентричних, але 2 пари субметацентричних і 6 пар акроцентричних хромосом (2n=26=2(5m+2sm+6a) в диплоїдному генотипі з Антарктичного

півострова, суб-Антарктичних островів і Південно-Американських популяцій [199]. Однак, абсолютно відмінну формулу каріотипу було виявлено для зразків з регіону Аргентинських островів Морської Антарктики – описано наявність 6 метацентричних, 2 суб-метацентричних, 3 субтелоцентричних і 2 телоцентричних хромосом (2n=26=2(6m+2sm+3st+2t) [268]. Такі відмінності в структурі каріотипу *D. antarctica* можуть бути пояснені різним походженням досліджуваних рослин, умовами їх існування чи різними підходами до дослідження.

Відомо, що триплоїдні і тетраплоїдні види, які мають 39 (*D. alpina*) та 52 хромосоми (*D.brevifolia, D. mackenzieana, D. mildbraedii, D. orientalis*) були знайдені у роду *Deschampsia* [139, 197]. Таким чином, виявлені хромосомні явища відомі для представників роду поза Антарктикою. Суттєва мінливість за числом хромосом: наявність триплоїдної (2n=39) та тетраплоїдної (2n=52) форм також було описано для *D. alpina*. Автори стверджують, що триплоїди, що виникли внаслідок злиття редукованих та нередукованих гамет, могли продукувати насіння, що сприяло поширенню рослин з аберраціями в природі [225]. Крім того, диплоїдні і тетраплоїдні форми *D. caespitosa* були знайдені на території Британських островів [248]. Два види диплоїдних (*D. atropurpurea* і *D. cetaceae*, 2n=14) і два види тетраплоїдних видів (*D. bottnika* і *D. flexuosa*, 2n=28) було описано в Скандинавії [225].

З літератури відомо, що спонтанна анеуплоїдія, триплоїдія і додаткові хромосоми в каріотипі були знайдені в крайових популяціях виду *Aegilops speltoides*. Автори стверджують, що хоча анеуплоїдія може виникати як результат генних мутацій і/чи мейотичних відхилень, також може відбуватись спонтанне нерозходження цілого хромосомного комплементу. Крім того, припускають, що зростання співвідношення самозапилення до перехресного запилення в стресових умовах може сприяти появі перебудов у локалізації та кількості генів рРНК [5].

Таким чином, одержані нами результати вказують на каріотипову мінливість за дослідженими маркерними послідовностями у гіпотриплоїда та

генотипу з В-хромосомами, що демонструє основні можливі зміни в структурі геному *D. antarctica*. Отримані дані мають вагоме фундаментальне значення і можуть бути корисними для подальшого дослідження структури геному, а також для вивчення еволюції та походження цього виду.

Відомо, що культивування рослин чи їх експлантів на штучних живильних середовищах створює значний стрес, який впливає на організм у цілому і може спричинювати певні зміни його спадкового матеріалу. У результаті дослідження сомаклональної мінливості *D. antarctica* в умовах *in vitro* було проведено аналіз рослин-клонів за мікроклонального розмноження та тривалого культивування *in vitro*, культури тканин та рослин-регенерантів.

За використання цитогенетичного та молекулярно-генетичного аналізу показано збереження генетичних характеристик рослин-клонів у процесі тривалого культивування *in vitro*. Відмінностей у спектрах ISSR-ПЛР-продуктів як всередині кожної з груп рослин одного генотипу, так і в порівнянні з вихідним предком не виявлено. Рослини диплоїдного походження так і залишались диплоїдними, а в міксоплоїдів було виявлено хромосомну мінливість, при цьому співвідношення клітин змінювалось в залежності від пасажу культивування. Отримані дані дають підстави стверджувати про відсутність сомаклональної мінливості та стабільність генетичних характеристик у рослин при тривалому культивуванні *in vitro*. Результати узгоджуються з даними інших досліджень генетичної мінливості у мікроклонально-розмножуваних рослин [250, 251, 252, 254, 255]. Тому, використовуючи такий підхід, можна культивувати *in vitro* рослини *D. antarctica* для подальшого їх застосування в експериментах по вивченню фізіолого-біохімічних параметрів та біотехнологічних дослідженнях, чи використовувати, наприклад, при відсутності достатньої кількості рослинного матеріалу з Антарктики.

Вивчення культури тканин *D. antarctica* дозволило вперше з’ясувати цитогенетичну структуру клітин калюсів виду. Одержані експериментальні дані свідчать про наявність хромосомної мінливості в клітинах калюсних

культур *D. antarctica* на початкових етапах субкультивування, та підтверджують явище збереження цитогенетичних особливостей у зразків диплоїдних генотипів G/D12-2a, DAR12, S22. Для решти культур тканин, отриманих від рослин генотипів Y66 та R35, характерне явище хромосомної нестабільності. Найбільший розмах мінливості за числом хромосом виявлено у калюсі, отриманому від диплоїдної рослини G/D12-2a. Меншу варіабельність показано у культурах тканин генотипів DAR12 (з B-хромосомами), Y66 (гіпотриплоїд) та S22 (диплоїд). А найменшу мінливість числа хромосом було встановлено у калюсі диплоїдного генотипу R35. Показано, що в культурі тканин *D. antarctica* на перших етапах її культивування, незалежно від стану каріотипу вихідної рослини (диплоїд, гіпотриплоїд та з B-хромосомами), модальний клас формували диплоїдні клітини та клітини з близьким до диплоїдного числом хромосом. Підтвердження отриманих результатів було виявлено в літературі – відмінності за числом хромосом спостерігали також у первинних калюсах томату *Lycopersicon esculentum*, отриманих від гаплоїдної, диплоїдної і тетраплоїдної рослин [260]; високий рівень поліплоїдизації протягом калюсогенезу було виявлено в зразках *A. thaliana* диплоїдного та аутотетраплоїдного походження [261]; у первинному калюсі виду *Carex capillaris*, гаплоїдного походження, рівень поліплоїдії був набагато вищим, ніж у тих, що були отримані від диплоїдних рослин-донорів [9]. Таким чином, виявлені відмінності можна пояснити тим, що деякі калюсні культури, очевидно, знаходяться на стадії становлення штаму і не є сформованими, а все ще зазнають змін у процесі культивування. Тому, в перспективі планується провести дослідження калюсів *D. antarctica* на більш пізніх пасажах, щоб перевірити які клітини будуть формувати модальний клас у різних штамів.

Отримано рослини-регенеранти *D. antarctica* та за допомогою цитогенетичного аналізу показано, що у всіх досліджених рослин, незалежно від плоїдності вихідного експланту, переважали клітини з диплоїдним

числом хромосом. У отриманих регенерантів, що походили від диплоїдних генотипів, було встановлено диплоїдний набір хромосом та анеуплоїдію. Тоді як у решти сомаклонів, походженням від гіпотриплоїдного предка, виявлено мінливість за числом хромосом з переважанням диплоїдних клітин. Такі дані підтверджують, що здатність до органогенезу та утворення регенерантів більш характерна для клітин з диплоїдним хромосомним набором. Разом з тим, анеуплоїдні та міксоплоїдні регенеранти теж мають право на існування.

З літератури відомо, що здатністю до спонтанного органогенезу володіють переважно диплоїдні клітини без видимих хромосомних аберацій [259], як це було показано для *C. capillaris* та гаплопапусу *H. gracilis* [9]. У *A. thaliana* рівень плоїдності регенерантів корелював з типом та числом хромосом експланту [261], тоді як виникнення змін на молекулярному рівні було виявлене у сомаклонів різних видів ірисів [259] та кукурудзи [265].

Таким чином, маніпуляції з рослинами щучника антарктичного *in vitro* є простим і ефективним методом для швидкого отримання достатньої кількості матеріалу без нанесення шкоди природним екосистемам та порушення заборон по використанню ресурсів Антарктики. Як відомо, генетична мінливість, що спостерігаються у рослин-регенерантів, з успіхом використовується в селекційно-генетичній роботі. Тому, наведені результати дослідження сомаклональної мінливості у антарктичного злаку *D. antarctica* можуть мати особливе прикладне значення при створенні рослин, стійких до певних стресових чинників.

Отже, використання цитогенетичних і молекулярно-генетичних підходів, дозволило виявити мінливість геному рослин *D. antarctica* з різних маргінальних популяцій регіону Аргентинських островів Морської Антарктики. За допомогою проведених досліджень було встановлено мінливість за числом хромосом; визначено розмір геному рослин; ідентифіковано окремі хромосоми, встановлено розташування та кількість локусів генів 5S рРНК та 45S рРНК, теломерних і центромерних повторів в

каріотипі *D. antarctica*; не виявлено відмінності на хромосомному та молекулярно-генетичному рівні у рослин-клонів *D. antarctica* в процесі тривалого культивування *in vitro*; показано наявність хромосомної мінливості в клітинах калюсних культур *D. antarctica* на початкових етапах культивування; виявлено сомаклональну мінливість з переважанням диплоїдних клітин у рослин-регенерантів *D. antarctica* непрямого походження. Отримані результати підтверджують концепцію про край ареалу виду та демонструють наявність генетичної диференціації в популяціях щучника антарктичного з південного краю поширення в Морській Антарктиці.

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 культивувованих *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 (2С/пг) 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 особиною: 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 білядиплоїдним числом хромосом.
7. Отримано рослини-регенеранти *D. antarctica*. За допомогою цитогенетичного аналізу встановлено, що у всіх сомаклонів, незалежно від плоїдності рослини-донора експлантів, в зоні апікальної меристеми кореня переважали диплоїдні клітини.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sagarin RD, Gaines SD. The ‘abundant centre’ distribution: to what extent is it a biogeographical rule? Ecol Lett. 2002;5(1):137–47.
2. Eckert C, Samis K, Lougheed S. Genetic variation across species’ geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. Mol Ecol. 2008;17(5):1170–88.
3. Grant V. Plant speciation. New York: Columbia University Press; 1981. 432 p.
4. Kirkpatrick M, Barton NH. Evolution of a species' range. Am Nat. 1997;150(1):1–23.
5. Belyayev A, Raskina O. Chromosome evolution in marginal populations of *Aegilops speltoides*: causes and consequences. Ann Bot. 2013;111(4):531–38.
6. Yang C. Adaptive plant physiology in extreme environments. J Plant Physiol. 2016;194:1–72.
7. Gomulkiewicz R, Hol RD. When does evolution by natural selection prevent extinction? Evolution. 1995; 49(1): 201–7.
8. Ellegren H, Galtier N. Determinants of genetic diversity. Nature Rev Genet. 2016;17:422–33.
9. Кунах ВА. Онтогенетическая пластичность генома как основа адаптивности растений. Жебраковские чтения III. Преобразование геномов. Минск: Право и экономика; 2011. 53 с.
10. Amtmann A, Bohnert HJ, Bressan RA. Abiotic stress and plant genome evolution. Search for new models. Plant Physiol. 2005;138(1):127–30.
11. Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. Plant Cell Environ. 2010;33:453–67.

12. Spano C, Bruno M, Bottega S. Calystegia soldanella: dune versus laboratory plants to highlight key adaptive physiological traits. Acta Physiol Plant. 2013;35(4):1329–36.
13. Rizhsky L, Liang H, Mittler R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. Plant Physiol. 2002;130(3):1143–51.
14. Bartoli G, Bottega S, Forino LM, Ciccarelli D, Spano S. Plant adaptation to extreme environments: the example of *Cistus salviifolius* of an active geothermal alteration field. C R Biol. 2014;337(2):101–10.
15. Кунах ВА. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос; 2005. 730 с.
16. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge. Science.1984;226:792–801.
17. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge. Dyn. Genome: Barbara McClintock's Ideas Century Genet. New York: Cold Spring Harbor Lab;1992. p. 361–80.
18. Wills BJ. Alternative plant species for revegetation and soil conservation in the tussock grasslands of New Zealand. Journal of the Tussock Grassland and Mountain Lands Institute. 1984;42:49–58.
19. Pearson LC. The diversity and evolution of plants. New York: CRC Press; 1995. 647 p.
20. Kalendar R, Tanskanen J, Immonen S, Nevo E, and Schulman AH. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:6603–7.
21. Wendel JF. Genome evolution in polyploids. Plant Mol Biol. 2000;42:225–49.
22. Madlung A, Comai L. The effect of stress on genome regulation and structure. Ann Bot. 2004;94:481–95.
23. Fedoroff N.V. Maize transposable elements in development and evolution. Amer Zool. 1989;29(2):549–55.

24. McGrath CL, Lynch M. Evolutionary significance of whole-genome duplication. In: Soltis PS, Soltis DE (ed.). Polyploidy and Genome Evolution. New York: Springer; 2012. p. 1–20.
25. Stebbins G.L. Types of polyploids: their classification and significance. *Adv Genet*. 1947;1:403–29.
26. Lewis W. Polyploidy in species populations. In: Lewis W. (ed.). Polyploidy: Biological Relevance. New York: Plenum; 1980. p. 103–44.
27. Grant V. Genetics of flowering plants. New York: Columbia University Press; 1975. 563 p.
28. Levin DA. The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford: Oxford University Press; 2002. 241 p.
29. Madlung A. Polyploidy and its effect on evolutionary success: old question revisited with new tools. Heredity. 2012;110(2):99–104.
30. Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T. Organization of the plant genome in chromosomes. Plant J. 2011;66:18–33.
31. Riley R, Chapman V. The production and phenotypes of wheat-rye chromosome addition lines. Heredity. 1958;12:301–15.
32. Stebbins GL. Variation and evolution in plants. New York: Columbia University Press; 1950. 643 p.
33. Wood T, Takebayashi N, Barker M, Mayrose I, Greenspoon P, Rieseberg L. The frequency of polyploidy speciation in vascular plants. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:13875–9.
34. Mayrose I, Zhan SH, Rothfels CJ, Magnuson-Ford K, Baker MS, Reiseberg LH, Otto SP. Recently formed polyploidy plants diversity at lower rates. Science. 2011;333:1257.
35. Arrigo N, Barker MS. Rarely successful polyploids and their legacy in plant genomes. Curr Opin Plant Biol. 2012;15:140–6.
36. Ohno S. Evolution by gene duplication. New York: Springer Verlag; 1970. 160 p.

37. Chen ZJ. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. Trends Plant Sci. 2010;15:57–71.
38. Mayfield D, Chen ZJ, Pires JC. Epigenetic regulation of flowering time in polyploids. Curr Opin Plant Biol. 2011;14:174–8.
39. Soltis PS and Soltis DE. The role of hybridization in plant speciation. Ann Rev Plant Biol. 2009;60:561–88.
40. Soltis DE, Burleigh JG. Surviving the K–T mass extinction: new perspectives of polyploidization in angiosperms. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:5455–6.
41. Proost S, Pattyn P, Gerats T, van der Peer Y. Journey through the past: 150 million years of plant genome evolution. Plant J. 2011;66:58–65.
42. Soltis PS, Soltis DE. Polyploidy and genome evolution. New York: Springer; 2012. 411 p.
43. Adams K, Wendel J. Polyploidy and genome evolution in plants. Curr Opin Plant Biol. 2005;8:135–141.
44. Moore RC, Purugganan MD. The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. Curr Opin Plant Biol. 2005;8:122–8.
45. Lynch M. The origins of genome architecture. Massachusetts: Sinauer Associates; 2007. 483 p.
46. Wendel JF, Lex EF, Adams KL. Jeans, genes, and genomes: cotton as a model for studing polyploidy. In: Soltis P.S. and Soltis D.E. (ed.). Polyploidy and Genome Evolution. New York: Springer; 2012. 201 p.
47. Comai L. The advantages and disadvantages of being polyploidy. Nat Rev Genet. 2005;6:836–46.
48. Speckman G, Post J, Dijkstra H. Length of stomata as an indicator for polyploidy in rye-grasses. Euphytica. 1965;14:225–8.
49. Rhoades MM, Dempsey E. Induction of chromosome doubling at meiosis by the elongate gene in maize. Genetics. 1966;54:505–22.
50. Melarango JE, Mehrotra B, Coleman AW. Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*. The Plant Cell. 1993;5(11):1661–8.

51. Levin D. The role of chromosomal change in plant evolution. New York: Oxford University Press; 2002. 241 p.
52. Hegarty MJ, Batstone TOM, Barker GL, Edwards KJ, Abbott RJ, Hiscock SJ. Nonadditive changes to cytosine methylation as a consequence of hybridization and genome duplication in *Senecio* (Asteraceae). Mol Ecol. 2011;20:105–13.
53. Mayfield D, Chen ZJ, Pires JC. Epigenetic regulation of flowering time in polyploids. Curr Opin Plant Biol. 2011;14:174–8.
54. Xiong Z, Gaeta RT, Pires JC. Homoeologous shuffling and chromosome compensation maintain genome balance in resynthesized allopolyploid *Brassica napus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:7908–13.
55. Matsushita SC, Tyagi AP, Thornton GM, Pires JC, Madlung A. Allopolyploidization lays the foundation for evolution of distinct populations: evidence from analysis of synthetic arabidopsis allohexaploids. Genetics. 2012;191:535–47.
56. Tang H, Bowers JE, Wang X, Paterson AH. Angiosperm genome comparisons reveal early polyploidy in the monocot lineage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:1472–7.
57. Castilho A, Heslop-Harrison JS. Physical mapping of 5S and 18S–25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata*. Genome. 1995;38:91–6.
58. Wang J, Tian L, Lee HS, Wei NE, Jiang H, Watson B, et al. Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids. Genetics. 2006;172(1):507–17.
59. Chen Z. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. Ann Rev Plant Biol. 2007;58:377–406.
60. Leitch AR, Leitch IJ. Genomic plasticity and the divercity of polyploidy plants. Science. 2008;320(5875):481–3.
61. Кашин АС. Гаметофитный апомиксис как неустойчивая система семенного размножения у цветковых. Саратов: Научная книга; 2006. 310 с.
62. Кашин АС, Цветова МИ, Демочко ЮА. Цитогенетические особенности генезиса клеток апикальных меристем при гаметофитном апомиксисе (на

примере автономных апомиктов *Asteraceae*). Цитология и генетика. 2011;45(2):28–40.

63. Yudakova OI, Shakina TN, Tyrnov VS, Kunakh VA, Kozeretska IA, Parnikoza IYu. Pollen quality and microgametophyte structure peculiarity in Antarctic populations of *Deschampsia antarctica* E. Desv. Bulletin of Botanic garden of Saratov State University. 2012;10:203–7.
64. Love A, Love D. The geobotanical significance of polyploidy. Portugaliae Acta (Suppl). 1949:273–352.
65. Love A. Subarctic polyploidy. Hereditas. 1953;39:113–24.
66. Grant V. Plant Speciation. 1st ed. New York: Columbia University Press; 1971. 435 p.
67. Maherali H, Walden AE, Husband BC. Genome duplication and the evolution of physiological responses to water stress. New Phytol. 2009;184:721–31.
68. Ramsey J. Polyploidy and ecological adaptation in wild yarrow. Proc Natl Acad Sci. 2011;108:7096–101.
69. Buggs RJ, Elliott NM, Zhang L, Koh J, Viccini LF, Soltis DE, Soltis PS. Tissue-specific silencing of homoeologs in natural populations of the recent allopolyploid *Tragopogon mirus*. New Phytol. 2010;186:175–83.
70. Chelaifa H, Monnier A, Ainouche M. Transcriptomic changes following recent natural hybridization and allopolyploidy in the salt marsh species *Spartina townsendii* and *Spartina anglica* (*Poaceae*). New Phytol. 2010;186:161–74.
71. Bardil A, de Almeida JD, Combes MC, Lashermes P, Bertrand B. Genomic expression dominance in the natural allopolyploid *Coffea arabica* is massively affected by growth temperature. New Phytol. 2011;192:760–74.
72. Combes MC, Cenci A, Baraille H, Bertrand B, Lashermes P. Homeologous gene expression in response to growing temperature in a recent allopolyploid (*Coffea arabica* L.). J Hered. 2012;103:36–46.
73. Liu Z, Adams KL. Expression partitioning between genes duplicated by polyploidy under abiotic stress and during organ development. Curr Biol. 2007;17:1669–74.

74. Dong S, Adams KL. Differential contributions to the transcriptome of duplicated genes in response to abiotic stresses in natural and synthetic polyploids. New Phytol. 2011;190:1045–57.
75. Zhou R, Moshgabadi N, Adams KL. Extensive changes to alternative splicing patterns following allopolyploidy in natural and resynthesized polyploids. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(38):16122–7.
76. Kim E-D, Chen ZJ. Unstable transcripts in arabidopsis allotetraploids are associated with nonadditive gene expression in response to abiotic and biotic stresses. PLoS ONE [Internet]. 2011;6. Available from: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024251
77. Grant V. Plant speciation. 2nd ed. New York: Columbia University Press; 1981. 432 p.
78. Lumaret R. Adaptive strategies and ploidy levels. Acta Oecologica/ Oecol. Plant. 1988;9:83.
79. Finigan P, Tanurdzic M, Martienssen RA. Origins of novel phenotypic variation in polyploids. In: Soltis P.S. and Soltis D.E. (ed.). Polyploidy and Genome Evolution. New York: Springer; 2012. 201 p.
80. Hasterok R, Maluszynska J. Nucleolar dominance does not occur in root tip cells of allotetraploid *Brassica* species. Genome. 2000;43(3):574–9.
81. Hasterok R, Wolny E, Hosiawa M, Kowalczyk M, Kulak-Ksiazczyk S, Ksiazczyk T, et al. Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of *Brassicaceae*. Ann Bot. 2006;97(2):205–16.
82. Otto SP. The evolutionary consequences of polyploidy. Cell. 2007;131:452–62.
83. Soltis DE, Soltis PS, Schemske DW, Hancock JF, Thompson JN, Husband BE, Judd WS. Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? Taxon. 2007;56:13–30.
84. Родионов АВ, Носов НН, Ким ЕС, Мачс ЭМ, Пунина ЕО, Пробатова НС. Происхождение полиплоидных геномов мятликов *(Poa* L.*)* и феномен потока генов между северной пацификой и субантарктическими островами. Генетика. 2010;46(12):1598–1608.

85. Datta AK, Mandal A, Das D, Gupta S, Saha A, Paul R, Sengupta S. B chromosomes in angiosperm - a review. *Tsitol Genet*. 2016;50(1):68–79.
86. Jones N, Houben A. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Trends Plant Sci*. 2003; 8(9):417–23.
87. Jones N, Viegas W, Houben A. A century of B chromosomes in plants: so what? Ann Bot. 2008;101:767–75.
88. Hasterok R, Jenkins G, Langdon T, Jones N. The nature and destiny of translocated B-chromosome-specific satellite DNA of rye. Chromosome Res. 2002;10:83–86.
89. Кунах ВА. Додаткові або В-хромосоми рослин. Походження і біологічне значення. Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. 2010;8(1): 99–139.
90. Кунах ВА. Мобільні генетичні елементи і пластичність геному рослин. Київ: Лого; 2013. 288 с.
91. Banaei-Moghaddam AM, Martis MM, Macas J, Gundlach H, Himmelbach A, Altschmied L, Mayer KFX, Houben A. Genes on B chromosomes: old questions revisited with new tools. Biochem Biophys Acta. 2015;1849(1):64–70.
92. Jones RN. B chromosomes in plants. New Phytologist. 1995;131:411–34.
93. Dhar MK, Friebe B, Koul AK, Gill BS. Origin of an apparent B chromosome by mutation, chromosome fragmentation and specific DNA sequence amplification. Chromosoma. 2002;111:332–40.
94. Dubcovsky J., Dvorak J. Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the *Triticeae* genomes. *Genetics*. 1995;140:1367–77.
95. Oliver JL, Posse F, Martinez-Zapater JM, Enriquez AM. B chromosomes and El isoenzyme activity in mosaic bulds of *Scilla autumnalis*. Chromosoma. 1982;85:399–403.
96. Plowman AB, Bougourd SM. Selectively advantageous effects of B-chromosomes on germination behavior in *Allium schoenoprasum* L. Heredity. 1994;72:587–93.

97. Sammour RN, Hamoud MA, Haidar AS. Seed protein variation via relation to cytological features of some species in genus *Lotus* L. Cytologia. 1991;56(2):1231–9.
98. Latha KA, Pantulu JV, Krishna RRV. Effect of B chromosomes on leaf phenolic compound patterns in two west African populations of pearl mille (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.). Genet. and Breed. 1992;46(2):133–5.
99. Stark EA, Connerton I, Bennett ST, Barnes SR, Parker JS, Forster JW. Molecular analysis of the structure of the maize B-chromosome. Chromosome Res. 1996;4:15–23.
100. Page BT, Wanous MK, Birchler JA. Characterization of a maize chromosome 4 centromeric sequence: evidence for an evolutionary relationship with the B chromosome centromere. Genetics. 2001;159:291–301.
101. Cheng YM, Lin BY. Molecular organization of large fragments in the maize B-chromosome: indication of a novel repeat. Genetics. 2004;166:1947–63.
102. Alfentio MR., Birchler JA. Studies of B chromosome stability during development. Meydica. 1991;36(2):359–66.
103. Jamilena M, Ruiz Rejon C, Ruiz Rejon M. A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaries* B chromosome. J Cell Sci. 1994;107:703–8.
104. Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW. B-chromosome evolution. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2000;355:163–78.
105. Sapre AB, Deshpande DS. Spontaneous emergence of parents from the F1 interspecific hybrids of Coix L. J Hered. 1987;78(6):357–60.
106. McAllister BF, Werren JH. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. Chromosoma. 1997;106:243–53.
107. Ozkan H, Levy AA, Feldman M. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (Aegilops – Triticum) group. Plant Cell. 2001;13:1735–47.
108. Liu B, Wendel JF. Non-Mendelian phenomena in allopolyploid genome evolution. Curr. Genomics. 2002;3:489–506.

109. Седельникова ТС, Муратова ЕН, Пименов АВ, Ефремов СП. Кариологические особенности болотных и суходольных популяций *Picea obovata* в Западной Сибири. Ботанический журнал. 2004;89(5):718–33.
110. Владимирова ОС, Муратова ЕН. Кариологические особенности ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) в условиях антропогенного загрязнения г. Красноярска. Экологическая генетика. 2005;3(1):18–23.
111. Седельникова ТС, Пименов АВ. Анализ цитогенетических характеристик болотных и суходольных популяций видов *Pinaceae*. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2010;8:235–40.
112. Borisov JuM, Muratova EN. Population mobility of animal and plant B-chromosomes in regions subject to technogenic impact. Journ. of Siberian Federal University. Biology. 2010;3:146–58.
113. Седельникова ТС, Пименов АВ, Муратова ЕН. Хромосомные аномалии у хвойных в экстремальных экотопах. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2011;10:138–42.
114. Lia VV, Confalonieri VA, Poggio L. B chromosome polymorphism in maize landraces: adaptive *vs*. demographic hypothesis of clinal variation. Genetics. 2007;177: 895–904.
115. Tian B, Li H. Variation of B chromosome associated with tissue culture in wheat-rye cross. J Integr Plant Biol. 2009;51(9):834–9.
116. Кунах ВА. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro*. Физиология растений. 1999;46(6):919–30.
117. D'Amato F, Bennici A, Cionini PG, Baroncelli S, Lupi MC. Nuclear fragmentation followed by mitosis as mechanism for wide chromosome number variation in tissue cultures: its implications for plant regeneration. Plant Cell Cult.: Result and Perspect. 1980:67–72.
118. D'Amato F. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerantes. CRC Crit Rev Plant Sci. 1985;3(1):73–112.

119. Deumling B, Clermont L. Changes in DNA content and chromosome size during cell culture and plant regeneration of *Scilla siberica*: selective chromatin diminution in response to environmental conditions. Chromosoma. 1989;97:439–48.
120. Durrant A. The environmental induction of heritable changes in *Linum*. Heredity. 1962;17:27–61.
121. Cullis CA. Environmentally induced DNA changes in plants. CRC Crit Rev Plant Sci. 1983;1:117–31.
122. Cullis CA. Sequence variation and stress. In: Honn B, Dennis ES. (ed.). Genetic flux in plants. New York: Springer; 1985; p. 157–68.
123. Каллис ХА. Среда как генератор адаптивных изменений. В сб.: Современные концепции эволюционной генетики. Новосибирск: Ин-т цитологии и генетики СО РАН; 2000; с. 168–76.
124. Chen ZJ, Ni Z. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. Bioessays. 2006;28:240–52.
125. Moore DM. Chromosome numbers of Falkland Islands angiosperms. Brit Ant Surv Bull. 1967;14:69–82.
126. Alberdi M, Bravo LA., Gutierrez A, Gidekel M, Corcuera LJ. Ecophysilogy of Antarctic Vascular Plants. Physiol Plant. 2002;115(4):479–86.
127. Parnikoza IYu., Kozeretska IA, Kunakh VA. Vascular plants of the Maritime Antarctic: origin and adaptation. Am J Plant Sci. 2011;2:381–95.
128. Cantril DJ, Poole I. The vegetation of Antarctica through geological time. Cambridge: Cambridge University Press; 2012. 480 p.
129. Pointing SB., Büdel B, Convey P, Gillman LN, Körner C, Leuzinger S, Vincent WF. Biogeography of photoautotrophs in the high polar biome. Front Plant Sci [Internet]. 2015; 6(692):1-12. Available from: doi: 10.3389/fpls.2015.00692
130. John UP, Spangenberg G. Xenogenomics: genomic bioprospecting in indigenous and exotic plants through EST discovery, cDNA microarray-based

expression profiling and functional genomics. Comp Funct Genomics. 2005;6:230–5.

131. Lee J, Noh EK, Choi HS, Shin SC, Park H, Lee H. Transcriptome sequencing of the Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* Desv. under abiotic stress. Planta. 2013;237(3):823–36.
132. Parnikoza 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 Biol. 2015;38(9):1401–11.
133. Scientific Committee on Antarctic Research. Antarctic threshold – ecosystems resilience and adaptation (ANT-ERA). [Internet]. Cambridge, United Kingdom: Scientific Committee on Antarctic Research; 2017 [updated 1.09.2017; cited 24.09.2017]. Available from: http://www.scar.org/srp/ant-era
134. Parodi LR. Las gramıneas sudamericanas del ge´nero *Deschampsia*. Darwiniana. 1949;8:415–75.
135. Garsia-Suarez R, Alonso-Blanco C, Fernandez-Carvajal MC, Fernandez-Prieto JA, Roca F, Giraldez R. Diversity and systematics of *Deschampsia* sensu lato (*Poaceae*), inferred from karyotypes, protein electrophoresis, total genomic DNA hybridization and chloroplast DNA analysis. Plant Syst Evol. 1997;205:99–110.
136. Chiapella J. The *Deschampsia cespitosa* complex in central and north Europe: a morphological analysis. Bot J Linn Soc. 2000;134(4):495–512.
137. Chiapella J, Probatova N. The *Deschampsia caespitosa* complex (Poaceae: Aveneae) with special reference to Russia. Bot J Linn Soc. 2003;142(2): 213–28.
138. Frey L. Avenella – a genus of the Aveneae (Poaceae) worthy of recognition. Fragm Flor Geobot Suppl. 1999;7:27–32.
139. Chiapella J. A molecular phylogenetic study of Deschampsia (Poaceae: Aveneae) inferred from nuclear ITS and plastid trnL sequence data: support for the recognition of Avenella and Vahlodea. Taxon. 2007;56:55–64.

140. Greene DM, Holtom A. Studies in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. and *Deschampsia antarctica* Desv.: III. Distribution, habitats and performance in the Antarctic botanical zone. Br Antarct Surv Bull. 1971;26:1–29.
141. Alberdi M, Corcuera LJ. Cold acclimation in plants. Phytochemistry. 1991;30:3177–84.
142. Загричук ОМ, Герц АІ, Дробик НМ, Кунах ВА. Калюсогенез та регенерація рослин *Deschampsia antarctica* Desv. у культурі *in vitro*. Biotechnolog Acta. 2013;6(6):77–86.
143. Australian Antarctic Data Centre. Data management and spatial data services [Internet]. Australia: Australian Antarctic Data Centre;2017. Available from: https://data.aad.gov.au/aadc/biodiversity/taxon_data.cfm?taxon_id=101731
144. Romero M, Casanova A, Iturra G, Reyes A, Montenegro G, Alberdi M. Leaf anatomy of *Deschampsia antarctica* (Poaceae) from the Maritime Antarctic and its plastic response to changes in the growth conditions. Rev Chil Hist Natl. 1999;72:411.
145. Barcikowski A, Czaplewska J, Giełwanowska I, Loro P, Smyka J. *Deschampsia antarctica* (*Poaceae*) – the only native grass from Antarctica. In: Frey L. (ed.). Studies on grasses in Poland. Krakow: Institute of Botany, Polish Academy of Sciences; 2001; p. 367–77.
146. Пономарев АН, Демьянова ЕИ. Опыление. Жизнь растений. Под ред. акад. А.Л. Тахтаджяна. Москва: Просвещение. 1980; 430 с.
147. Hooker WJ. Icones plantarum, or figures with description of new and rare plants selected from the Kew Herbarium. London: Longman, Rees, Orme, Brown, Green & Longman; 1961; p. 1837.
148. Hegi G. Illustrierte Flora von Mittel-Europa: Spermatophyta. Angiospermae: Monocotyledones, Poaceae. Berlin: Paul Parey. 1987;6(4):904.
149. Gielwanowska I, Szczuka E, Bednara J, Gorecki R. Anatomical features and ultrastructure of *Deschampsia antarctica* (Poaceae) leaves from different growing habitats. Ann Bot. 2005;96(6):1109–19.

150. Giełwanowska I, Pastorczyk M, Kellmann-Sopyła W, Górniak D, Górecki R. Morphological and ultrastructural changes of organelles in leaf mesophyll cells of the Arctic and Antarctic plants of Poaceae family under cold influence. Arctic, Antarctic, and Alpine Research. 2015;47(1):17–25.
151. Кравець ОА, Таран НЮ, Стороженко ВО. Пластичність морфогенезу та особливості репродукції рослин *Colobanthus quitensis* і *Deschampsia antarctica* в Антарктичному регіоні. Український антарктичний журнал. 2011-2012;10-11:302–5.
152. Yudakova OI, Tyrnov VS, Kunakh VA, Kozeretska IA, Parnikoza IYu. Adaptation of the seed reproduction system to conditions of Maritime Antarctic in *Deschampsia antarctica* E. Desv. Russian Journal of Developmental Biology. 2016;47(3):138–46.
153. Fowbert JA, Smith RIL. Rapid population increases in native vascular plants in the Argentine Islands Antarctic Peninsula. Arctic and Alpine Research. 1994;26(3):290–6.
154. Smith RIL. The enigma of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* in Antarctica. In: Huiskes A.H.L. et al. (ed.). Antarctic Biology in a global context. Leiden: Backhuys; 2003; p. 234–9.
155. Ruhland CT, Day TA. Size and longevity of seed banks in Antarctica and the influence of ultraviolet-B radiation on survivorship, growth and pigment concentrations of *Colobanthus quitensis* seedlings. Environ Exper Bot. 2001;45(2):143–54.
156. Brochmann C, Steen SW. Sex and genes in the flora of Svalbard – implications for conservation biology and climate change. Det Norske Videnskaps–Akademi. I. Den Matematik. Naturvitenskapelige. Klasse, Skrifter, Ny serie. 1999; 38: 33–72.
157. Stenstrom A, Jonsson BO, Jonsdottir IS, Fagerstrom T, Augner M. Genetic variation and clonal diversity in four clonal sedges (Carex) along the Arctic coast of Eurasia. Mol Ecol. 2001;10:497–513.

158. Abbott RJ, Brochmann C. History and evolution of the arctic flora: in the footsteps of Eric Hultén. Mol Ecol. 2003;12:299–313.
159. Peat HJ, Clarke A, Convey P. Diversity and biogeography of the Antarctic flora. Journal of Biogeography. 2007;34:132–46.
160. Van der Wouw M, Van Dijk P, Huiskes ADHL. Regional genetic diversity patterns in Antarctic hairgrass (*Deschampsia antarctica* Desv.). J Biogeogr. 2007;35(2):365–76.
161. Le Corre V, Dumoulin-Lappegue S, Kerner A. Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petrea* (Matt.) Liebl.: the role of history and geography. Mol Ecol. 1997; 6(6):529–49.
162. Holderegger R, Stehlic I, Smith RIL, Abbott JR. Population of Antarctic hairgrass (*Deschampsia antarctica*) show low genetic diversity. Arctic, Antarctic and Alpine Research. 2003;35(2):214–7.
163. Convey P. Reproduction of Antarctic flowering plants. Antarctic Science. 1996; 8(2):127–34.
164. Edwards JA. Studies in *Colobanthus quitensis* (Kunth.) Bartl. and *Deschampsia Antarctica* Desv.: VI. Reproductive Performance on Signy Island. Brit Antarct Surv Bull. 1974;28:67–86.
165. Coleman M, Abbott RJ. Possible causes of morphological variation in an endemic Moroccan groundsel (*Senecio leucanthemifolius* var. *casablancae*): evidence from chloroplast DNA and random amplified polymorphic DNA markers. Mol Ecol. 2003;12:423–34.
166. Lian CL, Oishi R, Miyashita N, Nara K, Nakaya H, Wu BY, Zhou ZH, et al. Genetic structure and reproduction dynamics of *Salix reinii* during primary succession on Mount Fuji, as revealed by nuclear and chloroplast microsatellite analysis. Mol Ecol. 2003;12:609–18.
167. Clegg SM, Degnan SM, Kikkawa J, Moritz C, Estoup A, Owens IPF. Genetic consequences of sequential founder events by an island-colonizing bird. Proc Nat Acad Sci U S A. 2002;99:8127–32.

168. Chwedorzewska KJ, Bednarek PT. Genetic variability in the antarctic hairgrass *Deschampsia antarctica* Desv. from Maritime Antarctic and subantarctic sites. Pol J Ecol. 2008; 56(2):209–16.
169. Vera ML. Colonization and demographic structure of *Dechampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis* along an altitudinal gradient on Livingston Island, South Shetland Islands, Antarctica. Polar Res. 2011;30(7146). Available from: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/polar.v30i0.7146
170. Volkov RA, Kozeretska IA, Kyryachenko SS, Andreev IO, Maidanyuk DN, Parnikoza IYu, Kunakh VA. Molecular evolution and variability of ITS1-ITS2 in populations of *Deschampsia antarctica* from two regions of the Maritime Antarctic. Polar Sci. 2010;4(3):469–78.
171. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. Current Opinion in Plant Biol. 2003;6(5):410–7.
172. Kreps JA, Wu Y, Chang H-S, Zhu T, Wang X, Harper JF. Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. Plant Physiol. 2002;130(4):2129–41.
173. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol Biochem. 2010;48(12):909–30.
174. Kappen L. Plant activity under snow and ice, with particular reference to lichens. Arctic. 1993;46(4):297–302.
175. Xiong FS, Ruhland CT, Day TA. Photosynthetic temperature response of the Antarctic vascular plants *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica*. Physiol Plant. 1999;106:276–86.
176. Kappen L, Schroeter B. Plants and lichens in the Antarctic, their way of life and their relevance to soil formation. In: Beyer L. and Bolter M. (ed.). Geoecology of Antarctic ice-free coastal landscapes. Berlin: Springler-Verlag; 2002; p. 327–74.

177. Колесниченко АВ, Войников ВК. Белки низькотемпературного стресса растений. Иркутск: Арт-Пресс; 2003. 196 с.
178. Olave-Concha N, Ruiz-Lara S, Munoz X, Bravo LA, Corcuera LJ. Accumulation of dehydrin transcripts and protein in response to abiotic stresses in *Deschampsia antarctica*. Antarctic Sci. 2004;16(2):175–84.
179. Reyes MA, Corcuera LJ, Cardemil L. Accumulation of HSP70 in *Deschampsia antarctica* Desv. leaves under thermal stress. Antarctic Sci. 2003;15(3):345–52.
180. Doucet CJ, Byass L, Elias L, Worrall D, Smallwood M, Bowles DJ. Distribution and characterization of recrystallization inhibitor activity in plant and lichen species from the UK and Maritime Antarctic. Cryobiology. 2000;40(3):218–27.
181. John UP, Polotnianka RM, Sivakumaran KA, Chew O, Mackin L, Kuiper MJ, Talbot JP, Nugent DG, Mautord J, Schrauf GE, Spangenberg GC. Ice recrystallization inhibition proteins (IRIPs) and freeze tolerance in the cryophilic Antarctic hairgrass *Deschampsia antarctica* Desv. Plant Cell Envir. 2009;32(4):336–48.
182. Gidekel M, Destefano-Beltrán L, García P, Mujica L, Leal P, Cuba M, Fuentes L, et al. Identification and characterization of three novel cold acclimation-responsive genes from the extremophile hairgrass *Deschampsia antarctica* Desv. Extremophiles. 2003;7(6):459–69.
183. Pérez-Torres E, García A, Dinamarca J, Alberdi M, Gutiérrez A, Gidekel M, Ivanov AG, Hüner NPA, Corcuera LJ, Bravo LA. The role of photochemical quenching and antioxidants in photoprotection of *Deschampsia antarctica*. Funct Plant Biol. 2004;31(7):731–41.
184. Montiel PO. Soluble carbohydrates (trehalose in particular) and cryoprotection in polar biota. Cryoletters. 2000;21(2):83–90.
185. Bravo UA., Ulloa N, Zuniga GE, Casanova A, Corcuera LJ, Alberdi M. Cold resistance in Antarctic angiosperm. Physiol Plant. 2001;111(1):55–65.

186. Taran NYu, Okanenko OA, Ozheredova IP, Kozeretska IA, Svetlova NB. The conposition of lipid and pigment-protein complexes of photosynthetic membranes in *Deschampsia antarctica* Desv. Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. 2009;2:173–8.
187. Svyetlova NB, Okanenko AA, Taran NYu. Impact of ultraviolet radiation on *Deschampsia antarctica* Desv. one of vascular plant species in Antarctica. In: Proceedings of the SCAR/IASC IPY Open Science Conference; 8-11 July 2008; St. Petersburg, Russia; 2008; p. 197.
188. Lütz C, Blassing M, Remias D. Different flavanoid patterns in *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis* from the Marine Antarctic. In: Wiencke C. *et al.* (ed.). Reports on polar and marine research. The Antarctic ecosystem of potter cove King George Island. 2008;571:192–198.
189. Steinitz-Sears LM. Chromosome studies in *Arabidopsis thaliana*. Genetics. 1963;48:483–90.
190. Heslop-Harrison JS., Maluszynska J. The molecular cytogenetics of Arabidopsis. In: Meyerowitz E.M., Sommerville C.R. (ed.). Arabidopsis. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994; p. 63–87.
191. Soltis PS. Ancient and recent polyploidy in angiosperms. New Phytol. 2005;166(1):5–8.
192. Murray BG, Weir IE, Ferguson AR, de Lange PJ. Variation in DNA C-value and haploid genome size in New Zealand native grasses. New Zealand J Bot. 2003;41:63–69.
193. Barkworth ME, Cutler R, Rollo J, Jacobs SWL, Rashid A. Morphological identification of genomic genera in the perennial *Triticeae* (*Poaceae*). Breed Sci (Special Edition). 2009;59:561–70.
194. Soreng RJ, Peterson PM, Romaschenko K, Davidse G, Zuloaga FO, Judziewicz EJ, Filgueiras TS, Davis JI, Morrone O. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). J Syst Evol. 2015;53:117–137.

195. Nkongolo KK, Deck A, Michael P. Molecular and cytological analyses of *Deschampsia caespitosa* populations from Northern Ontario (Canada). Genome. 2001;44:818–25.
196. Kawano S. Cytogeography and evolution of the *Deschampsia caespitosa* complex. Can J Bot. 1963;41:719–42.
197. Cardone S, Sawatani P, Rush P, Garcha A, Poggio L., Schrauf G. Karyological studies in *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*). Polar Biol. 2009;32:427–33.
198. Seledets VP, Probatova NS. Ecological areal and some problems of differentiation in the family Poaceae from the russian far east. Prob Evol. 2003;5:220.
199. Gonzalez ML, Urdampilleta JD, Fasanella M, Premoli AC, Chiapella JO. Distribution of rDNA and polyploidy in *Deschampsia antarctica* E. Desv. in Antarctic and Patagonic populations. Polar Biol. 2016;39:1663–77.
200. Stebbins GL. Variation and evolution in plants. New York: Columbia University Press; 1950.
201. Brochman C, Brysting AK, Alsos IG, Borgen L, Grundt HH, Scheen A-C, Elven R. Polyploidy in arctic plants. Biol J Linn Soc. 2004;82:521–36.
202. Загричук ОМ, Дробик НМ, Козерецька ІА, Парнікоза ІЮ, Кунах ВА. Введення в культуру *in vitro Deschampsia antartctica* Desv. (Poaceae) з двох районів Прибережної Антарктики. Український антарктичний журнал. 2011/2012;10–11:289–295.
203. Murasige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 1962;15(3):473–97.
204. Gamborg OL, Eveleigh DE. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley. Can J Biochem. 1968;46(5):417–21.
205. Osorio J, Calderon C, Gutierrez-Moraga A, Gidekel M. The effect of growth regulators and scanning electron microscope study of somatic embryogenesis in Antarctic hairgrass (*Deschampsia antarctica* Desv.). Polar Biol. 2014;37:217–25.

206. Абрамова ЗВ, Карлинский ОА. Руководство к практическим занятиям по генетике. Ленинград: Колос; 1968. 191 с.
207. Паушева ЗП. Практикум по цитологии растений. Москва: Колос; 1970. 254 с.
208. Gall JG., Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc Natl Acad Sci U S A. 1969;63(2):378–83.
209. Schwarzacher T, Heslop-Harrison P. Practical *in situ* hybridization. UK: BIOS Scientific Publishers Limited; 2000. 203 p.
210. Maluszynska J. *In situ* hybridization in plants – methods and application. In: Jain S.M., Brar D.S., Ahloowalia B.S. (ed.). Molecular techniques in crop improvement. Dordrecht: Springer; 2002; p. 299–326.
211. O'Connor C. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Nature Educ. 2008;1(1):171.
212. Jenkins G, Hasterok R. BAC 'landing' on chromosomes of *Brachypodium distachyon* for comparative genome alignment. Nature Protoc. 2007; 2(1):88-98.
213. Gerlach W., Dyer T. Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. Nucleic Acid Res. 1980;8(21):4851–65.
214. Hajdera I, Siwinska D, Hasterok R, Maluszynska J. Molecular cytogenetic analysis of genome structure in *Lupinus angustifolius* and *Lupinus cosentinii*. Theor Appl Genet. 2003;107(6):988-96.
215. Aragón-Alcaide L, Miller T, Schwarzacher T, Reader S, Moore G. A cereal centromeric sequence. Chromosoma. 1996;105(5):261–68.
216. Unfried I, Gruendler P. Nucleotide sequence of the 5.8 S and 25S rRNA genes and of the internal transcribed spacers from *Arabidopsis thaliana*. Nucleic Acid Res. 1990;18(13):4011.
217. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation of fresh leaf tissue. Phytochem Bull. 1987;19:11–15.

218. Brody JR, Kern SE. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. Anal Biochem. 2004;333(1):1–13.
219. Маниатис Т, Фрич Э, Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Москва: Мир; 1984. 480 с.
220. Плохинский НА. Биометрия. 2-е изд. Москва: МГУ; 1970. 367 с.
221. Schluter PM., Stephen AH. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. Mol Ecol. 2006;6(2):569–72.
222. Щапова АИ. Эволюция базового числа хромосом в семействе Злаковых (Poaceae Barnh.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011;15(4):769–80.
223. Родионов АВ, Коцеруба ВВ, Ким ЕС, Пунина ЕО, Носов НН. Эволюция геномов и хромосомных наборов злаков. Цитология. 2013;55(4):225–229.
224. Alberts F. Kariologische und genomatische Veränderungen innerhalb der Gräser Subtriben Aristaveninae und Airinae. Ber Dtsch Bot Ges. 1978;91:693–7.
225. Nygren A. Studies on vivipary in the genus *Deschampsia*. Hereditas. 1949;35(1):27–32.
226. Козыренко ММ, Артюкова ЕВ, Лауве ЛС, Болтенков ЕВ. Анализ генетической изменчивости каллусных культур некоторых видов рода *Iris* L. Биотехнология. 2002;4:38–48.
227. Cai ZQ., Zhang T, Jian HY. Chromosome number variation in a promising oilseed woody crop *Plukenetia volubilis* L. (*Euphorbiaceae*). Caryologia. 2013;66(1):54–58.
228. Zhang X-H, da Silva JAT, Ma G-H. Karyotype analysis of *Santalum album* L. Caryologia. 2010; 63(2):142–8.
229. Snowdon RJ. Cytogenetics and genome analysis in *Brassica crops*. Chromosome Res. 2007;15:85–95.
230. Kunakh VA, Adonin VI, Ozheredov SP, Blyum YaB. Mixoploidy in wild and cultivated species of *Cruciferae* capable of hybridizing with rapeseed *Brassica napus*. Cytology and Genetics. 2008;42(3):204–9.

231. Ockendon DJ. The ploidy of plants obtained from anther culture of cauliflowers *(Brassica oleracea* var. *botrytis)*. Ann Appl Biol. 2008;113(2):319–25.
232. Joachimiak A, Kula A, Sliwinska E, Sobieszczańska A. C-banding and nuclear DNA amount in six *Bromus* species. Acta Biol Cracov Ser Bot. 2001;43:105–15.
233. Седельникова ТС, Пименов АВ, Ташев АН, Ефремова ТТ. Числа хромосом интродуцированных и автохтонных видов семейства *Cupressaceae*. Автохтонні та інтродуковані рослини. 2013;9:122–5.
234. Swift H. The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. Proc Nat Acad Sci U S A. 1950; 36(11):643–54.
235. Bennett MD, Leitch IJ. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrows. Ann Bot. 2011;107(3):467–590.
236. Бадаева ЕД, Салина ЕА. Структура генома и хромосомный анализ растений. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17(4/2):1017–43.
237. Bennett M, Smith J., Smith RL. DNA amounts of angiosperms from the Antarctic and South Georgia. Environ Experim Bot. 1982;22(3):307–18.
238. Murray B, De Lange P, Ferguson A. Nuclear DNA variation, chromosome numbers and polyploidy in the endemic and indigenous grass flora of New Zealand. Ann Bot. 2005;96(7):1293–1305.
239. Andreev IO, Spiridonova EV, Kyryachenko SS, Parnikoza IYu, Maidanyuk DN, Volkov RA, Kozeretska IA, Kunakh VA. Population-genetic analysis of *Deschampsia antarctica* from two regions of maritime antarctica. Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2010;65(4):208–10.
240. Nevo EE. Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(11):6233–40.
241. Roman B, Hernandez R, Pujadas-Salva AJ. Genetic diversity in two variants of *Orobanche gracilis* Sm. [var. *gracilis* and *deludens* (Beck) A. Pujadas]

(*Orobanchaceae*) fro different regions of Spain. Electron J Biotechnol. 2007;10(2):221–29.

242. Ward S. Genetic analysis of invasive plant populations at different spatial scales. Biol Invas. 2006;8(3):541–52.
243. Pruitt RE., Meyerowitz EM. Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana*. J Mol Biol. 1986;187(2):169–83.
244. Copenhaver GP, Pikaard CS. Two-dimensional RFLP analyses reveal megabase-sized clusters of rRNA gene variants in *Arabidopsis thaliana*, suggesting local spreading of variants as the mode for gene homogenization during concerted evolution. Plant J. 1996;9(2):273–82.
245. Doudrick RL, Heslop-Harrison JS, Nelson CD, Schmidt T, Nance WL, Schwarzacher T. Karyotype of slash pine (*Pinus elliottii* var. *elliottii*) using patterns of fluorescence *in situ* hybridization and fluorochrome banding. *J Hered*. 1995;86(4):289–96.
246. Winterfeld G, Roser M. Disposition of ribosomal DNAs in the chromosomes of parenial oats (Poaceae: Aveneae). Bot J Linn Soc. 2007;155:193–210.
247. Houben A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S, Timmis JN. Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. Cell Mol Life Sci. 2014;71:467–78.
248. Rothera SL, Davy AJ. Polyploidy and habitat differentiation in *Deschampsia cespitosa*. New Phytol. 1986;102(3):449–67.
249. Caetano-Anollés G. High genome-wide mutation rates in vegetatively propagated bermudagrass. Mol Ecol. 1999;8:1211–21.
250. Bhatia R, Singh KP, Sharma TR, Jhang T. Evaluation of the genetic fidelity of *in vitro*-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii Bolus*) using DNA-based markers. Plant Cell Tiss Organ Cult. 2011;104:131–135.
251. Joshi P, Dhawan V. Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay. Biol Plant. 2007;51(1):22–26.
252. Gantait S, Mandal N, Bhattacharyya S, Das PK. Determination of genetic

integrity in long-term micropropogated plantlets of *Allium ampeloprasum* L. using ISSR markers. *Biotechnology*. 2010; 9(2):218–23.

253. Ray T, Dutta I, Saha P, Das S, Roy SC. Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell Tiss Organ Cult. 2006;85:11–21.
254. Gajdošová A, Ostrolucká M G, Libiaková G, Ondrušková E, Šimala D. Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture *in vitro*. J Fruit Ornam Plant Res. 2006;14(1):103–19.
255. Verma N, Koche V, Tiwari KL, Mishra SK. Random amplified polymorphic DNA analysis detects variation in a micropropagated clone of *Trichodesma indicum* (L.) R. Br. African J Biotechnol. 2010;9(28):4322–25.
256. Soni M, Kaur R. Rapid *in vitro* propagation, conservation and analysis of genetic stability of Viola pilosa. Physiol Mol Biol Plants. 2014;20(1):95–101.
257. Mozafari AA, Vafaee Y, Karami E. *In vitro* propagation and conservation of *Satureja avromanica* Maroofi – an indigenous threatened medicinal plant of Iran. Physiol Mol Biol Plants. 2015;21(3):433–39.
258. Zimmerman L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. Plant Cell. 1993;5:1411–23.
259. Neelakandan AK, Wang K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. Plant Cell Rep. 2012;31:597–620.
260. Зосимович ВП, Левенко БА, Кунах ВА, Юркова ГН. Цитогенетическое изучение каллусных тканей томата от растений различной плоидности. В: Культура клеток растений. Киев: Наук. Думка; 1978; с. 97–104.
261. Fras A, Maluszynska J. Regeneration of diploid and tetraploid plants of Arabidopsis thaliana via callus. Acta Biol Cracov Bot. 2003;45(2):145–52.
262. Cuba M, Gutierrez-Moraga A, Butendieck B, Giedekel M. Micropropagation of *Deschampsia antarctica* – a frost-resistant Antarctic plant. Antarct Sci.

2005;17(1):69–70.

263. Do G-S, Seo B-B, Ko J-M, Lee S-H, Pak J-H, Kim I-S, Song S-D. Analysis of somaclonal variation through tissue culture and chromosomal localization of rDNA sites by fluorescent *in situ* hybridization in wild *Allium tuberosum* and a regenerated variant. Plant Cell Tiss Organ Cult. 1999;57(113). Available from: doi:10.1023/A:1006377415723.

264. Козыренко ММ, Артюкова ЕВ, Болтенков ЕВ, Лауве ЛС. Сомаклональная изменчивость *Iris pseudacorus* L. по данным RAPD- и цитогенетического анали за. Биотехнология. 2004; 2:13–23.

265. Осипова ЕС. Вариабельность ДНК-маркеров (RAPD, ISSR) при сомаклональной изменчивости кукурузы [Автореферат дисертации канд. биол. наук]. Москва; 2003. 27 с.

266. Landsman J., Uhrig H. Somaclonal variation in *Solanum tuberosum*, detected at the molecular level. Theor Appl Genet. 1985;71:500–1.

267. Secretariat of the Antarctic Treaty. The Protocol on Environmental Protection to the Antarctic Treaty [Internet]. Buenos Aires, Argentina; 1.09.2004 [updated 24.10.2013; cited 24.09.2017]. Available from: http://www.ats.aq/r/ep_faflo.htm

268. Amosova AA, Bolsheva NL, Samatadze TE, Twardovska MO, Zoshchuk SA, Andreev IO, Badaeva ED, Kunakh VA, Muravenko OV. Molecular cytogenetic analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae), Maritime Antarctic. PLoS One. 2015;10(9):1–17. Available from: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138878

269. Amosova AV, Bolsheva NL, Zoshchuk SA, Twardowska MO, Yurkevich OYu, Andreev IO, Samatadze TE, Badaeva ED, Kunakh VA, Muravenko OV. Comparative molecular cytogenetic characterization of seven Deschampsia (Poaceae) species. PLoS One. 2017; 12(4):1-17. Available from: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175760

ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **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 *Descampsia antarctica* Desv. from the Argentine Islands of the Maritime Antarctic region // Ukrainian Antarctic Journal. – 2014. – № 13. – P. 185-191.
2. Твардовська М.О., Андрєєв І.О., Амосова А.В., Спірідонова К.В., **Навроцька Д.О.**, Саматадзе Т.Е., Зощук С.А., Муравенко О.В., Кунах В.А. Вивчення геномів рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з різних локалітетів Прибережної Антарктики за допомогою хромосомних та молекулярних маркерів // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2014. – Т. 14. – С. 133-137.
3. **Навроцька Д.О.**, Твардовська М.О., Андрєєв І.О., Загричук О.М., Парнікоза І.Ю., Дробик Н.М., Кунах В.А. Хромосомний поліморфізм рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з району Аргентинських островів (Прибережна Антарктика) // Вісник Українського товариства генетиків та селекціонерів. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 184-190.
4. Спірідонова К.В. , Андрєєв І.О. , Загричук 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. 36-43.
5. Кунах В.А., **Навроцька Д.О.**, Твардовська М.О., Андрєєв І.О. Особливості хромосомної мінливості в культурі тканин рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з різним числом хромосом // Вісник

Українського товариства генетиків та селекціонерів. – 2016. – Т. 14, № 1 – С. 36-43.

6. Парнікоза І.Ю., Мірюта Н.Ю., Ройек М., Бетєхтін А.А., Пороннік О.О., Мирюта Г.Ю., **Навроцька Д.О.**, Хастерок Р., Кунах В.А. Рослини *Deschampsia antarctica* E. Desv. з різним числом хромосом в умовах вирощування *in vitro*. Звязок розміру геному та двох показників пристосовуваності // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2017. – Т. 20 – С. 304-309.
7. **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. Comprehensive characterization of cultivated *in vitro Deschampsia antarctica* E. Desv. plants with different chromosome numbers // Cytology and Genetics. – 2017. – Vol. 51, № 6. – P. 422-431.
8. **Навроцька Д.О.**, Твардовська М.О., Кунах В.А. Молекулярно-цитогенетичний аналіз рослин *Deschampsia antarctica* з різних локалітетів Прибережної Антарктики // Матеріали І Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю “Сучасні проблеми викладання та наукових досліджень у ВНЗ України”. – Дніпропетровськ, Україна. – 2014. – С. 42-44.
9. **Navrotska D.O.**, Twardovska M.O., Andreev I.O., Betekhtin A.A., Hasterok R., Kunakh V.A. Cytogenetic and molecular analisys of *Deschampsia antarctica* Desv. from the Maritime Antarctic // Abstract of 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.
10. Kunakh V., **Navrotska D.**, Twardovska M., Hasterok R., Betekhtin A., Andreev I., Parnikoza I. Cytogenetic features of *Deschampsia antarctica* Desv. plants in different microclimate condition of the Argentine Islands of Maritime Antarctic // Materials of 26-th International Congress on Polar

Research “High latitude and high mountains: driver of or driven by global change?”. – Munich, Germany. – 2015. – P. 92.

11. **Navrotska D.O.**, Twardovska M.O., Andreev I.O., Betekhtin A.A., Hasterok R., Kunakh V.A. Karyotypic variation in *Deschampsia antarctica* Desv. plants and tissue culture // Abstract of the 5-th International Conference for Young Scientists “CYS-2015”. – Kyiv, Ukraine. – 2015. – P. 89.
12. **Navrotska D.O.**, Twardovska M.O., Andreev I.O., Kunakh V.A. Cytogenetic studies of *Deschampsia antarctica* Desv. tissue culture // Materials of the Ukrainian Society of Cell Biology International Conference “Advances in cell biology and biotechnology”. – Lviv, Ukraine. – 2015. – P. 127.
13. **Navrotska D.**, Andreev I., Twardovska M., Kunakh V. Genome variability of *Deschampsia antarctica* Desv. plants with different chromosome numbers in tissue culture // Materials of the X Parnas Conference. Young Scientist Forum “Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine”. – Wroclaw, Poland. – 2016. – Vol.63, Sup.1. – P.14.
14. Олійник М., **Навроцька Д.**, Пороннік О., Парнікоза І. Цитологічний аналіз *Deschampsia antarctica* Desv. з острова Вінтер (Прибережна Антарктика) // Матеріали XII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і Поступ Біології”. – Львів, Україна. – 2016. – С. 131-132.
15. **Navrotska D.**, Twardovska M., Andreev I., Parnikoza I., Betekhtin A., Hasterok R., Kunakh V. Pecularities of genome variability of antarctic hairgrass *Deschampsia antarctica* Desv. from the Maritime Antarctic // Materials of the 41-st FEBS Congress “Molecular and System Biology for a Better Life”. – Ephesus/ Kusadasi, Turkey. – 2016. – Vol. 283, Sup.1. – P. 335.
16. **Navrotska D.**, Andreev I., Kunakh V. Research of genome plasticity the *Deschampsia antarctica* Desv. plants from populations the Argentine Islands region of Maritime Antarctic // Abstract of the Mind the Gap 5 Conference

"Bridging the gap between theoretical and empirical population genetics", Vienna, Austria. – 2016. – P. 12.

17. **Навроцька Д.О.**, Андрєєв І.О., Парнікоза І.Ю., Пороннік О.О., Кунах В.А. Каріологічна гетерогенність рослин *Deschampsia antarctica* E. Desv. в регіоні Аргентинських островів Морської Антарктики // Матеріали VIII Міжнародної Антарктичної Конференції, присвяченої 25-річчю приєднання України до договору про Антарктикую – Київ, Україна. – 2017. – С. 80-81.
18. Спірідонова К.В., Андрєєв І.О., **Навроцька Д.О.**, Загричук О.М., Дробик Н.М., Кунах В.А. Цито- та молекулярно-генетичні дослідження мікроклонально розмножених рослин *Deschampsia antarctica* E. Desv. за тривалого культивування *in vitro* // Матеріали VIII Міжнародної Антарктичної Конференції, присвяченої 25-річчю приєднання України до договору про Антарктику. – Київ, Україна. – 2017. – С. 98-99.
19. **Навроцька Д.О.**, Андрєєв І.О., Кунах В.А. Цитогенетичне дослідження рослин-регенерантів *Deschampsia antarctica* E. Desv. // Матеріали міжнародної конференції молодих учених "Актуальні проблеми ботаніки та екології". – Луцьк, Україна. – 2017. – С. 77.
20. **Navrotska D.**, Andreev I., Betekhtin A., Rojek M., Hasterok R., Kunakh V. Peculiarities of genome variability of *Deschampsia antarctica* E. Desv. from the marginal populations of Maritime Antarctic // Abstract of the EMBO Workshop "Evolution in the time of genome architecture". – Naples, Italy. – 2017. – P. 36.

ДОДАТОК Б

ХРОМОСОМНІ ЧИСЛА ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *DESCHAMPSIA*

Таблиця Б.1

Хромосомні числа представників роду *Deschampsia*

Вид	Основний набір хромосом	Посилання
1	2	3
D.alpina (ssp) [a,b]	52	Löve, Löve (1975)
	50	Engelskjon (1979)
	39,49, 52	Alberts (1980)
D.antarctica[b]	26	Cardone (2009)
D. argentea – maderensis	26	Dalgaard (1991)
D. antropurpurea	14	Alberts (1972)
D. beringensis[a]	26,42	Sokolovskaya, Probatova (1975)
D.borealis[a]	26, 28	Tzvelev (1976)
D. bottnica[a,b]	26	Alberts (1980)
D. brevifolia[a]	52	Krogulevich (1976)
	52	Petrovsky, Zhukova (1981)
D. caespitosa[b]	26 (0-2B)	Pashuk (1980)
	26, 52	Stoeva (1982)
	26	Beuzenberg, Hair (1983)
	26	Strid and Franzen (1983)
D. caespitosa[b]	26, 52	Rhotera, Davy (1986)
D. chapmaniib	26	Edgar (1993)
D. danthonioidesb	26	Fedorov (1969)
D. elongatab	26	Fedorov (1969)
D. festucaelifolia[a]	27, 28	Osada (1993)
D. flexuosa	28	Stoeva, Arohonka (1982)
	28	Strid, Franzen 1983
	26	Druskovic, Lovka (1995)
	28	Petrova, Stoyanova (1998)
D.glauca[a]	26, 52	Zhukova, Petrovsky (1975, 1976)

1	2	3
D. komarovi	52	Petrovsky, Zhukova (1981)
	26	Zhukova (1980)
D. macrothyrsa[a]	26	Probatova (1984)
D. media	26	Alberts (1980)
	28	Kerguelen (1975)
D. mildbraedii	52	Morton (1993)
D. obensis	52	Zhukova, Petrovsky (1980)
D. orientalisa	52	Petrovsky, Zhukova (1981)
	26	Löve, Löve (1981)
D. parviflora[a]	26, 28	Kerguelén (1993)
D. pamirica[a]	26	
D. pumila	26	Dalgaard (1989)
D. refracta	26	Alberts (1980)
D. rhenana[a]	49–52	Alberts (1980)
D. setaceae	14	Hubbard (1984)
	14	Lövkvist, Hultgard (1999)
D. sukatschewii	52	Zhukova (1980)
D. tenella[b]	26	Edgar, Connor (2000)
D. wibeliana	26	Alberts (1980)
	26 (0-5B)	Mesíček (1992)

Примітки: [a] – вказується також як підвид *D.caespitoza*, [b] – види, згруповані до роду *Deshampsia*