

КРИЖАНОВСЬКА М. М.^{1✉}, ГОЛУБ Н. Я.², ПРОКОП'ЯК М. З.¹, ГОЛІНЕЙ Г. М.¹¹ Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Україна, 46027, м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2, e-mail: kryganovska@chem-bio.com.ua² Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна, 79000, м. Львів, вул. Університетська, 1
✉ kryganovska@chem-bio.com.ua

ВИВЧЕННЯ ВНУТРІШНЬОПОПУЛЯЦІЙНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ *TRIFOLIUM REPENS* L. М. ЛАНІВЦІ В УМОВАХ АНТРОПОГЕННОГО НАВАНТАЖЕННЯ РІЗНОЇ ІНТЕНСИВНОСТІ

Мета. Вивчити фенотиповий поліморфізм у популяціях *Trifolium repens* L. з різним антропогенним навантаженням. **Методи.** Кількісний підрахунок листків конюшини повзучої за наявністю - відсутністю сивої плями; ідентифікація фенотипу та генотипу рослини відповідно до малюнка сивої плями; аналіз фенотипового різноманіття з вивченням частки рідкісних фенотипів; знаходження індексу співвідношення фенотипів. **Результати.** На пасовищній ділянці виявлено 4 фенотипи, з-поміж яких переважали рослини без сивої плями з частотою трапляння 56,2 %. На рослини з повною плямою припадало 27,5 %, плямою з розривом – 15,4 %, з центральною крапкою – 2,2 %. Гетерозиготні рослини були відсутні. У центральній частині міста виявлено 7 генотипів, з-поміж яких спостерігалось значне зменшення рецесивних гомозигот (на 43,6 %) та збільшення частоти генотипів VV (на 15,2 %) і $V^H V^H$ (на 21,2 %). На долю гетерозигот припадало 1,3–3,0 %. Показник внутрішньопопуляційної різноманітності був найвищим з-поміж досліджуваних територій і становив 5,1. На ділянці поблизу автодороги Тернопіль–Ланівці встановлено наявність 6 генотипів, з-поміж яких рослини без плями (vv) та з повною плямою (VV) траплялися з однаковою частотою – 34–35 %. Значну частину (20,4 %) становили рослини з повною високою плямою ($V^H V^H$). Інші фенотипи займали 10 %. **Висновки.** У популяціях, які знаходяться на екологічно забруднених і антропогенно навантажених територіях, за впливу мутаційного процесу і природного добору відбувається розширення наборів алелей і виникають специфічні фенотипи. У популяції, де відсутній негативний вплив антропогенних факторів, спостерігається зниження поліморфізму і підвищення частоти окремих генотипів (vv, VV).

Ключові слова: конюшина повзуча, фенотип листка, внутрішньопопуляційний поліморфізм, множинний алелізм, біоіндикація, антропогенне навантаження.

Генетичними особливостями популяції є її генетична однорідність (популяція утворена особинами одного виду, які мають однаковий набір генів) і генетична різноманітність, яка полягає у тому, що ген може бути представлений різними алелями у різній кількості. Проявом генетичної гетерогенності і однією з важливих особливостей генетичної структури природних популяцій є внутрішньопопуляційний поліморфізм, тобто тривале співіснування в ній двох або більше генетично різних форм [1, 2]. Поліморфізм популяцій може бути зумовлений дією природного відбору, який ґрунтується на перевазі гетерозиготних особин, або адаптивно перебудовує генетичну структуру популяцій у відповідь на зміни зовнішніх факторів [3]. Генетична різноманітність є важливим компонентом генетичної характеристики популяції і має велике значення для її екологічної пластичності. Для аналізу генетичного поліморфізму застосовують різні типи маркерів: морфологічні ознаки (фени), біохімічні маркери, імуногенетичні, молекулярні (ДНК-маркери). Одним із прикладів поліморфізму моногенного успадкування є наявність - відсутність сивого малюнка на листках конюшини повзучої.

Конюшина біла, або повзуча (*Trifolium repens* L.) – багаторічна трав'яниста рослина родини Бобові (Fabaceae). Цей вид поширений на луках і полях, а також трапляється у водоймах і вздовж доріг, на пасовищах, поруч із житловими будівлями. *T. repens* вважається бур'яном, оскільки засмічує посіви культурних рослин. Конюшина повзуча є світлолюбною, вологолюбною і морозостійкою рослиною, яка

добре розвивається на різних ґрунтах і не вимоглива до їх складу [4]. Екологічною особливістю конюшини є хороша адаптація до великого діапазону абіотичних умов, у тому числі й екстремальних, що сприяє її широкому поширенню на забруднених територіях. Конюшина не витримує конкуренції з іншими видами, проте може рости на ділянках, які перебувають під постійним антропогенним навантаженням. Вона відносно стійка до механічних пошкоджень, перш за все до витоптування [1, 5].

Зображення сивого малюнка (плями) у *T. repens* на листовій пластинці може відрізнятися розташуванням, інтенсивністю прояву, розміром. Доведено, що наявність сивої плями на листку та її різноманітність є домінантною ознакою і визначається серією множинного алелізму гена *V*. Алелі цієї серії знаходяться в різних відношеннях один з одним за мірою домінування. Алель *v* (відсутність плями) рецесивна щодо всіх інших алелей (*V*, *V^H*, *V^B*, *V^{Bh}*, *V^P*, *V^F* і *V^S*). Усі без винятку алелі гена *V* порушують нормальний розвиток хлорофілу в палісадних клітинах світлої зони листка *T. repens*. Це спричинює скорочення в них кількості хлоропластів аж до їх повної відсутності, а також сприяє скороченню обсягів палісадних клітин, збільшенню простору між ними і більш ранній загибелі клітин [6]. Спадковий характер такого порушення для конюшини був доведений на молекулярно-генетичному рівні із застосуванням методу полімеразної ланцюгової реакції [7].

Фенетичний підхід до вивчення популяцій залишається актуальним у наш час, оскільки молекулярні методи вимагають значних витрат часу і ресурсів й інколи для отримання відповідей у галузі популяційної генетики не є необ-

хідними. Зміна частот фенів пов'язана як з особливостями біології конкретного виду, так і з впливом факторів зовнішнього середовища. Значне поширення конюшини повзучої в досліджуваних біоценозах, велика кількість і доступність для відбору проб дозволяють використовувати цю рослину як об'єкт біоіндикації стану навколишнього середовища. Мета роботи – дослідити внутрішньопопуляційний поліморфізм за ознакою наявності і різноманітності форми сивої плями на листках *T. repens* у різних екологічних умовах у м. Ланівці (Тернопільська обл.) та його околицях.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження обрано дикорослі рослини із популяцій *T. repens*, які росли в аналогічних еколого-кліматичних умовах, але з різним ступенем антропогенного навантаження. Збір листків конюшини повзучої проводили у період масового її цвітіння (липень-серпень) у м. Ланівці (Тернопільська обл.) та його околицях. Листки конюшини повзучої збирали в популяціях, які росли на пасовищі, у центральній частині м. Ланівці та на ділянці поблизу автодороги Ланівці–Тернопіль (Р 43). Із різних частин кожної популяції відбирали по 200 зразків листових пластинок конюшини повзучої. За два роки дослідження (2019–2020 рр.) було проаналізовано 1200 екземплярів рослинного матеріалу.

Для ідентифікації малюнків сивої плями використовували методику П. Я. Шварцмана (табл. 1). Порівнювали малюнки плям на зібраних листках *T. repens* із малюнками, зображеними у таблиці Дж. Л. Брюейкера (табл. 2) [6, 8].

Таблиця 1. Множинний алелізм гена *V T. repens* (за П. Я. Шварцманом, 1986)

Алель	Генотип	Фенотип	Символ фенотипу (фен)
<i>v</i>	<i>vv</i>	Пляма відсутня	О
<i>V</i>	<i>VV</i>	Повна пляма	А
<i>V^H</i>	<i>V^HV^H</i>	Повна висока пляма	А ^H
<i>V^B</i>	<i>V^BV^B</i>	Пляма з розривом	В
<i>V^{Bh}</i>	<i>V^{Bh}V^{Bh}</i>	Висока пляма з розривом	В ^H
<i>V^P</i>	<i>V^PV^P</i>	Центральна верхня крапка	С
<i>V^F</i>	<i>V^FV^F</i>	Суцільно забарвлена велика трикутна пляма при основі	Д
<i>V^S</i>	<i>V^SV^S</i>	Низька трикутна пляма	Е

Згідно з Дж. Л. Брюейкером, є більше 11 алелей гена *V*. Під час розмноження алелі гена *V* утворюють різні поєднання один з одним. Різниця в розташуванні плям визначається часом дії кожної алелі в онтогенезі. Для більшості алелей характерним є їх сумісний прояв з утворенням різноманітних варіантів [8, 9]. Різні комбінації алелей гомо- і гетерозигот гена *V*, які визначають малюнок сивої плями, представлені у таблиці 2.

Для кількісної оцінки фенотипового різноманіття популяцій застосовували показник внутрішньопопуляційного різноманіття (μ) і частку рідкісних фенотипів (h), запропоновані Л. А. Животовським [10]. Ці показники і їх статистичні помилки S_{μ} і S_h розраховували за допомогою програми Microsoft Office Excel окремо для популяцій із кожної досліджуваної території. Частоту виникнення різних генотипів розраховували за часткою рослин того чи іншого фенотипу в дослідженій вибірці у конкретних умовах існування і виражали у відсотках.

T. repens використовували в якості фенотипового біоіндикатора стану навколишнього

середовища та рівня антропогенного впливу. Для визначення антропогенного навантаження розраховували індекс співвідношення фенотипів (ІСФ) за [11].





































Результати та обговорення

Результати дослідження свідчать про те, що на всіх досліджених територіях траплялися рослини конюшини повзучої з генотипами vv , VV , $V^H V^H$, $V^P V^P$, проте рослини з генотипами $V^B V^B$ і $V^{Bh} V^{Bh}$ були відсутні. Середні значення частоти фенотипових класів подано у таблиці 3.

Усього нами було виявлено 10 фенотипових класів. Мінімальна кількість різних фенотипів – 4 і максимальна – 7, очевидно, свідчать про різний рівень морфогенетичного поліморфізму у популяціях конюшини повзучої, які ростуть на територіях із різним антропогенним навантаженням.

У таблиці 4 представлені дані, які характеризують фенотипове різноманіття популяцій конюшини повзучої у м. Ланівці.

Таблиця 2. Гомо- і гетерозиготи за алелями гена *V*, який зумовлює малюнок сивої плями на листках конюшини повзучої

	1	2	3	4	5	6	7	8
	v	V	V^H	V^B	V^{Bh}	V^P	V^F	V^S
1	 vv 0	 Vv A	 $V^H v$ A^H	 $V^B v$ B	 $V^{Bh} v$ B^H	 $V^P v$ C	 $V^F v$ D	 $V^S v$ E
2		 VV A	 $V^H V^H$ $A^H A^H$	 $V^B V^B$ A (B)	 $V^{Bh} V^{Bh}$ AB^H	 $V^P V^P$ A (C)	 $V^F V^F$ A (A) D	 $V^S V^S$ AE
3			 $V^H V^H$ A^H	 $V^H V^B$ A^H	 $V^{Bh} V^{Bh}$ $A^H (B^H)$	 $V^P V^H$ $A^H C$	 $V^F V^H$ $A^H D$	 $V^S V^H$ $A^H E$
4				 $V^B V^B$ B	 $V^{Bh} V^{Bh}$ BB^H	 $V^P V^B$ B	 $V^F V^B$ BD	 $V^S V^B$ BE
5					 $V^{Bh} V^{Bh}$ B^H	 $V^P V^{Bh}$ $B^H C$	 $V^F V^{Bh}$ $B^H D$	 $V^S V^{Bh}$ $B^H E$
6						 $V^P V^P$ C	 $V^F V^P$ D	 $V^S V^P$ CE
7							 $V^F V^F$ D	 $V^S V^F$ D
8								 $V^S V^S$ E

Примітка. Розшифрування умовних позначень алелей, генотипів і фенотипів наведено у таблиці 1.

Таблиця 3. Частота трапляння фенотипових класів популяцій *T. repens*, %

Символ фенотипу	Генотип	Місцезнаходження популяції		
		Пасовище	Центральна частина м. Ланівці	Узбіччя автодороги Ланівці–Тернопіль
О	vv	56,2±2,8	12,6±1,2	35,4±2,6
А	VV	26,2±1,3	41,4±1,4	34,0±1,5
А ^H	$V^H V^H$	15,4±1,6	36,6±2,1	20,4±1,1
В	$V^B V^B$	0	0	0
В ^H	$V^{Bh} V^{Bh}$	0	0	0
С	$V^P V^P$	2,2±0,4	4,4±0,2	7,0±2,2
В ^H С	$V^{Bh} V^P$	0	1,3±1,1	0
А ^H С	$V^H V^P$	0	3,0±0,4	0
Д	$V^F V^F$	0	0	1,0±0,04
Е	$V^S V^S$	0	3,6±0,2	2,2±1,4

Примітка. Розшифрування умовних позначень алелей, генотипів і фенотипів наведено у таблиці 1.

Таблиця 4. Фенотипове різноманіття *T. repens* на досліджуваних ділянках у м. Ланівці

Місцезнаходження популяції	Показник внутрішньопопуляційної різноманітності (μ)	Частка рідкісних фенотипів (h)	Найбільше число фенотипів у популяції
Пасовище	3,22±0,15	0,19±0,039	4
Центральна частина м. Ланівці	4,98±0,32	0,28±0,045	7
Узбіччя автодороги Ланівці–Тернопіль	4,57±0,25	0,24±0,042	6

Вивчення внутрішньопопуляційного поліморфізму у популяціях *T. repens* у м. Ланівці та його околицях показало, що на пасовищній ділянці було виявлено 4 фенотипи, з-поміж яких переважали рецесивні гомозиготи (vv) (рослини без сивої плями з високою частотою трапляння (56,2 %)). На інші фенотипи припадало 27,5 % (повна пляма) і 15,4 % (пляма з розривом). Рослини з центральною крапкою траплялися нечасто (2,2 %). На цій території гетерозиготні рослини були відсутні, популяція характеризується морфогенетичною однорідністю, що підтверджується найменшим показником внутрішньопопуляційної різноманітності ($\mu = 3,22$) і, очевидно, свідчить про відсутність антропогенного навантаження.

На іншій ділянці дослідження (центральна частина м. Ланівці) виявлено 7 генотипів *T. repens*, з-поміж яких спостерігалось значне зменшення рецесивних гомозигот (на 43,6 %) та збільшення частоти генотипів VV (на 15,2 %) і $V^H V^H$ (на 21,2 %). На цій території частота трапляння рослин із центральною крапкою була удвічі більшою, ніж на пасовищній ділянці. На інші генотипи $V^S V^S$, $V^{Bh} V^P$, $V^H V^P$ (фен Е, фен В^HС, фен А^HС) припадало 1,3–3,6 %. Показник внутрішньопопуляційної різноманітності конюшини повзучої на цій ділянці був найвищим з-поміж досліджуваних територій і становив 5,1.

Частота рідкісних фенотипів збільшується зі зростанням неоднорідності і для популяцій, які знаходяться на цій території, набуває максимального значення ($h = 0,28$). Отримані результати, очевидно, вказують на підвищення генетичного різноманіття, що формується за впливу антропогенного навантаження у вигляді витоптування, викошування, забруднення атмосферного повітря. Крім того, у місті Ланівці спостерігається варіювання таких факторів, як інтенсивність світла, вологість, температура повітря, забруднення ґрунтів і їх закислення.

Отримані нами дані підтверджуються й результатами досліджень інших науковців [9, 12], які відзначають залежність гетерогенності популяції *T. repens* від рівня забруднення навколишнього середовища та підвищення генетичного різноманіття за рахунок наявності генотипів, які рідко трапляються ($V^P V^P$ і $V^P V^{Bh}$).

На ділянці поблизу автодороги Тернопіль–Ланівці встановлено наявність 6 генотипів конюшини повзучої, з-поміж яких рослини без плями (vv) та з повною плямою (VV) трапляються з однаковою частотою (34–35 %). Значну частину (20,4 %) становили рослини з повною високою плямою ($V^H V^H$). Інші фенотипи займали 10 % (із центральною верхньою крапкою ($V^P V^P$) – 7 %, із трикутною плямою при основі ($V^F V^F$) – 1 % і з низькою трикутною плямою

($V^S V^S$) – 2,2 %). На цій території спостерігається більш широкий прояв фенотипів у порівнянні з пасовищною ділянкою, проте з меншою наявністю різноманіття у порівнянні з «міською» популяцією. Значення показника внутрішньопопуляційної різноманітності становить 4,57, а частота рідкісних фенотипів – 0,24. На цій території рівень забруднення навколишнього середовища значно вищий, ніж на пасовищі. На думку ряду авторів [2, 12–14], видове різноманіття трав, високий рівень адаптації видів рослин і конкуренція між ними призводить до пригнічення домінування конюшини повзучої у цих угрупованнях, що, у свою чергу, веде до зниження генетичного поліморфізму виду *T. repens*.

Зростання дії антропогенних чинників на популяцію конюшини повзучої призводить до зміни її генетичної структури і зростання індексу співвідношення фенотипів. На чистих територіях величина ІСФ не перевищує 45 %, а на антропогенно забруднених може становити 70–90 % [12]. На основі отриманих результатів фенотипового різноманіття кожної дослідженої популяції конюшини повзучої було розраховано ІСФ і встановлено ступінь забруднення територій (табл. 5).

У результаті дослідження встановлено, що лише одна досліджена популяція конюшини повзучої перебуває на екологічно чистій ділянці (пасовище), інші популяції знаходяться на екологічно напружених територіях.

Висновки

Таким чином, популяції *T. repens*, які знаходяться в умовах різного природно-екологічного та антропогенного навантаження, відрізняються за кількістю генотипів і фенотипів, демонструючи внутрішньопопуляційне різноманіття і генетичний поліморфізм цього виду. У популяціях, які знаходяться на екологічно забруднених і антропогенно навантажених територіях, за впливу мутаційного процесу і природного добору відбувається розширення наборів алелей і виникають специфічні фенотипи. У старій пасовищній популяції, де відсутній негативний вплив антропогенних факторів, конюшина повзуча перебуває під впливом ценотичного стресу і пригнічується іншими видами рослин, що, очевидно, є причиною зниження поліморфізму і підвищення частоти окремих генотипів (vv , VV).

Таблиця 5. Індекс співвідношення фенів (ІСФ) популяцій *T. repens* у м. Ланівці (2019–2020 рр.)

Місцезнаходження популяції	Кількість фенотипів, шт.	ІСФ, %	Стан території
Пасовище	4	43	Чиста
Центральна частина м. Ланівці	7	88	Дуже забруднена
Узбіччя автодороги Ланівці–Тернопіль	6	65	Забруднена

References

- Kamchatova I. E. Clover intrapopulation genetic polymorphism (*Trifolium*). *Phenetics of natural populations* : Proceedings of the IV All-Union Conference (Borok, November, 1990). Moscow: Institute of Developmental Biology. N. K. Koltsov Academy of Sciences of the USSR, 1990. P. 106–108. [in Russian]
- Sokolova G. G., Kamaltdinova G. T. The morphogenetic polymorphism of *Trifolium repens* leaves. *News AltGU*. 2010. № 3 (part 1). P. 48–51. Retrieved from: <http://izvestia.asu.ru/2010/3-1/bios/TheNewsOfASU-2010-3-1-bios-10.pdf>. [in Russian]
- Dobzhansky Th. *Genetics of the evolutionary process*. New York: Colum. Univ. Press, 1970. 505 p.
- Veselova T. V. *Stres u roslin: Biofizychnyi pidkhd. M.: Yzd-vo MHU, 2014. 144 s.* [in Russian]
- Kosulyna L. H., Lutsenko E. K., Aksenova V. A. *Fyzyolohiya ustoichyvosty rastenyi k neblahopryiatnym faktoram srede : ucheb. pos.* Rostov-na-Donu : Novaia knyha, 2011. 240 s. [in Russian]
- Shvartsman P. Ia. *Polevaia praktyka po henetyke s osnovamy selektsyy. M. : Prosveshchene, 2009. 111 s.* [in Russian]
- Hamilton R. S., Cresswell A. *Iger Innovations*, 1999. P. 12–15.
- Brewbaker Y. L. V-lear markings of white clover. *Y. Hered.* 1955. Vol. XVU, № 3. P. 115–125.
- Valyev R. R., Yakovleva O. M. *Sravnytelnaia kharakterystyka nasledstvennogo polymorfizma po pryznaku "sedoho" piatna na lystiakh rastenyi v populiatsiakh Trifolium repens na terrytorii h. Ufy y nekotorykh raionov Respublyky Bashkortostan. Vestnyk Bashkyskoho unyversyteta.* 2008. T. 1, № 2. S. 24–27. [in Russian]
- Zhivotovsky L. A. The index of similarity of populations by polymorphic characteristics. *Journal Obsheyi Biologii.* 1979. Vol. 40, No. 4. P. 587–602 [in Russian]
- Chukaeva N. V. *Belyj klever v ocenke sostojanija okruzhajuwej srede. Estestvoznaniye i gumanizm : sbornik nauchnyh trudov.* 2010. T. 6, No. 1. P. 73. Retrieved from: www.rae.ru/use/?section=content&op=show_article&article_id=7797530. [in Russian]

12. Shagrov L. L., Ostrozhinskaya A. A. Study of the frequency of alleles of the gene "Gray" spots in clover creeping in populations, Arkhangelsk and Plesetsk district, The Arkhangelsk region. *Start*. 2014. № 2. P. 18–21. Retrieved from: <http://start.esrae.ru/6-32>. [in Russian]
13. Glotov N. V., Maksimenko O. E., Orlinsky D. B. Ecological and genetic variability of white clover (*Trifolium repens* L.) in natural populations of the Middle Ob region. *Ecology*. 1995. № 5. P. 344–346. [in Russian]
14. Levitskiy S. N. Genetic polymorphism in population of *Trifolium repens*, growing under different anthropogenic load territories: *Fundamental Research*. 2013. № 4. P. 108–111. Retrieved from: <http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=31108>. [in Russian]

KRYZHANOVSKA M. M.¹, HOLUB N. Ya.², PROKOPIAK M. Z.¹, HOLINEI H. M.¹

¹ Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University,

Ukraine, 46027, Ternopil, M. Kryvonosa str., 2, e-mail: kryzanovska@chem-bio.com.ua

² Ivan Franko Lviv National University,

Ukraine, 79000, Lviv, Universytetska str., 1

STUDY OF THE INTRAPOPULATION POLYMORPHISM OF *TRIFOLIUM REPENS* L. FROM LANIVTSI UNDER THE ANTHROPOGENIC LOAD OF VARIOUS INTENSITY

Aim. To study the phenotypic polymorphism of *Trifolium repens* L. populations growing under various anthropogenic load. **Methods.** The quantitative calculation of the leaves of the white clover by the presence or absence of the white leaf mark; the identification of the phenotype and genotype of the plant according to the pattern of the white leaf mark; the analysis of the phenotypic diversity and the study of the percentage of rare phenotypes; the calculation of the index of the phenotypes ratio. **Results.** 4 phenotypes were identified in the pasture area. The most common of them were the plants without the white mark with a frequency of 56.2 %. The plants with a full spot accounted for 27.5 %, with a spot with a gap – 15.4 %, with a central spot – 2.2 %. Heterozygous plants were absent. In the central part of the city, 7 genotypes were identified. Among these genotypes there were the significant decrease of the recessive homozygotes (by 43.6 %) and the increase of the frequency of VV (by 15.2 %) and $V^H V^H$ (by 21.2 %) genotypes. Heterozygotes accounted for 1.3–3.0 %. The intrapopulation diversity in this territory was the highest (5.1) among the studied areas. In the population growing near Ternopil-Lanivtsi road, we identified 6 genotypes. The plants without spot (vv) and with the full spot (VV) were found with identical frequency of 34–35 %. The plants with a full high spot ($V^H V^H$) were about 20.4 %. Other phenotypes amounted to 10 %. **Conclusions.** In the populations located in ecologically polluted and anthropogenically loaded areas, the sets of alleles expand and the specific phenotypes appear under the influence of the mutation processes and natural selection. In the population without the anthropogenic load the decrease of the polymorphism and the increase of the frequency of individual genotypes (vv , VV) were observed.

Keywords: *Trifolium repens* L., leaf phenotype, intrapopulation polymorphism, multiple allelism, bioindication, anthropogenic load.