

УДК [575.174.015.3 : 582.542.1] (829.3)

ГЕОГРАФІЧНИЙ ГРАДІЄНТ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ *Deschampsia antarctica* Desv. ІЗ ПРИБЕРЕЖНОЇ АНТАРКТИКИ

І.О. Андрєєв¹, Р.А. Волков², І.А. Козерецька³, І.Ю. Парнікоза¹, К.В. Спіридонова¹,
С.С. Кир'яченко³, Д.М. Майданюк^{1,4}, В.А. Кунах¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Акад. Заболотного, 150,
м. Київ-143, 03680, Україна, e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

² Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, вул. Коцюбинського, 2,
м. Чернівці, 58012, Україна

³ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64,
біологічний факультет, м. Київ, 01033, Україна

⁴ Луганський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Оборонна, 2,
м. Луганськ, 91011, Україна

Реферат. З метою вивчення генетичного поліморфізму *D. antarctica* Desv. та філогенетичних зв'язків між рослинами Антарктики та з-поза її меж проведено RAPD-аналіз та порівняльний аналіз послідовностей ділянки ВТС1-2 рДНК. Вивчено 15 зразків з двох регіонів – з о-ва Кінг-Джордж та о-вів району Аргентинського архіпелагу. Результати RAPD-аналізу свідчать про диференціацію досліджених популяцій на молекулярно-генетичному рівні та існування географічного градієнту генетичного поліморфізму *D. antarctica* в Прибережній Антарктиці зі зниженням цього показника в напрямі з півночі на південь. Аналіз послідовності ділянки ВТС1-2 рДНК показав присутність в антарктичних популяціях кількох варіантів, що відрізняються специфічними мутаціями від рослин, які зростають за межами Антарктики.

Ключові слова: *Deschampsia antarctica*, RAPD-аналіз, ВТС рДНК, Прибережна Антарктика.

Географический градиент генетического полиморфизма *Deschampsia antarctica* Desv. из Прибрежной Антарктики. И.О. Андреев, Р.А. Волков, И.А. Козерецкая, И.Ю. Парникоза, Е.В. Спиридонова, С.С. Кирьяченко, Д.Н. Майданюк, В.А. Кунах

Реферат. С целью изучения генетического полиморфизма *D. antarctica* Desv. и филогенетических связей между растениями Антарктики и из-за ее пределов проведены RAPD-анализ и сравнительный анализ последовательностей участка ВТС1-2 рДНК. Изучено 15 образцов из двух регионов – с о-ва Кинг-Джордж и о-вов района Аргентинского архипелага. Результаты RAPD-анализа свидетельствуют о дифференциации исследованных популяций на молекулярно-генетическом уровне и о существовании географического градиента генетического полиморфизма *D. antarctica* в Прибрежной Антарктике со снижением этого показателя в направлении с севера на юг. Анализ последовательности участка ВТС1-2 рДНК показал присутствие в антарктических популяциях нескольких вариантов, которые отличаются специфическими мутациями от растений, произрастающих за пределами Антарктики.

Ключевые слова: *Deschampsia antarctica*, RAPD-анализ, ВТС рДНК, Прибрежная Антарктика.

Geographical gradient of genetic diversity of *Deschampsia antarctica* Desv. from the Maritime Antarctic. I.O. Andreev, R.A. Volkov, I.A. Kozeretska., I.Yu. Parnikozha, K.V. Spiridonova, S.S. Kiryachenko, D.N. Maydanyuk, V.A. Kunakh

Abstract. In order to study the genetic diversity of *D. antarctica* Desv. and phylogenetic relationships between the plants from Antarctica and outside of its borders RAPD-analysis and comparative sequence analysis of rDNA internal transcribed spacers 1 and 2 region (ITS1-2) were conducted. There are 15 samples

were studied from two distant regions, namely from King George Island and from islands of Argentine archipelago region. The results of RAPD-analysis indicate the differentiation of the studied populations at the molecular genetic level and the existence of a geographical gradient of genetic diversity of *D. antarctica* in Maritime Antarctica with a decrease in this parameter from north to south. Sequence analysis of the ITS1-2 rDNA region revealed the presence of several variants in Antarctic populations that differ by specific mutations from plants growing outside Antarctica.

Keywords: *Deschampsia antarctica*, RAPD-analysis, ITS rDNA, Maritime Antarctic.

1. Вступ

Судинні рослини Антарктики останнім часом перебувають в епіцентрі наукового інтересу, зумовленого не тільки можливостями їхнього використання як індикатора подій, пов'язаних із потеплінням в регіоні, але й своєю унікальністю як видів, чиє виключне розповсюдження в регіоні викликає багато питань (Parnikoza et al, 2011; Vera, 2011; Torres-Mellado et al., 2011). Підвищення середньорічної температури в регіоні, яке відбувалося протягом останніх 50 років, призвело до зміни ареалів та чисельності мешканців Антарктики. Інформація про процеси заселення Антарктики наземними організмами в минулому має велике значення для розуміння впливу сучасних кліматичних змін на антарктичні екосистеми і прогнозування їхніх наслідків. Зважаючи на острівний характер наземних антарктичних екосистем, вивчення географічного патерну генетичної мінливості наземних антарктичних організмів дасть додаткову інформацію для біогеографії островів в екстремальних умовах.

Щучка антарктична, *Deschampsia antarctica* Desv. – одна з двох судинних рослин Антарктики, що наразі знаходиться в епіцентрі уваги багатьох дослідників, втім, як і протягом багатьох років. Однак, незважаючи на дослідження низки антарктичних популяцій *D. antarctica*, отримані результати поки ще не дозволяють дати однозначної відповіді на поставлені питання (Parnikoza et al, 2011). Головним завданням робіт у цьому напрямі є вибір найбільш ефективного методу генетичного аналізу та необхідність використовувати для досліджень велику кількість матеріалу, який походить з різних регіонів. Молекулярні маркери є цінним інструментом вивчення генетичного різноманіття, в тому числі й у рослин. У цій роботі проведено порівняльний молекулярно-генетичний аналіз рослин *D. antarctica* з двох регіонів Прибережної Антарктики. Для цього використали два типи маркерів, а саме випадково ампліфіковану ДНК (RAPD-маркери), з метою визначення загального рівня генетичного поліморфізму цього виду та рівня дивергенції рослин з двох віддалених регіонів, а також нуклеотидну послідовність внутрішніх транскрибованих спейсерів (BTS1-2) ядерної рибосомної ДНК (рДНК) для вивчення філогенетичних зв'язків між окремими зразками рослин з Антарктичного регіону і з-поза його меж.

2. Матеріали та методи

Вивчено 15 зразків *D. antarctica* із Прибережної Антарктики, 9 з яких зібрано на островах району Аргентинського архіпелагу, а інші – в оазах Пойнт-Томас та Ферас на о. Кінг-Джордж (архіпелаг Південні Шетландські о-ви). Координати місць збору рослин опубліковано раніше (Parnikoza et al., 2007; Kozeretka et al., 2010). ДНК виділяли із свіжого листя з використанням цетавлонового методу, описаного в роботі (Спиридонова и др., 2007). Для RAPD-аналізу використали 30 десятинуклеотидних праймерів, підібраних раніше. ПЛР, фракціонування продуктів ампліфікації та аналіз результатів проводили, як описано раніше (Спиридонова и др., 2007). Розрахунок кількості поліморфних локусів, генетичних відстаней за Жакардом з наступною кластеризацією зразків методом UPGMA, індексу різноманіття Шенона і молекулярної варіанси (AMOVA) виконували за допомогою програми FAMD 1.21beta (Schlüter, Harris, 2006).

Ділянку ядерного гена 18S-25S рРНК, яка охоплює BTS1, ген 5.8S рРНК і BTS2, отримали шляхом ампліфікації зі специфічними праймерами до кінцевих ділянок генів 18S і

25S рPHK (White et al., 1999). Продукти клонували з використанням вектора рBluescript II SK(+). Послідовності ДНК визначали з використанням набору "fmol DNA Cycle Sequencing System" (Promega, США) на автоматичному генетичному аналізаторі ABI PRISM 3100-AVANT. Отримані послідовності депоновані в GenBank під номерами GU181209-GU181220. Порівняння нуклеотидних послідовностей рДНК і побудову дендрограм проводили за допомогою програми PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002).

3. Результати та обговорення

3.1. Палеогляціологічні та екологічні особливості досліджених регіонів

Для дослідження використали зразки, зібрані в двох віддалених (близько 450 км абсолютної відстані та понад 300 км в широтному напрямі) районах Прибережної Антарктики (рис. 1). Перший з цих районів – оаза Пойнт-Томас, о. Кінг-Джордж. За даними палеогляціологічних досліджень, о. Кінг-Джордж в часи останнього плейстоценового максимуму знаходився поза зоною суцільного зледеніння (Sugden, Clapperton, 1977). Існують докази того, що окремі його частини, так звані льодовикові рефугіуми, зокрема досліджувана в цій роботі оаза Пойнт-Томас, з огляду на свої фізико-географічні особливості також не зазнавали зледеніння (Marsz, 2001). Наразі формація антарктичної трав'янистої тундри займає більшу частину цієї оази. У зв'язку з відступом льодовика Екологдзи спостерігається просування тундри на пост-льодовикову територію (Kozeretska et al, 2010, Парнікоза та ін., 2010). До зон, нещодавно звільнених з-під льодовика, належить також популяція з півострова Келлера (околиці бразильської станції Команданте Ферраз). Аналізовані нами зразки відібрано по всій площі оази Пойнт-Томас, детальні умови зростання були описані нами раніше (Kozeretska et al., 2010). До другого району увійшли зразки з островів Аргентинського архіпелагу та деяких прилеглих територій: (о. Берселот, о. Галіндез, о. Пітерман, мис Расмуссен, о. Уругвай, о. Ялур). Розташовані набагато південніше, ці місцезростання мають суттєво меншу площу, придатну для поширення антарктичної трав'янистої тундри. Втім, ця формація займає тут значні ділянки, до 70% вільних від криги територій. На відміну від оази Пойнт-Томас, де вона поширена як в низинних ділянках, так і на підвищених схилах рельєфу, в більш суворих умовах району Аргентинських островів цей вид утворює популяції переважно на відкритих сонцю підвищених схилах та верхівках кам'янистих плато, де сходження снігу відбувається набагато раніше, ніж на затінених низинних ділянках.

3.2. RAPD-аналіз

Усього при проведенні аналізу було враховано 289 ампліконів, 28 (9,7%) з яких виявились поліморфними. На побудованій дендрограмі рослини згрупувалися у два кластери відповідно до географічного походження (рис. 2а). Аналіз молекулярної варіанси (AMOVA) показав, що географічна віддаленість популяцій, розташованих на відстані близько 450 км, дозволяє пояснити більше половини (58%) генетичного поліморфізму проаналізованої вибірки рослин. Чіткий розподіл зразків на дві групи свідчить про обмеженість обміну генетичним матеріалом між ними. В той же час усередині груп розподілу зразків відповідно до місця збору не виявлено, що вказує на відсутність істотних бар'єрів репродуктивної ізоляції в межах кожної географічної групи. Останнє можна пояснити також періодичним перенесенням птахами рослин і насіння *D. antarctica* на невеликі відстані між островами (Парнікоза та ін., 2011).

Для двох досліджених груп популяцій *D. antarctica* виявлено відмінності за рівнем генетичного поліморфізму, які свідчать про існування географічного градієнту цього показника: частка поліморфних фрагментів для рослин з Аргентинських о-вів склала 3,4%, а для рослин з о. Кінг-Джордж – 6,2 %; значення індексу Шенона, що характеризує генне різноманіття, – 0,015 і 0,024 відповідно. Ці відмінності контрастують ще більше, якщо

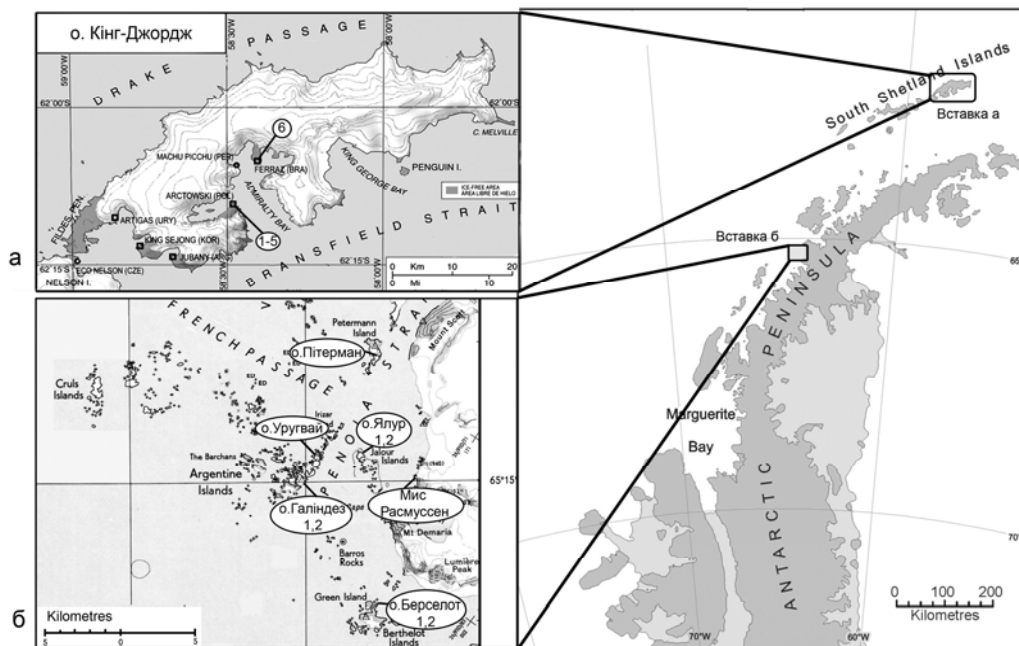


Рис. 1. Схема розташування місць збору зразків *D. antarctica* в Прибережній Антарктиці: (а) острів Кінг-Джордж (архіпелаг Південні Шетландські острови); (б) район Аргентинського архіпелагу.

врахувати розмір території збору зразків. Рослини з о. Кінг-Джордж зібрані на невеликій ділянці поблизу польської станції Арцтовський, за винятком одного зразка (№6) коло бразильської станції Команданте Ферраз, віддаленої приблизно на 9 км. Зразки другої групи зібрані з кількох островів, відстань між самими віддаленими з яких (о-ви Берселот і Пітерман) – близько 17 км. Подібний градієнт генетичного різноманіття описаний також іншими дослідниками на більшій вибірці зразків, яка охоплювала зразки з Південної Америки та о-вів Індійського океану. На основі результатів молекулярно-генетичного аналізу з використанням методу поліморфізму довжин апліфікованих фрагментів (AFLP) вони виявили значне зниження генетичного різноманіття *D. antarctica* (за індексом Шенона) в напрямі від екватора до Південного полюса (Wouw et al., 2008).

Можна навести принаймні дві причини виявленого зниження рівня генетичного поліморфізму в напрямку від о. Кінг-Джордж до о-вів Аргентинського архіпелагу. Острів Кінг-Джордж, на відміну від о-вів Аргентинського архіпелагу, під час останнього плейстоценового максимуму, як уже вказувалось, через свої фізико-географічні особливості не зазнавав повного зледеніння (Sugden, Clapperton, 1977). На ньому та на сусідніх островах архіпелагу залишалися льодовикові оази, де могли пережити зледеніння осередки *D. antarctica*, що дозволило виду певною мірою зберегти своє різноманіття в цьому районі Антарктики. Із цим цілком погоджується знахідка на о. Кінг-Джордж унікального варіанту ВТС1-2 (див. наступний підрозділ), що вказує на участь у формуванні генофонду цієї метапопуляції різноманітного спадкового матеріалу рослин з різним походженням. З іншого боку, заселення Аргентинських о-вів відбулося пізніше, і там, очевидно, проявився ефект засновника. Іншою причиною порівняно низького генетичного різноманіття рослин з району Аргентинського архіпелагу можна вважати більш суворі кліматичні умови (цей район розташований приблизно на 330 км далі від екватора порівняно з о. Кінг-Джордж), вплив яких проявляється в періодичному значному скороченні чисельності популяцій, наслідком чого є зниження генетичної гетерогенності.

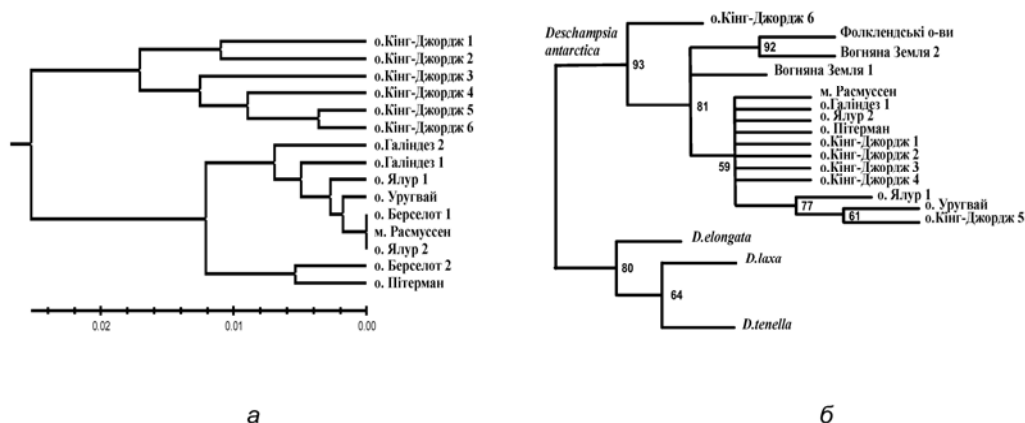


Рис. 2. Схеми, які ілюструють географічну диференціацію та філогенетичні зв'язки рослин *D. antarctica* з Прибережної Антарктики: (а) дендрограма генетичної подібності, побудована методом UPGMA на основі коефіцієнтів Жакарда за результатами RAPD-аналізу; (б) дендрограма, побудована методом «найближчого зв'язування» (*neighbor-joining method*) для ділянки VTC1-2 рДНК *D. antarctica* і родинних видів. Вказано значення бутстреп-підтримки вузлів.

3.3. Аналіз поліморфізму рДНК

Визначено послідовність клонованої ділянки рДНК, яка охоплювала VTC1, 5,8S рДНК і VTC2, у 12 рослин *D. antarctica*, зібраних у різних районах Прибережної Антарктики. Довжина аналізованого фрагмента була однаковою для всіх клонів, збігалася з розміром цієї ділянки рДНК *D. antarctica* з Південної Америки (арх. Вогняна Земля й Фолклендські о-ви), знайденої в GenBank (AM041213-AM041215), і становила 595 п.н. VTC1 і VTC2 мали довжину 217 і 215 п.н. відповідно. Послідовності клонів були подібні на 96,3%, найбільшу кількість варіабельних нуклеотидів виявлено в VTC1 (6,5%), меншу – в VTC2 (2,3%) і найменшу – в гені 5,8S рРНК (1,8%).

Методами «найближчого зв'язування» (*neighbor-joining method*) і максимальної економії (*maximum parsimony*) побудовано дендрограми, що відбивають подібність послідовностей ділянки VTC1-2 *D. antarctica* з різних популяцій (рис. 2б). Як зовнішню групу використали *D. laxa*, *D. elongata*, *D. tenella* з Південної Америки та Нової Зеландії, послідовності VTC1-VTC2 яких були взяті з бази даних GenBank (AM041238, AM041230, AM041244). Дендрограми, побудовані обома методами, були практично ідентичні і відрізнялися лише величинами бутстреп-підтримки окремих гілок. Отримані результати з високою вірогідністю показують приналежність вивчених представників *D. antarctica* до однієї монофілетичної групи.

Порівняння послідовностей показало, що у *D. antarctica* є як мінімум чотири варіанти VTC1-VTC2, які відрізняються між собою окремими нуклеотидними замінами. Еволюційно вихідним був варіант № 1, властивий рослинам з Південної Америки. У більшості популяцій з Антарктики виявлено похідний від нього варіант № 2, який відрізняється однією нуклеотидною заміною у VTC1. Варіант № 3, виявлений у трьох антарктичних зразках (о. Ялур 1, о. Уругвай, о. Кінг-Джордж 5), походить від варіанта № 2 і відрізняється від нього двома замінами в VTC1 і VTC2. Найбільш своєрідним є варіант № 4 із зразка о. Кінг-Джордж-6, що займає на дендрограмі базальне положення (рис. 2б). Він відрізняється від найбільш близької до нього послідовності з Південної Америки (Вогняна Земля 1) вісьмома нуклеотидними замінами, сім з яких припадають на VTC1 і одна – на VTC2.

Сьогодні домінує думка, що формування сучасної флори Антарктики відбувалося після закінчення останнього зледеніння за рахунок міграції рослин із Субантарктики (Smith, 1994).

Поряд з цим висловлено припущення про можливість збереження двох видів судинних рослин в антарктичній флорі з преплейстоценового часу (Parnikoza et al. 2011). Отримані дані показують, що в метапопуляції *D. antarctica* о. Кінг-Джордж присутні три варіанти рДНК (№№ 2, 3 і 4), а у рослин з району Аргентинських островів – два варіанти (№№ 2 і 3), які відрізняються від варіанта № 1, характерного для рослин з Вогняної Землі та Фолклендських островів. Можливі два пояснення цих даних: (1) Поліморфізм ділянки ВТС1-2 в антарктичних популяціях *D. antarctica* зумовлений кількараровою міграцією рослин з генетично різних популяцій; (2) Антарктичні варіанти ВТС1-2 виникли вже на території Антарктики після імміграції рослин. Друге пояснення представляється логічним для еволюційно похідних варіантів №№ 2 і 3, які відрізняються лише окремими мутаціями. Поява варіантів №№ 2 і 3 відбулася, мабуть, на ранніх етапах колонізації Антарктики, оскільки на сьогодні обидва варіанти досить широко поширені. У той же час знахідка на о. Кінг-Джордж унікального варіанта № 4 підтверджує думку про формування генофонду *D. antarctica* в Антарктиці на основі кількох вихідних генотипів. Остаточне з'ясування походження варіанта № 4 вимагає додаткових досліджень із залученням більшої кількості зразків рослин з різних географічних районів.

4. Висновки

Популяційно-генетичний аналіз рослин *D. antarctica* Desv. з Прибережної Антарктики з використанням RAPD-маркерів виявив існування географічного градієнту генетичної мінливості цього виду: популяції рослин, що зростають у більш високих широтах, властивий нижчий рівень генетичної мінливості за такими параметрами, як загальна кількість поліморфних фрагментів та індекс Шенона. Порівняльний аналіз послідовностей ділянки ВТС1-2 рДНК показав присутність в антарктичних популяціях *D. antarctica* варіантів, що відрізняються специфічними мутаціями від рослин з Вогняної землі та Фолклендських о-вів. Виявлений в антарктичних популяціях поліморфізм рДНК можна пояснити як комбінацією різних генотипів, що потрапили сюди в результаті кількох міграцій, так і пізнішою появою нових мутацій.

Роботу виконано за підтримки Національного антарктичного наукового центру в рамках проекту № Н/3-2011 «Розробка системи біоіндикації кліматичних змін в Прибережній Антарктиці за параметрами динаміки наземних рослинних ценозів», Відділу біології Антарктики Польської академії наук, особисто проф. S. Rakusa-Suszczewski, а також Гранта Президента України для молодих учених (GP/F11/0048).

Література

Парнікоза І., Смикла Є., Козерецька І. et al. Особливості антарктичної трав'янистої тундри в умовах двох різних екологічних градієнтів // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2009. – Т. 7, №2. – С. 218–226.

Парнікоза І., Іванець В., Дикий І. та ін. Домініканський мартин як потенційний переносник ключових компонентів наземних екосистем у прибережній Антарктиці // Антарктика і глобальні системи Землі: нові виклики та перспективи. V Міжн. Антарктична конф. (м. Київ, Україна, 17–19.05.2011 р.) / Київ, 2011. – С. 232–233.

Спиридонова Е.В., Адноф Д.М., Андреев І.О. et al. Стабільність генома високопродуктивної кліткової лінії K-27 *Rauwolfia serpentina* Benth. при изменении условий выращивания // Biopolymers and Cells. – 2007. – Т.23, №2. – С. 86–92.

Kozeretska I.A., Parnikoza I.Yu., Mustafa O. et al. Development of Antarctic herb tundra vegetation near Arctowski station, King George Island // Polar Science. – 2010. – V. 3. – P. 254–261.

Marsz A.A. The origin and classification of ice free areas ("oases") in the region of the Admiralty Bay (King George Island, The South Shetland Islands, West Antarctica) / In: Ecology of the Antarctic Coastal Oasis / Eds. P. Prošek. et al. – Brno: Masaryk University, 2001. – P. 7–18.

Parnikoza I., Kozeretska I., Kunakh V. Vascular plants of the Maritime Antarctic: Origin and adaptation // *Am. J. Plant Sci.* – 2011. – 2. – P. 381–395.

Parnikoza I.Yu., Miryuta N.Yu., Maidanyuk D.N. et al. Habitat and leaf cytogenetic characteristics of *Deschampsia antarctica* Desv. in the Maritime Antarctica // *Polar Science.* – 2007. – V. 1. – P. 121–128.

Schlüter P.M., Harris S.A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data // *Mol. Ecol. Notes.* – 2006. – V.6. – P. 569–572.

Sugden D.E., Clapperton C.M. The maximum ice extent on island groups in the Scotia Sea Antarctica // *Quaternary Research.* – 1977. – V. 7, №2. – P. 268–282.

Swofford D.L. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4. Champaign, Illinois: National Illinois History Survey. 2002.

Torres-Mellado G.A., Jana R., Casanova-Katny M.A. Antarctic hairgrass expansion in the South Shetland archipelago and Antarctic Peninsula revisited // *Polar. Biol.* – 2011. – V. 34. – P. 1679–1688.

Vera M.L. Colonization and demographic structure of *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis* along an altitudinal gradient on Livingston Island, South Shetland Islands, Antarctica // *Polar Res.* – 2011. – № 30. – P. 7146, DOI: 10.3402/polar.v30i0.7146.

White T.J., Bruns T., Lee S. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR protocols: a guide to methods and applications* / Eds. Innis M., Gelfand D., Sninsky J., White T. – San Diego: Academic Press, 1990. – P. 315–322.

Wouw van de M.J., Dijk van P.J., Huiskes A.H.L. Regional genetic diversity patterns in Antarctic hairgrass (*Deschampsia antarctica* Desv.) // *J. Biogeogr.* – 2008. – V. 35. – P. 365–376.

Smith R.I.L. Terrestrial Plant Biology of the Sub-Antarctic and Antarctic / In: *Antarctic Ecology* Vol. 1 / Ed. Laws R.M. – London: Academic Press, 1984. – P. 61–162.