

МИРЮТА Н.Ю., ПАРНИКОЗА І.Ю.✉, ПОРОННІК О.О., МИРЮТА Г.Ю., КУНАХ В.А.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

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

✉ivan.parnikoza@gmail.com

РОСЛИНИ *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* E. DESV. З РІЗНИМ ЧИСЛОМ ХРОМОСОМ В УМОВАХ ВИРОЩУВАННЯ *IN VITRO*. ЙМОВІРНІСНІ ЗВ'ЯЗКИ ТРЬОХ ПОКАЗНИКІВ ПРИСТОСОВУВАНOSTІ МІЖ СОБОЮ ТА З РОЗМІРОМ ГЕНОМУ

Дослідження *Deschampsia antarctica* E. Desv., судинної рослини одного з найекстремальніших регіонів Землі – Антарктики, виявили наявність у неї пристосовуваності до різних абіотичних факторів стресу за допомогою узгодженої відповіді (оркестровки) реакцій організму [1, 2]. Генетичні дослідження цього виду не показали великої генетичної гетерогенності [3]. Тому у нашій роботі ми намагалися з'ясувати, які властивості, характерні для *D. antarctica* у природних умовах, зберігаються у динамічній спадковій пам'яті і як взаємодіють між собою при вирощуванні рослин з різним розміром геному (пропорційним числу хромосом) у лабораторних умовах. Динамічна спадкова пам'ять – це спосіб збереження інформації, який, на відміну від структурної пам'яті (коли інформація записана в просторовій структурі біополімерів), забезпечується шляхом циркуляції сигналів у циклічній системі елементів [4]. Далі під терміном «генотип» ми будемо розуміти як набір генів, так і епігенів, характерний для отриманої з однієї насінини рослини з подальшим її вирощуванням у стандартизованих умовах *in vitro*.

Це повідомлення є продовженням циклу робіт, присвячених вивченню відносин між інтегральним показником розміру геному та деякими показниками пристосовуваності, і має за мету проаналізувати вміст захисних білків, побудувати схему ймовірнісних зв'язків за всім набором охарактеризованих у попередніх повідомленнях параметрів для кількох обраних генотипів (див. [О.О. Пороннік та ін., І.Ю. Парнікоза та ін. у цьому збірнику]).

Матеріали і методи

Досліджено рослини *D. antarctica* 11 генотипів з різним числом хромосом, перелік яких та коротка характеристика представлені у табл. (див. [І.Ю. Парнікоза та ін. у цьому збірнику]).

Як характеристику віталітету рослин вивчали параметр довжини листка. В листках також визначали кількість флавоноїдів за рутинном, як описано в [5]. Екстрагування білків та вивчення їхнього спектра електрофоретичним методом проводили за методикою, описаною в [6]. Цифрові фотографії гелю денситометрували. Визначали частки окремих груп білків, характерних для листків Poaceae, зокрема, пшениці *Triticum aestivum* L., вимірюючи відповідні площі під піками денситограми по відношенню до площ загального пулу білків за допомогою програми Scion Image [7].

Для виявлення різниці між характеристиками рослин різних генотипів за кожним із досліджених параметрів було побудовано розподіли чи визначено середні значення. Пошук різниць між розподілами для пар генотипів за довжиною листка проводили методом критерію медіани [8]. При порівнянні середніх значень знаходили їх різниці за абсолютною величиною.

Для дослідження ймовірнісних зв'язків між дослідженими параметрами на першому етапі було застосовано деякі евристичні методи зниження розмірності, зокрема метод екстремального групування за парами характеристик [9]. У рамках застосованого евристичного підходу проводили оцінку ймовірності потрапляння в одну з груп для кожного генотипу [10, 11]. Набори попарних порівнянь популяцій групували за шістьма парами показників пристосовуваності: $|\Delta Gs| - |\Delta Ph|$, $|\Delta Gs| - |\Delta Pr|$, $|\Delta Gs| - |\Delta Fl|$, $|\Delta Ph| - |\Delta Pr|$, $|\Delta Fl| - |\Delta Pr|$ та $|\Delta Fl| - |\Delta Ph|$ (де $|\Delta Gs|$ – набір абсолютних значень попарних відстаней між розмірами геному (в пг), $|\Delta Ph|$ – набір значень попарних відстаней (в умовних одиницях) між розподілами за довжиною листка, $|\Delta Pr|$ – набір абсолютних значень попарних різниць часток вмісту окремих захисних білків, $|\Delta Fl|$ – набір абсолютних значень попарних різниць часток вмісту флавоноїдів). Кожну пару показників, яку піддавали екстремальному групуванню,

поділено на дві групи «позитивну» та «негативну» за допомогою регресійних методів. Ймовірність приналежності до кожної з груп визначали для кожного з одинадцяти досліджених геноти-

пів. Для кожного генотипу будували схеми, які мають наочно показати ймовірнісні зв'язки між дослідженими показниками.

Таблиця. Локалізація популяцій, із яких було зібране насіння для одержання дослідних рослин (генотипів), хромосомні числа, розмір геному та вміст флавоноїдів у рослин *D. antarctica*, вирощуваних *in vitro* (за: І.Ю. Парнікоза та ін. у цьому збірнику)

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

Результати та обговорення

На першому етапі обробки експериментальних даних отримано набір експертних оцінок для раніше досліджених показників пристосовуваності: довжини листків, кількість флавоноїдів у метанольних екстрактах листків та розмір ядерного геному, визначений у листках, табл. 1 (див. також [О.О. Пороннік та ін., І.Ю. Парнікоза та ін. у цьому збірнику]).

До охарактеризованих раніше показників – довжини листків, кількість флавоноїдів у ме-

танольних екстрактах листків та розмір ядерного геному, (див. [І.Ю. Парнікоза та ін. у цьому збірнику]) – ми додали ще показник відносного вмісту окремих фракцій білків у листках, визначений у результаті аналізу електрофореграми білків листків рослин (рис. 1). Спираючись на дані, наведені у роботі [12], на рис. 2 наведено значення часток груп білків листків за розмірами у КДа: 66 – 67 – великий hs-протеїнашаперон; 45 – RuBisCO; 36 – один з антифризних білків (у *Secale cereale* L.); 24 – один із ша-

перонів *Triticum aestivum*; 20 – 22 – один з антифризних білків *D. antarctica*; 14 – малий hs-протеїн, дегідрин. Виявлено, що загальний спектр захисних білків для рослин *D. antarctica*

досліджених генотипів, вирощених у стандартизованих умовах *in vitro*, був подібним, проте їх частка у різних генотипів варіювала.

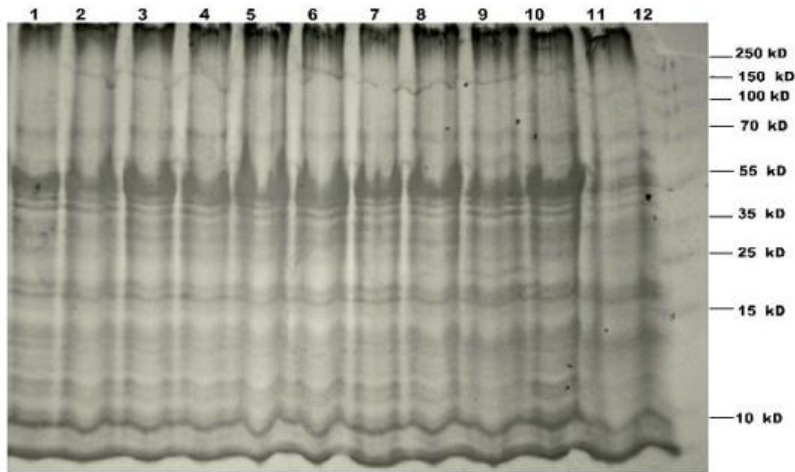


Рис. 1. Електрофореграма загальних білків у листках *D. antarctica* різних генотипів: 1 – G/D12-2а, 2 – G/D4-1, 3 – G/D12-1, 4 – DAR12, 5 – S22, 6 – Y66, 7 – Y67, 8 – Y62, 9 – R35, 10 – L59, 11 – W1, 12 – Маркер Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder.

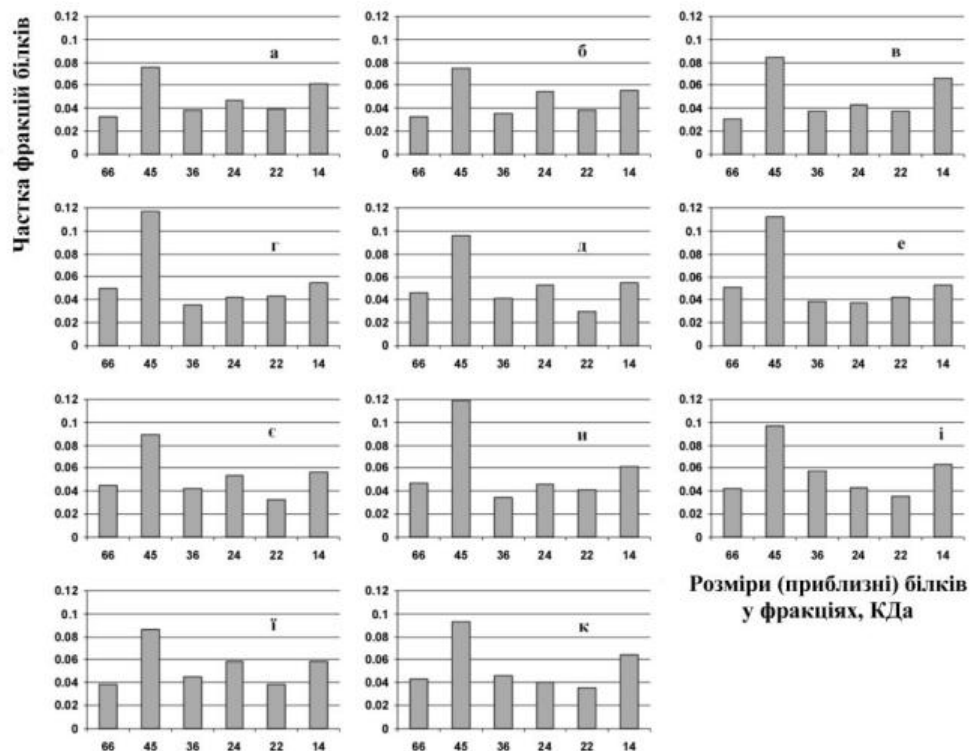


Рис. 2. Середні значення часток різних груп білків у листках рослин *D. antarctica* за умов стандартизованого вирощування *in vitro*.

Досліджені генотипи: а – G/D4-1, б – G/D12-2а, в – G/D12-1, г – Y62, д – Y66, е – Y67, є – S22, ж – R35, з – W1, и – DAR12, й – L59. Представлені білки за розмірами у КДа: 66-67 – великий hs-протеїн-шаперон; 45 – RuBisCO (мала субодиниця); 36 – один з антифризних білків (у *Secale cereale* L.); 24 – один з шаперонів *Triticum aestivum*; 20-22 – один з антифризних білків *D. antarctica*; 14 – малий hs-протеїн, дегідрин.

Далі отримано набір попарних порівнянь за допомогою визначення абсолютного значення різниці показників відносного вмісту окремих фракцій захисних білків. Дані результати можуть бути порівнянні з аналогічними для розміру геному, а також таких показників прис-

тосовуваності, як розмір листка та вміст флавоноїдів (див. [О.О. Пороннік та ін., І.Ю. Парнікоза та ін. у цьому збірнику]). Приклад екстремального групування для показників розміру геному та фракції білка розміром 66–67 КДа наведено на рис. 3.

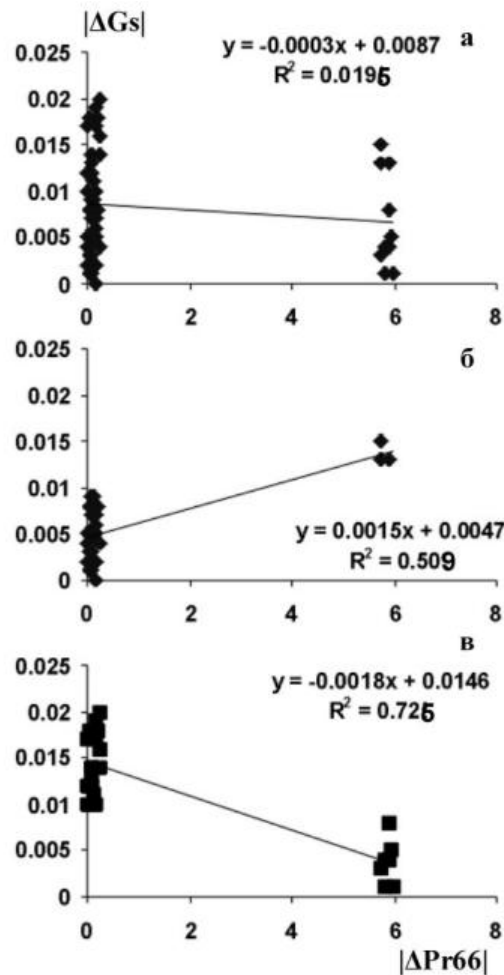


Рис. 3. Приклад застосування методу екстремального групування до пари характеристик $|\Delta Gs|$ – $|\Delta Pr66|$ рослин *D. antarctica* за умов вирощування *in vitro*.

Порівняння набору різниць розміру геному ($|\Delta Gs|$) та відносного вмісту білка розміром 66 КДа ($|\Delta Pr66|$): **а** – для всіх досліджених величин між усіма генотипами; **б** – для різниць, які мають залежність з позитивною кореляцією між $|\Delta Gs|$ і $|\Delta Pr66|$, отримані методом найменших квадратів; **в** – для різниць, які мають залежність з негативною кореляцією між цими характеристиками. На графіках **а**, **б**, **в** наведено рівняння прямих регресій, проведених методом найменших квадратів, та квадрати відповідних коефіцієнтів кореляції між значеннями $|\Delta Gs|$ – $|\Delta Pr66|$. Значення критеріальної статистики для величин R^2 , наведених на графіках: **а** – $F_{1,53}=1.06$ (не перевищує значення верхньої 5 % межі F-розподілу для $N=55$ ($F_{1,53}=4,08$)), **б** – $F_{1,28}=29,04$ та **в** – $F_{1,23}=60,63$ (перевищують значення верхньої 5 % межі F-розподілу для $N=28$ ($F_{1,28}=4,20$) та $N=25$ ($F_{1,23}=4,28$)). Це означає у випадку (**а**) відсутність лінійної залежності і у випадках (**б**, **в**) наявність лінійної залежності.

На рис. 4 наведено приклад ймовірнісних зв'язків між усіма аналізованими рядами даних: розміром геному, довжиною листків, вмістом флавоноїдів та білків для трьох з одинадцяти досліджених генотипів *D. antarctica*. Для аналізу результатів обрано рослини трьох генотипів, отримані з насіння, що було зібране в одному локалітеті острова Великий Ялур (район Аргентинських островів, Морська Антарктика) в один сезон: Y62, Y66, Y67.

Трикутник, утворений лініями, що позначають ймовірнісні зв'язки $|\Delta Gs| - |\Delta Ph|$, $|\Delta Gs| - |\Delta Fl|$, $|\Delta Ph| - |\Delta Fl|$, є подібним за позитивними значеннями ймовірнісних зв'язків для рослин генотипів Y62 та Y67, які є диплоїдами табл. (див. [І.Ю. Парнікоза та ін. у цьому збірнику]). Це означає, що при збільшенні кожного з цих параметрів збільшується інший. Що стосується рослин генотипу Y66, який є гіпотриплоїдом, то для перших двох пар характеристик йому притаманні негативні ймовірнісні зв'язки. Це означає, що при спонтанному збільшенні розміру геному у переважній більшості рослин мають зменшуватися довжина листка з ймовірністю 0,6 та вміст флавоноїдів із ймовірністю 0,7, тоді як відношення між довжиною листка і вмістом флавоноїдів може стати в половині випадків позитивним, а в іншій половині – негативним, порушуючи позитивну залежність цих характеристик, характерну для диплоїдів.

Ймовірнісні зв'язки $|\Delta Gs| - |\Delta Pr|$ у гіпотриплоїдних рослин генотипу Y66 мають той самий знак, що й у диплоїдних Y62 і Y67 для білків розміром 24 КДа (один із шаперонів *Triticum aestivum*) та 14 КДа (малий hs-протеїн, дегідрин). Для останнього білка у гіпотриплоїдних рослин генотипу Y66 значно збільшилася ймовірність потрапляння в позитивну групу, однак при цьому знак змінюється на протилежний для білків розміром 45 КДа (RuBisCO), 36 КДа (один з антифризних білків у *Secale cereal* L.), 20–22 КДа (один з антифризних білків *D. antarctica*). Ймовірнісні зв'язки $|\Delta Gs| - |\Delta Pr|$ для білка 66–67 КДа (великий hs-протеїн-шаперон) у гіпотриплоїдних рослин Y66 є негативними (-0,7), тоді як у диплоїдних рослин генотипу Y62 і Y67 з рівною ймовірністю потрапляють як у позитивну, так і у негативну групу (0,5).

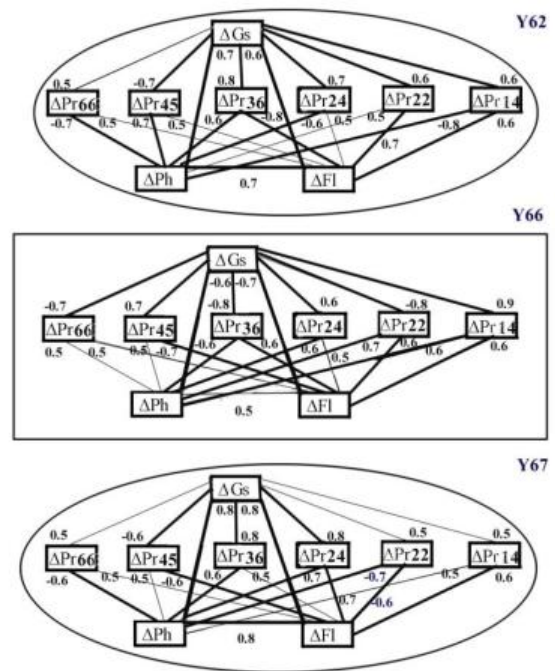


Рис. 4. Приклад залежностей (ймовірнісних зв'язків) між рядами даних: розмірами геному, розмірами листків, вмістом флавоноїдів та вмістом білків для рослин трьох з одинадцяти досліджених генотипів *D. antarctica*: $|\Delta Gs|$ – різниці розмірів геному, $|\Delta Ph|$ – відстані за розподілами рослин різних генотипів за довжиною листка – $|\Delta Ph|$; різниці часток груп білків за розмірами у КДа $|\Delta Pr66|$ - 66-67, $|\Delta Pr45|$ - 45, $|\Delta Pr36|$ - 36, $|\Delta Pr24|$ - 24, $|\Delta Pr22|$ - 20-22, $|\Delta Pr14|$ - 14 та різниці вмісту флавоноїдів $|\Delta Fl|$. Цифрами позначено ймовірність для рослин кожного генотипу синхронності (+) або асинхронності (-) процесів, що описуються порівнюваними рядами даних. Овалом виділено диплоїдні генотипи, прямокутником – гіпотриплоїд.

Висновки

1. У рослин досліджених генотипів *D. antarctica* за умов стандартизованого вирощування *in vitro* форма денситометричних профілів захисних білків та RuBisCO є подібною для рослин усіх досліджених генотипів, але їх кількісна частка у загальному пулі білків може бути різною.

2. Розмір геному впливає на його ймовірнісні зв'язки із вмістом флавоноїдів, довжиною листка та відносною часткою деяких захисних білків і RuBisCO у загальному пулі білків.

3. Припускається, що ймовірнісні зв'язки між розміром геному і відносним вмістом захисних білків та RuBisCO, а також між вивченими білками та вмістом флавоноїдів і довжиною

листка певною мірою відображають специфічну інформацію, закладену в процесі пристосовуваності рослин (генотипів) до унікальних природних умов у динамічній спадковій пам'яті, яка зберігається і унікальним чином реалізується у

досліджених генотипів за стандартизованих умов культивування *in vitro*.

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

Література

1. Lee J., Noh E.K., Choi H.S., Shin S.C., Park H., Lee H. Transcriptome sequencing of the Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* Desv. under abiotic stress // *Planta*. – 2012. doi: 10.1007/s00425-012-1797-5.
2. Parnikoza I., Kozeretcka I., Kunakh V. Vascular Plants of the Maritime Antarctic: Origin and Adaptation // *American Journal of Plant Sciences*. – 2011. – 2 – P. 381–395.
3. Andreev I.O., Spiridonova E.V., Kyryachenko S.S., Parnikoza I.Yu., Maidanyuk D.N., Volkov R.A., Kozeretcka I.A., Kunakh V.A. Population-genetic analysis of *Deschampsia antarctica* from two regions of maritime Antarctic // *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. – 2010. – V. 65, N 4. – P. 208–210.
4. Чураев р.Н. Эпигенетика: генные и эпигенные сети в онто- и филогенезе // *Генетика*. – 2006. – Т. 42, № 9. – С. 1276–1296.
5. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. – Л., 1987. – 191 с.
6. Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Грабительны О.И. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез. – М.: Наука, 2004. – 98 с.
7. Scion Image [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://scion-image.software.informer.com/4.0/>.
8. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики. – М.: Финансы и статистика. – 1982. – 344 с.
9. Айвазян С.А., Бухштабер В.М., Енюков И.С., Мешалкин Л.Д. Прикладная статистика. Классификация и снижение размерности. – М.: Финансы и статистика, 1989. – 606 с.
10. Parnikoza I., Miryuta N., Ozheredova I., Kozeretcka I., Smykla J., Kunakh V., Convey P. Comparative analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. population adaptability in the natural environment of the Admiralty Bay region (King George Island, maritime Antarctic) // *Polar Biology*. – 2015. – V. 38, No. 9. – P. 1401–1411.
11. Мірюта Н., Пороннік О., Парнікоза І., Грахов В., Мірюта Г., Козуб Н., Созинов І., Кунах В. Збереження унікальності за комплексною пристосовуваністю різних генотипів *Deschampsia antarctica* Desv. в умовах стандартизованого вирощування рослин *in vitro* // *Український Антарктичний Журнал*. – 2016 – № 15. – С. 60–80.
12. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. – М.: Наука, 1985. – 272 с.

MIRYUTA N.Yu., PARNIKOZA I.Yu., PORONNIK O.O., MYRYUTA G.Yu., KUNAKH V.A.

Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 150, e-mail: n.miryuta@gmail.com

DESCHAMPSIA ANTARCTICA E. DESV. PLANTS WITH DIFFERENT CHROMOSOME NUMBER CULTIVATED *IN VITRO*. PROBABILISTIC RELATIONS OF THREE ADAPTABILITY INDICES WITH GENOME SIZE

Aim. This work deals with probabilistic relations between genome size and adaptability indices research in 11 genotypes plants revealed among seeds of *Deschampsia antarctica* E. Desv. which has different genome size under standardized cultivation condition *in vitro*. **Methods.** We have used electrophoretic method for determination of protein relative contents in plant leaves, and statistical analysis for probabilistic relations determination. **Results.** Protein densitometric profiles for 11 *D. antarctica* genotypes plants were analyzed. Probabilistic scheme have been created for all researched plants genotypes for all previously analyzed parameters. Three probabilistic schemes of genotypes plants received from seeds collected in the same loci and season have been shown and analyzed. **Conclusions.** Protective protein densitometric profiles were similar for 11 genotypes of *D. antarctica* plants under standardized cultivation condition *in vitro* but quantitative part of protective protein has been changed. Genome size had an influence on its probabilistic relations with flavonoids content, leaf length and some protein relative contents in general pool. Probabilistic relations between genome size and some protein relative content and between the last and flavonoids content and leaf length is assumed to express underlying in this plants adaptation process to uniqueness nature condition in dynamic hereditary memory special information in certain degree. Mechanisms of probabilistic relations changes are required a detailed research.

Keywords: *Deschampsia antarctica*, plants *in vitro*, probabilistic relations between genome size and adaptability indices, plant adaptability.