

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
доцент Нипорко О. Ю.

Протокол № _____ засідання кафедри

від “ _____ ” _____ 2024 р.

**ВИВЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ МІНЛИВОСТІ COLOBANTHUS
QUITENSIS З РАЙОНУ АРГЕНТИНСЬКИХ ОСТРОВІВ ТА
ПРИЛЕГЛИХ ДІЛЯНОК ЗЕМЛІ ГРЕЙЯМА НА ОСНОВІ ОЦІНКИ
ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ β -ТУБУЛІНУ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студента спеціальності 162 Біотехнологія
ОП «Високі технології (біотехнологія)»

Целікова Артема Павловича

Науковий керівник від кафедри
доцент кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
д. б. н. **Нипорко Олексій Юрійович**

Робота виконана у відділі популяційної генетики
Інститут харчових біотехнологій та геноміки НАН України
під керівництвом д.б.н. **Ярослав Васильович Пірко**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

АНОТАЦІЯ

Дипломна робота магістра: сторінок 31, рисунків 5, таблиць 1, джерел 41, без додатків.

Целіков А. П. ВИВЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ МІНЛИВОСТІ *COLOBANTHUS QUITENSIS* З РАЙОНУ АРГЕНТИНСЬКИХ ОСТРОВІВ ТА ПРИЛЕГЛИХ ДІЛЯНОК ЗЕМЛІ ГРЕЙЯМА НА ОСНОВІ ОЦІНКИ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ β -ТУБУЛІНУ. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 162 Біотехнологія ОП «Високі технології (біотехнології)».

В межах науково-дослідної роботи було проведено пошук та аналіз інформації в базах даних анотованих послідовностей генів тубуліну в геномі *C. quitensis*, але така інформація відсутня.

Оптимізовано протокол виділення геномної ДНК із сухих зразків перлинниці антарктичної та виділено ДНК з 128 зразків з 14 популяцій.

Підібрано умови для полімеразної ланцюгової реакції для дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну. Аналіз показав два типи ДНК-профілів серед популяцій перлинниці, що може бути обумовлено умовами існування. Окремі генотипи виділено серед деяких популяцій коLOBантусу, що свідчить про меншу диференційну спроможність цього методу для дослідження перлинниці.

Ключові слова: *Colobantus quitensis*; ТВР; Антарктида.

ЗМІСТ

ЗМІСТ	3
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ПОПЕРЕДНІХ ДОСЛІДЖЕНЬ COLOBANTHUS QUITENSIS	6
1.1. Вступ	6
1.2. Метаболічні та захисні реакції на екологічні подразники	6
1.3. Генетичний контроль і компроміси	7
1.4. Механізми стресостійкості	7
1.5. Дослідження хлоропластів та геному	8
1.6. Екофізіологічні показники та зміна клімату	9
1.7. Значення для досліджень зміни клімату	10
РОЗДІЛ 2. ТВР ЯК МЕТОД ГЕНОТИПУВАННЯ	11
2.1. Генетичні методи в дослідженнях рослин	11
2.2. Гени β -тубуліну та їх поліморфізм	11
2.3. Застосування ТВР у <i>Colobanthus quitensis</i>	12
2.4. ПЛР у генотипуванні рослин	13
2.5. Регуляторні та еволюційні аспекти генів тубуліну	13
РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	14
3.1. Рослинний матеріал	14
3.2. Оптимізація протоколу виділення ДНК зі зразків перлинниці антарктичної	16
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	18
ВИСНОВКИ	25
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	27

ВСТУП

Еволюційні процеси в екстремальних екотопах завжди захоплювали біологів. У зоні Антарктики зростають лише два види покритонасінних рослин — Перлинниця антарктична (*Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl.) та Щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* É.Desv). Дослідження генетичної структури популяцій подібних видів в екстремальних умовах мають виключну наукову цінність, задля розуміння адаптивних механізмів в еволюційному процесі як конкретного виду, так і певних груп організмів та екосистем в цілому.

У представленій роботі об'єктом дослідження стали популяції Перлинниці антарктичної, зібрані в районах узбережжя Землі Греяма. Хоча ареал розповсюдження *C. quitensis* дуже протяжний в широтному напрямку, ізольовані острівні популяції характеризуються широким спектром умов існування, що потенційно може спричиняти появу різноманітних екотипів виду в цьому регіоні. Крім того, досі залишається невідомою причина зростання даного виду виключно на фрагментованих обмежених ділянках загального ареалу.

Генетична мінливість *Colobanthus quitensis* вивчена недостатньо, а більшість наявних даних є застарілими. Завдяки високій консервативності послідовностей генів цитоскелетних білків у різних організмах, інтрони цих генів є ідеальними мішенями для маркерних систем, заснованих на поліморфізмі довжини інтронів.

Метод ТВР, який фокусується на поліморфізмі довжини інтронів генів β -тубуліну, був ефективно застосований до різноманітних вищих рослин і водоростей. Цей метод виявився ефективним для виявлення рівнів генетичного поліморфізму в острівних популяціях *Deschampsia antarctica* в Антарктичному регіоні. Для *C. quitensis* використання декількох систем ДНК-маркерів, націлених на інтрони генів цитоскелетних білків (α -, β - і γ -тубулінів та актину), виявило низький рівень генетичного поліморфізму,

причому ТВР є найбільш чутливим методом виявлення генетичної мінливості.

У нашому дослідженні ми сформуваємо такий перелік завдань:

Етап I:

- Виділення геномної ДНК із зразків *C. quitensis*, зібраних під час 26-ї ОАЕ та попередніх українських антарктичних експедицій.
- Контроль якості виділеної ДНК за допомогою спектрофотометрії та електрофорезу в агарозному гелі.
- Оптимізація умов ПЛР для оцінки поліморфізму довжини першого та другого інтронів генів β -тубуліну.

Етап II:

- Розділення продуктів ПЛР за допомогою ПААГ-електрофорезу.
- Оцінка довжини отриманих фрагментів.
- Аналіз отриманих результатів.
- Проведення молекулярно-генетичного профілювання *C. quitensis*, шляхом оцінки поліморфізму довжини першого та другого інтронів генів β -тубулінів.
- Оцінка міжпопуляційної гетерогенності та вивчення розподілу *C. quitensis* на Аргентинських островах та прилеглих територіях.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ПОПЕРЕДНІХ ДОСЛІДЖЕНЬ *COLOBANTHUS QUITENSIS*

1.1. Вступ

Антарктична рослина *Colobanthus quitensis* є винятковим видом покритонасінних, який успішно розвивається в екстремальних природних умовах Антарктиди. Цей вид став основним об'єктом вивчення відповіді рослин на зміну клімату та екологічний стрес, завдяки своїм винятковим адаптаційним можливостям. Розуміння метаболічних та захисних механізмів *C. quitensis* має вирішальне значення для прогнозування реакції антарктичної рослинності на кліматичні зміни, що постійно продовжуються. Ця частина узагальнює сучасні дослідження фізіологічних, генетичних та екологічних реакцій *C. quitensis* на різні стимули навколишнього середовища, надаючи всебічний огляд його адаптивних стратегій.

1.2. Метаболічні та захисні реакції на екологічні подразники

Природні стимули, такі як коливання температури, інтенсивність освітлення та наявність поживних речовин у ґрунті, відіграють ключову роль у формуванні метаболічних та захисних реакцій *C. quitensis*. Bertini та ін. (2022) продемонстрували, що ці стимули виступають рушійною силою для метаболічного перепрограмування та захисних механізмів у *C. quitensis* [1]. Це перепрограмування включає в себе зміни в ефективності фотосинтезу, шляхах дихання та синтезі захисних сполук для пом'якшення наслідків стресу. Наприклад, підвищене вироблення антиоксидантів допомагає поглинати реактивні форми кисню, що утворюються в умовах стресу, тим самим захищаючи клітинні структури та функції.

Крім того, дослідження Vertini et al. виявило активацію специфічних метаболічних шляхів, які сприяють стійкості до стресу, таких як накопичення осмопротекторів і вторинних метаболітів. Ці сполуки не тільки допомагають підтримувати осмотичний баланс, але й забезпечують захист від атак патогенів, що свідчить про багатоаспектний підхід до подолання негативних наслідків екологічного стресу [1].

1.3. Генетичний контроль і компроміси

Генетична система, що лежить в основі адаптивних реакцій *C. quitensis*, включає в себе компроміси між ростом і стресостійкістю. Galleguillos et al. (2023) дослідили генетичний контроль над балансом між цвітінням та посухостійкістю у *C. quitensis*, вказуючи на важливість генетичної регуляції у врівноваженні цих конкуруючих потреб [2]. Дослідження показало, що певні генетичні локуси відповідають за контроль часу цвітіння та здатність рослини витримувати умови посухи. Цей компроміс має вирішальне значення для максимізації репродуктивного успіху, забезпечуючи при цьому виживання в періоди нестачі води.

Більше того, генетична архітектура *C. quitensis* дозволяє їй тонко налаштовувати свої фізіологічні процеси у відповідь на сигнали навколишнього середовища. Наприклад, гени, що беруть участь у регуляції продихової провідності та ефективності використання води, диференційовано експресуються в умовах посухи, оптимізуючи водозбереження без суттєвого зниження фотосинтетичної активності [2].

1.4. Механізми стресостійкості

C. quitensis демонструє різні фізіологічні механізми, що дозволяють переносити низькі температури, які є поширеним стресовим фактором в Антарктиді. Клементе-Морено та ін. (2020) виявили, що цитохромні шляхи

дихання та метаболізм сірки мають вирішальне значення для підтримки стресостійкості в умовах низьких температур [3]. Альтернативні шляхи дихання, зокрема залучення цитохромного шляху, допомагають підтримувати вироблення АТФ, коли основні шляхи порушуються внаслідок впливу низьких температур. Крім того, метаболізм сірки відіграє важливу роль у детоксикації шкідливих побічних продуктів клітинного метаболізму, забезпечуючи таким чином цілісність і функціонування клітин.

Також було показано, що адаптація до холоду підвищує фотосинтетичну продуктивність і зменшує фотоінгібування у *C. quitensis*. Дослідження показали, що адаптація до холоду призводить до підвищення ефективності фотосистеми II (PSII) та стабілізації тилакоїдних мембран, які є критично важливими для підтримання фотосинтезу за від'ємних температур [11, 19]. Цей процес адаптації включає активацію генів холодостійкості та накопичення відповідних розчинів, що захищають клітинні структури від пошкоджень, спричинених заморожуванням.

1.5. Дослідження хлоропластів та геному

Розуміння генетичного складу *C. quitensis* є фундаментальним для з'ясування його адаптивних стратегій. Повний геном хлоропластів *C. quitensis* було просеквеновано, що дало змогу зрозуміти його генетичну організацію та потенційні функціональні адаптації [4]. Секвенування геному хлоропластів виявило наявність унікальних генетичних елементів, які можуть сприяти підвищенню ефективності фотосинтезу та стресостійкості. Наприклад, гени, що кодують хлоропластні білки, які беруть участь у репарації та складанні фотосистемних комплексів, є висококонсервативними і, можливо, зазнають позитивного добору.

Порівняльні геномні дослідження зі спорідненими видами також виявили специфічні генні дуплікації та перебудови, які можуть надавати адаптивні переваги *C. quitensis*. Ці геномні адаптації, ймовірно, є відповіддю

на високий рівень ультрафіолетового випромінювання та екстремально низькі температури, характерні для антарктичного середовища [9].

Браво і Гріффіт (2005) досліджували антифризну активність антарктичних рослин, у тому числі *C. quitensis*. Вони виявили білки, які інгібують рекристалізацію льоду, що має вирішальне значення для запобігання пошкодженню клітин під час циклів замерзання-відтавання [21]. Ці білки є важливою адаптацією для виживання при низьких температурах, що ще більше підкреслює складні механізми, які використовує *C. quitensis* для виживання в суворих умовах навколишнього середовища.

1.6. Екофізіологічні показники та зміна клімату

Взаємодія між біологічними факторами та зміною клімату суттєво впливає на екофізіологічні показники *C. quitensis*. Torres-Díaz та ін. (2016) дослідили, як змодельовані зміни клімату та біологічні взаємодії модулюють продуктивність *C. quitensis* у його природній екосистемі, виявляючи складні реакції на зміну умов навколишнього середовища [8]. Дослідження показало, що підвищення температури та зміна структури опадів впливають на ріст рослин, репродуктивний успіх та взаємодію з ґрунтовою мікробіотою та іншими видами рослин.

Крім того, популяції *C. quitensis* демонструють асиметричну реакцію на змодельоване глобальне потепління залежно від їхнього широтного походження. Асуїна-Rodríguez та ін. (2017) продемонстрували, що північні популяції, які загалом перебувають у більш м'яких умовах, показали більшу чутливість до потепління порівняно з південними популяціями, які пристосовані до більш суворих умов [7]. Така диференційована реакція свідчить про те, що генетичне різноманіття виду відіграє вирішальну роль у його загальній стійкості до зміни клімату.

Парнікоза та ін. (2007) розглянули гіпотезу міграційних реліктів для *C. quitensis* та *Deschampsia antarctica*, припускаючи, що ці види є залишками

минулих кліматичних станів, що може пояснити їхнє сучасне поширення та адаптивні особливості [14]. Ця історична перспектива забезпечує контекст для розуміння тиску природнього добору, який сформував адаптивні механізми, що спостерігаються у *C. quitensis* сьогодні.

Парнікоза та ін. (2022) дослідили вплив факторів мікросередовища на різноманітність і функції ризосферних мікробіомів, пов'язаних з *Deschampsia antarctica*, яка тісно пов'язана з *C. quitensis*. Це дослідження підкреслює важливість мікробних взаємодій у стресостійкості рослин та функціонуванні екосистем, забезпечуючи ширший екологічний контекст для адаптивних стратегій *C. quitensis* [10].

1.7. Значення для досліджень зміни клімату

Дослідження *C. quitensis* надають цінну інформацію про ширші наслідки зміни клімату для антарктичних екосистем. Очікується, що прискорення потепління клімату суттєво змінить динаміку рослин в Антарктиді, а *C. quitensis* слугуватиме біоіндикатором цих змін [5, 22]. У міру прогресування кліматичних змін розуміння адаптаційних механізмів *C. quitensis* матиме важливе значення для прогнозування зміни антарктичних рослинних угруповань та розробки стратегій їх збереження.

Дослідження метаболічного перепрограмування та адаптивних стратегій цього виду сприяють нашому розумінню того, як антарктична рослинність може впоратися з майбутніми екологічними викликами. Наприклад, поглиблення знань про генетичну основу стресостійкості може стати основою для селекційних програм, спрямованих на підвищення стійкості споріднених видів [15, 17].

РОЗДІЛ 2. ТВР ЯК МЕТОД ГЕНОТИПУВАННЯ

2.1. Генетичні методи в дослідженнях рослин

Вивчення генетичної мінливості *Colobanthus quitensis*, зокрема з Аргентинських островів та Землі Греяма, дає важливе уявлення про адаптивність та еволюційний потенціал цього антарктичного виду. Цей розділ присвячений генетичним методам, що використовуються для оцінки поліморфізму довжини інтронів у генах β -тубуліну, що є важливим аспектом розуміння генетичного різноманіття та стійкості.

Генетичні методи відіграють ключову роль у дослідженні рослин, пропонуючи інструменти для аналізу генетичної мінливості, функцій генів та еволюційних зв'язків. Такі методи, як ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція), секвенування ДНК і молекулярні маркери, зробили революцію в цій галузі, уможлививши точний генетичний аналіз і маніпуляції.

ДНК-маркери, включаючи SSR (прості повтори послідовностей), AFLP (поліморфізм довжини фрагментів) і SNP (однонуклеотидний поліморфізм), широко використовуються для генотипування рослин. Кожен з цих маркерів має свої переваги та застосування залежно від конкретних потреб дослідження [25].

2.2. Гени β -тубуліну та їх поліморфізм

Гени β -тубулінів кодують білки тубуліни, які є важливими компонентами мікротрубочок, що беруть участь у поділі клітин, внутрішньоклітинному транспорті та структурній цілісності. Варіабельність цих генів, особливо в ділянках інтронів, може надати цінну інформацію про генетичне різноманіття та адаптаційний потенціал. Поліморфізм довжини інтронів (Intron length polymorphism, ILP) є корисним маркером для генетичних досліджень завдяки його високій варіабельності та простоті аналізу.

ІЛР - це метод, який використовується для виявлення генетичних варіацій шляхом ампліфікації та порівняння довжини інтронних ділянок у певних генах. Цей метод передбачає розробку праймерів, які приєднуються до інтронних ділянок, ампліфікацію цих ділянок за допомогою ІЛР та аналіз отриманих фрагментів за допомогою гель-електрофорезу або капілярного електрофорезу [26, 29]. Перевагами ІЛР є простота, економічність та висока дискримінаційна здатність.

Поліморфізм на основі тубуліну (ТВР) - це специфічне тип ІЛР, спрямований на інтронні ділянки генів тубулінів, таких як β -тубулін. ТВР успішно застосовується у різних видів рослин для оцінки генетичного різноманіття, структури популяцій та еволюційних зв'язків [23, 24]. Надійність і достовірність методу роблять його цінним інструментом для генетичних досліджень *C. quitensis*.

Бревіаріо та ін. (2007) продемонстрували, що ТВР забезпечує високий поліморфізм і роздільну здатність, що робить його придатним для визначення дактилоскопічних видів рослин [31]. Крім того, Vardini та ін. (2004) підкреслили функціональну значущість послідовностей ТВР, які можуть відображати еволюційні зміни [27].

2.3. Застосування ТВР у *Colobanthus quitensis*

Застосування ТВР до *C. quitensis* включає кілька етапів: збір зразків рослин з різних географічних місць, екстракцію ДНК, ампліфікацію інтронів β -тубуліну та аналіз поліморфізмів за допомогою електрофорезу. Цей метод дозволяє дослідникам виявляти генетичну мінливість та оцінювати структуру популяцій [32, 36].

Парнікоза та ін. (2020) використали аналіз інтронів генів актину, α - та γ -тубуліну для оцінки генетичного поліморфізму *C. quitensis* з Аргентинських островів, продемонструвавши значну генетичну мінливість, яка може мати

вирішальне значення для адаптації до різноманітних умов навколишнього середовища [32].

2.4. ПЛР у генотипуванні рослин

ТВР застосовується не лише до *S. quitensis*, але й має ширше застосування в генотипуванні рослин. Наприклад, Braglia та ін. (2020) надали вичерпний посібник щодо застосування ПЛР для різних видів бобових, який ілюструє його універсальність та надійність [28]. Аналогічно, Galasso та ін. (2015) використовували ТВР для геномного дактилоскопіювання видів *Camelina*, показавши його ефективність у диференціації близькоспоріднених видів [30].

Удосконалення ТБП підвищило його ефективність і точність. Gavazzi та ін. (2012) представили технічні вдосконалення з використанням капілярного електрофорезу, що підвищує роздільну здатність і пропускну здатність аналізу ТБП [26]. Ці вдосконалення особливо корисні для великомасштабних досліджень і детального генетичного картування.

2.5. Регуляторні та еволюційні аспекти генів тубуліну

Розуміння регуляторних та еволюційних аспектів генів тубуліну дає змогу глибше зрозуміти їхній поліморфізм. Блюм та ін. (2008) розглянули фосфорилювання рослинних тубулінів, яке впливає на їхню функцію та стабільність [38]. Бревіаріо (2008) продовжив дослідження регуляторних механізмів та еволюційної історії генів тубулінів рослин, висвітлюючи їхню роль в адаптації та розвитку рослин [39].

РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

3.1. Рослинний матеріал

В роботі були використані зразки *C. quitensis* (Kunth) Bartl. з районів узбережжя Землі Греяма (Табл. 1, Рис. 1). Матеріал був зібраний під час експедиційного сезону 26-ї УАЕ та попередніх українських антарктичних експедицій.

Місце збору матеріалу	Локалізація	Кількість зразків
Galindez Island	S 65.247989°, W 64.242719°;	10
Cape Tuxen	S 65.27242°, W 64.12600°;	14
Barthelot Island	S 65.328840°, W 64.162580°	11
Cape Perez	S 65.407790°, W 64.09802°;	6
Port Charkot	S 65.067375°, W 64.015122	5
Pourquoi-Pas Island	S 67.683333, W 67.466667	10
Palmer, Anvers	S 64.55, W 63.583333	10
Blaiklock Island	S 67.55, W 67.066667	10
Leonie Island	S 67.6 W 68.35	11
Lagotellerie Island	S 67.887778, W 67.400556	10
Deception Island	S 62.976944, W 60.65	10
Livingston Island	S 62.6, W 60.5	5
King George Island	S 62.033333, W 58.35	13
Irizar Island	S 65.219067°, W 64.200167°	3

Punta Arenas	S 52.919943°, W 70.895024	4
--------------	------------------------------	---

Таблиця 1. Місця збору рослинних зразків *C. quitensis* (Kunth) Bartl. з різних природних острівних популяцій Антарктики



Рис. 1. Місця збору рослинних зразків *C. quitensis* (Kunth) Bartl. з різних природних острівних популяцій Антарктики

Загалом було досліджено 132 зразки.

3.2. Оптимізація протоколу виділення ДНК зі зразків перлинниці антарктичної

В якості матеріалу для аналізу відбиралися листові платівки, які відразу запаковувалися в окремі ботанічні пакети. Для подальшого використання рослинний матеріал висушували за допомогою силікагелю при кімнатній температурі.

Геномну ДНК екстрагували з листових платівок згідно методу, описаного у статті Wang та ін., 2012 [37], однак були внесені деякі модифікації. Загалом процес виділення складався з наступних етапів:

1. Сухий рослинний матеріал (листя) розтикали в ступці за допомогою пестика до порошкоподібного стану.
2. Додавали Qiagen TissueLyzer (Qiagen, Санта-Кларіта, Каліфорнія).
3. З метою позбавлення тканин від полісахаридів в кожен пробірку додавали до 1,6 мл буферу TNE (200 мМ Тріс-НСl, 250 мМ NaCl, 50 мМ ЕДТА), після чого пробірки тримали на льоду протягом 10 хв.
4. Пробірки центрифугували при максимальній швидкості протягом 5 хв при +4°C.
5. Супернатант виливали та повторювали етапи 3-4.
6. В кожен пробірку додавали приблизно 800 мкл 2×СТАВ-буферу (AppliChem, Дармштадт, Німеччина), 100 мкл 10% Саркозилу (натрієва сіль N-лауроїлсаркозину) та розчин (Sigma-Aldrich, Великобританія). Після чого пробірки енергійно струшували на вортексі.
7. Пробірки інкубували у водяній бані при температурі 65 °C протягом 45 хв та періодично перемішували під час інкубування.
8. В кожен пробірку додавали приблизно 700 мкл розчину 24:1 хлороформ/ізоаміловий спирт (AppliChem) та перемішували до утворення суспензії.
9. Центрифугували при максимальній швидкості протягом 10 хв, та верхню (водну) фазу обережно переносили до нових пробірок

10. В кожну пробірку додавали приблизно 10 мкл РНКазы (Qiagen) та інкубували при 37 °С протягом 30 хв.
11. Повторювали етапи 8-9.
12. Додавали половину об'єму 5 М NaCl (Sigma-Aldrich) та 0,7 об'єму холодного ізопропанолу (VWR International S.A.S, Франція), перемішували шляхом перевертання пробірок.
13. Пробірки інкубували при +4°С приблизно 45 хв для осадження.
14. Після інкубації пробірки центрифугували протягом 10 хв на максимальній швидкості при +4°С та супернатант обережно зливали.
15. В кожну пробірку додавали 700 мкл холодного 70% етанолу (VWR International Ltd., Великобританія), перемішували шляхом перевертання та центрифугували протягом 5 хв на максимальній швидкості.
16. Розчин видаляли, осад повністю висушували, після чого осад розчиняли в 200 мкл високосолевого TE буфері (10 мМ Тріс рН 8,0, 1 мМ ЕДТА, 1 М NaCl).
17. ДНК переосаджували шляхом додавання двох об'ємів (400 мкл) холодного 95% етанолу и перемішували шляхом перевертання.
18. Пробірки центрифугували на повній швидкості протягом 10 хв та зливали етанол.
19. Осад повністю висушували, а потім два рази промивали з використанням 75% етанолу та 95% етанолу, відповідно.
20. Осад висушували та розчиняли в буфері TE (10 мМ Тріс рН 8,0, 1 мМ ЕДТА).

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Встановивши оптимальні умови для проведення молекулярно-генетичного аналізу, за допомогою методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну було досліджено генетичну мінливість перлинниці антарктичної з району Аргентинських островів та прилеглих ділянок Землі Грейяма. У рамках дослідження було проаналізовано 128 зразків *S. quitensis* з 14 острівних популяцій, використовуючи метод ТВР для оцінки поліморфізму довжини першого інтрону генів β -тубуліну.

На Рис. 2 та Рис. 3 представлені ДНК профілі *S. quitensis* з інтронами генів β -тубуліну, які візуалізувалися в діапазоні від 380 п.н. до 1900 п.н. Важливо зазначити, що аналізувалися виключно фрагменти в діапазоні від 380 п.н. до 1200 п.н., оскільки вони є найбільш чіткими серед усіх повторів експерименту. Фрагменти, розташовані вище 1200 п.н., не аналізувалися та вважалися артефактами і нецільовими продуктами ампліфікації.

Результати ТВР аналізу показали, що ДНК профілі зразків *S. quitensis*, зібраних з островів Galindez, Barthelot, Tuxen, King Georg, Livingston, Deception, Lagotelleria та Irizar, містили по 12 ідентичних ампліконів інтронів генів β -тубуліну довжиною від 400 п.н. до 1200 п.н. Водночас зразки *S. quitensis* з інших 6 острівних популяцій, зокрема Perez, Palmer Anvers, Charkot, Pourquoi-Pas, Blaiklock та Leonie, мали відмінні від першої групи ДНК профілі. Зокрема, були виявлені як спільні з іншими зразками фрагменти, так і додаткові унікальні фрагменти інтронів довжиною 380 п.н., 465 п.н., 510 п.н., 540 п.н., 725 п.н. При цьому у цих зразків відсутні фрагменти 475 п.н., 565 п.н. та 675 п.н., які присутні у зразків з інших популяцій. Виключенням є зразок 87 з острова Pourquoi-Pas, ДНК профіль якого містить унікальний амплікон довжиною 845 п.н., що вирізняє цей зразок серед усіх проаналізованих рослин *S. quitensis*.

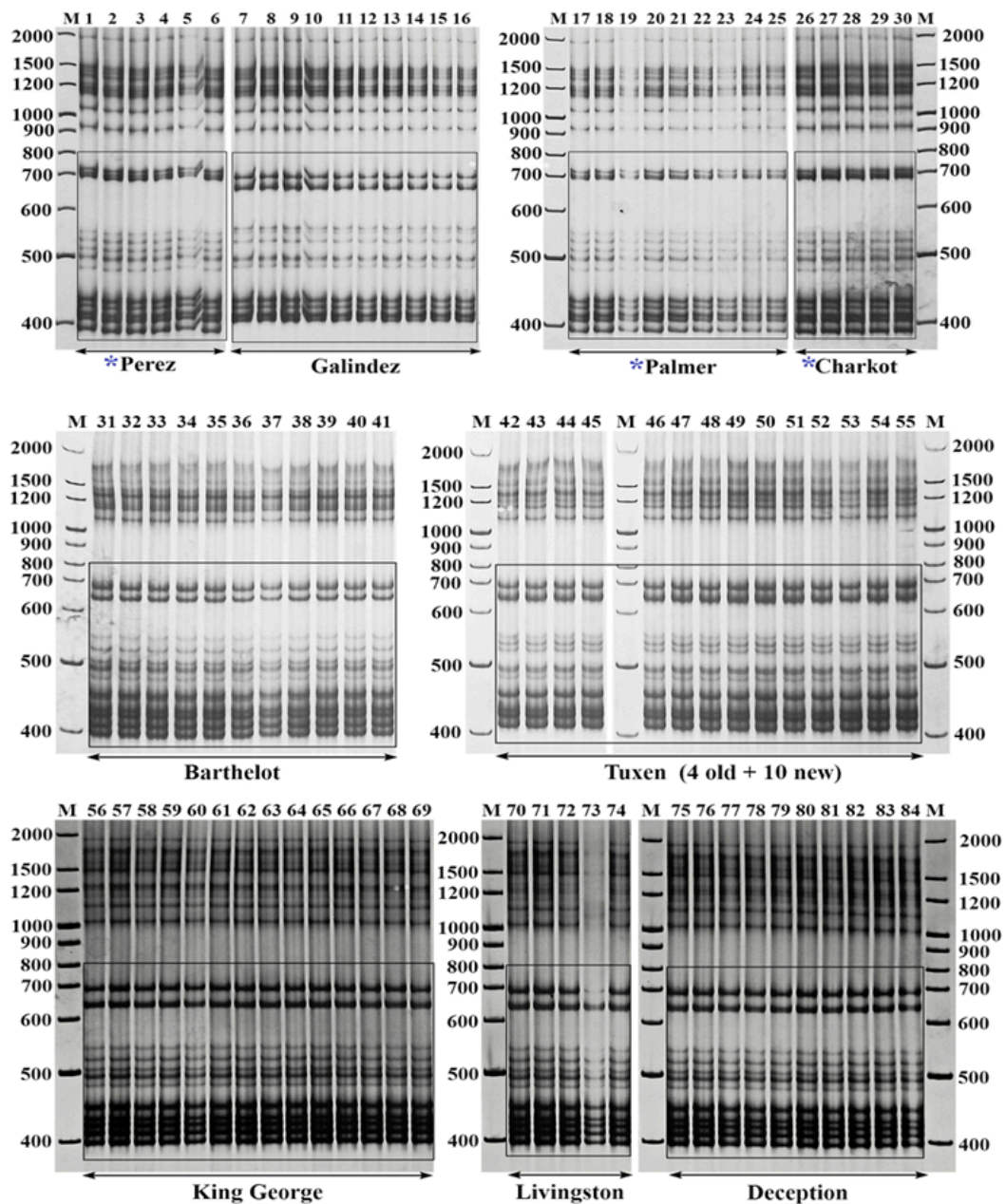


Рис. 2. Електрофоретичні спектри ампліфікованих фрагментів, що містять перший інтрон генів β -тубуліну у *C. quitensis* з ізольованих островних популяцій. 1-84 – номери зразків популяцій *C. quitensis* з різних островів Антарктики; М – ДНК-маркер «100bp Ladder»; NF- неспецифічний фрагмент ДНК (nonspecific fragment). Прямокутниками позначено зони поліморфних фрагментів.

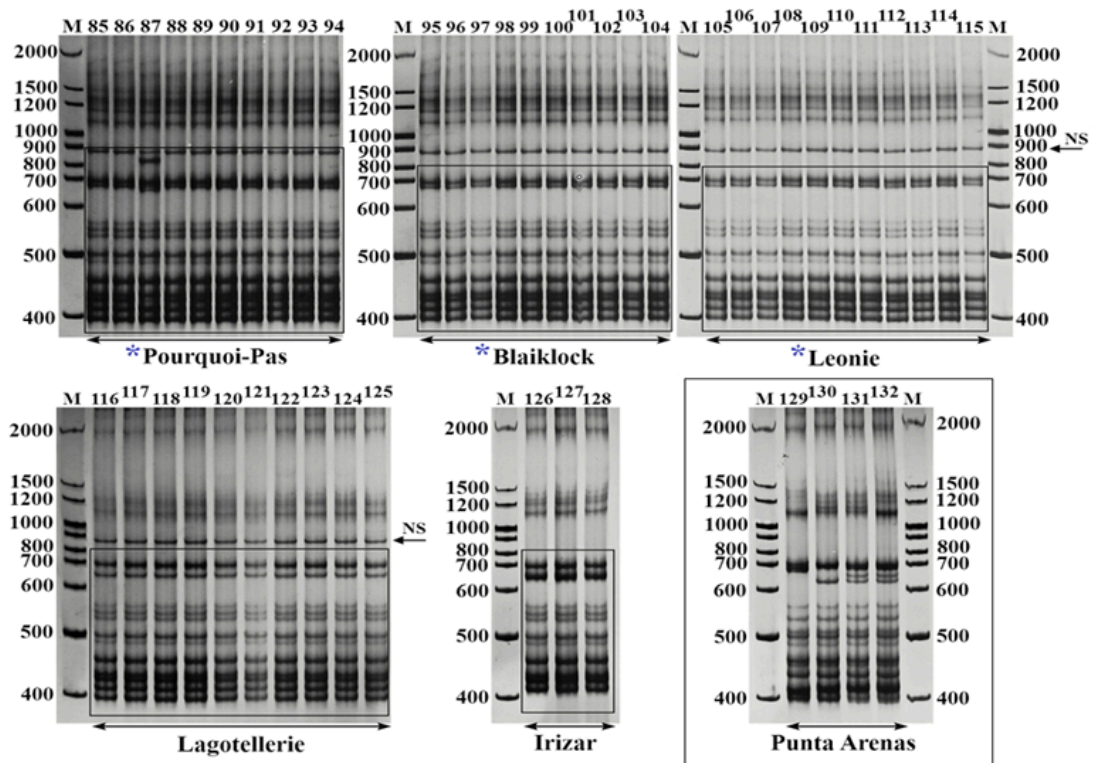


Рис. 3. Електрофоретичні спектри ампліфікованих фрагментів, що містять перший інтрон генів β -тубуліну у *C. quitensis* з ізольованих островних популяцій. 85-128 – номери зразків популяцій *C. quitensis* з різних островів Антарктики; 129-132 – номери зразків невідомого виду роду *Colobantus*, М – ДНК-маркер «100bp Ladder»; NF- неспецифічний фрагмент ДНК (nonspecific fragment). Прямокутниками позначено зони поліморфних фрагментів.

Загалом, результати аналізу поліморфізму довжини першого інтрону генів β -тубуліну показують, що серед досліджених популяцій перлинниці спостерігаються лише два типи ДНК-профілю: один характерний для популяцій з Perez, Palmer Anvers, Charkot, Pourquoi-Pas, Blaiklock, Leonie, а інший – з Galindez, Barthelot, Tuxen, King Georg, Livingston, Deception, Lagotellerie, Irizar. Це може бути обумовлено умовами існування досліджених вибірок.

Крім того, були проаналізовані чотири зразки *Colobanthus* (вид невідомий), зібрані в Punta Arenas (Чилійська Антарктика) (Рис. 3, Зразки 129-132). ДНК-профілі цих зразків значно не відрізнялися за кількістю та

розподілом ампліконів перших інтронів генів β -тубуліну. Загалом фрагменти візуалізувалися в діапазоні довжин від 400 п.н. до 1200 п.н., що ймовірно є спільною ознакою для представників роду *Colobanthus*. Встановлено, що ДНК-профілі цих зразків містять 9-11 ампліконів інтронів генів β -тубуліну. Поліморфні фрагменти інтронів візуалізувалися в зонах від 600-700 п.н. та 1000-1200 п.н. Одночасно в зоні від 400 п.н. до 500 п.н. розташовані амплікони інтронів, ідентичні ампліконам *C. quitensis*.

Базуючись на вихідних морфологічних даних, отриманих під час збору матеріалу, а також на результатах оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну, можна стверджувати, що проаналізовані зразки невідомого виду не є представниками виду *C. quitensis*, але безперечно належать до роду *Colobanthus*. Оцінюючи місце розташування точки збору даних зразків, а саме острів Punta Arenas, було висловлено припущення, що проаналізовані рослини можуть належати до видів *C. subulatus* або *C. lycopodoides*, які зустрічаються у флорі цієї місцевості.

Для тих же 128 зразків *C. quitensis* було проведено аналіз шляхом оцінки поліморфізму другого інтрону генів β -тубуліну (метод сТВР). Цей альтернативний підхід доцільно використовувати в окремих випадках, коли не вдається якісно диференціювати рослинні генотипи за допомогою ТВР методу.

В результаті сТВР аналізу встановлено, що кожен з проаналізованих зразків *C. quitensis* містив чіткі та відтворювані амплікони інтронів генів β -тубуліну в діапазоні від 300 п.н. до 1500 п.н. (рис. 5-6). Важливо зазначити, що утворені фрагменти візуалізувалися в трьох зонах: 300-400 п.н., 500-600 п.н., 700-1500 п.н. і були охарактеризовані як мономорфні. ДНК-профілі деяких зразків вирізнялися серед усіх проаналізованих, оскільки мали додаткові амплікони інтронів генів β -тубуліну (на рисунку позначені стрілками). Зокрема, зразок 3 (Perez) містив фрагмент довжиною 590 п.н., зразок 7 (Galindez) – 570 п.н. та 625 п.н., зразок 12 (Galindez) – 590 п.н. та 400 п.н., зразок 36 (Barthelot) – 410 п.н., зразки 73, 74 (Livingston) – 400 п.н.

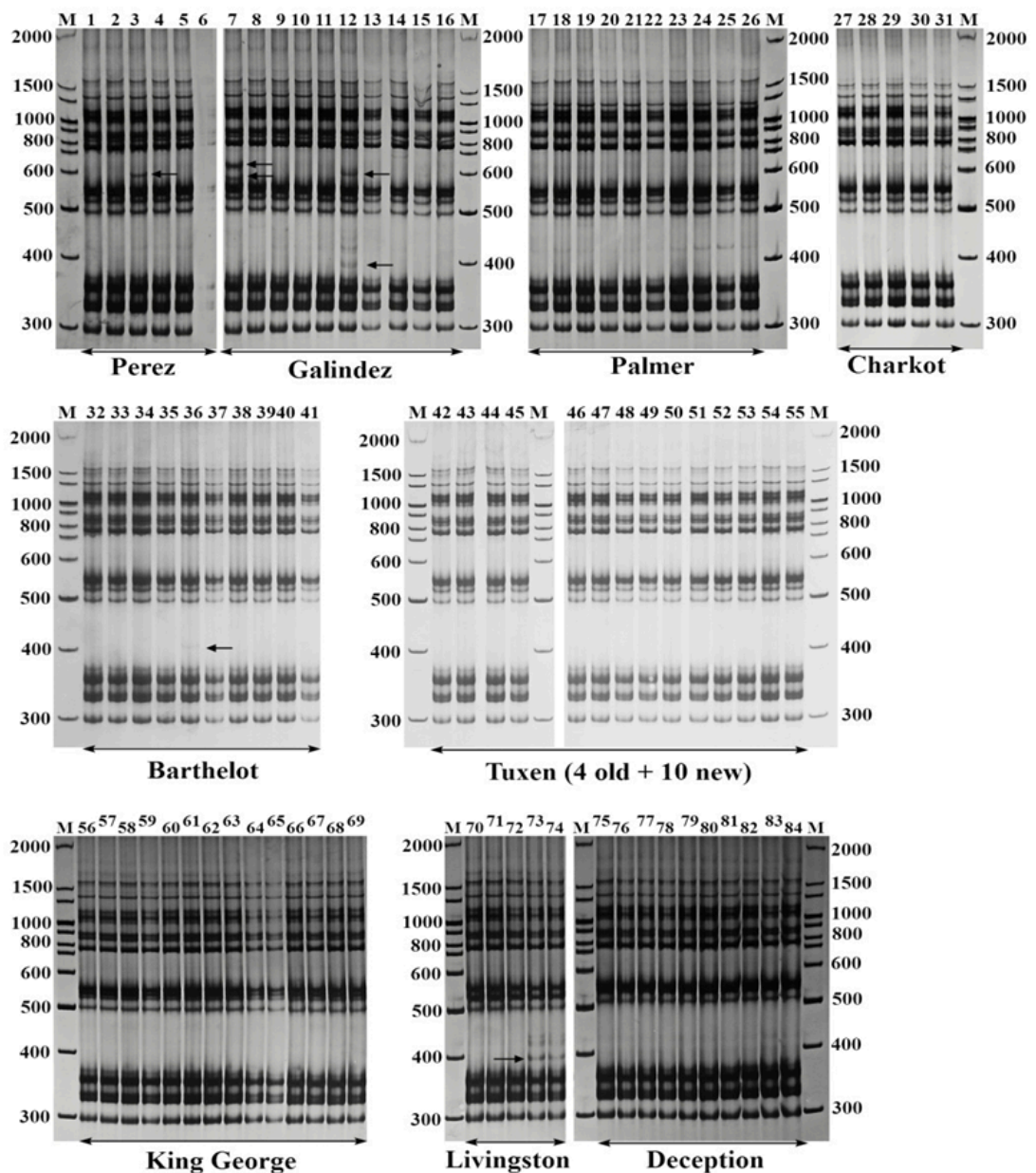


Рис. 4. Електрофоретичні спектри ампліфікованих фрагментів, що містять другий інтрон генів β -тубуліну у *C. quitensis* з ізольованих острівних популяцій. 1-84 – номери зразків популяцій *C. quitensis* з різних островів Антарктики; М – ДНК-маркер «100bp Ladder». Стрілками позначено зони поліморфних фрагментів.

Загалом встановлено, що метод оцінки поліморфізму довжини другого інтрону генів β -тубуліну не зміг диференціювати острівні популяції *C.*

quitensis між собою. Проте, метод сТВР дозволив виокремити унікальні генотипи в межах окремих досліджених популяцій.

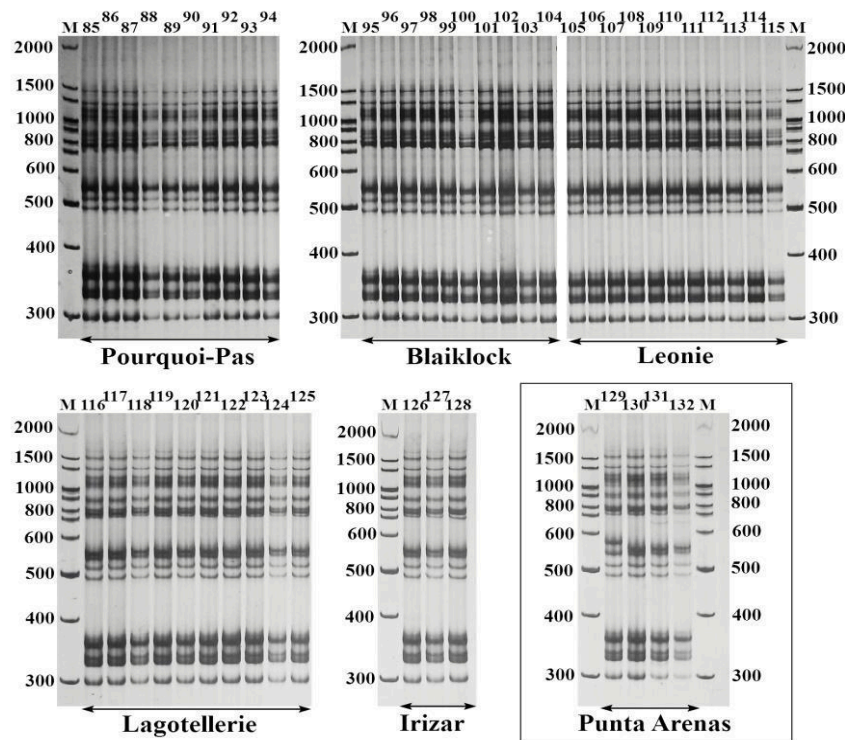


Рис. 5. Електрофоретичні спектри ампліфікованих фрагментів, що містять другий інтрон генів β -тубуліну у *C. quitensis* з ізольованих островних популяцій. 85-128 – номери зразків популяцій *C. quitensis* з різних островів Антарктики; 129-132 – номери зразків невідомого виду роду *Colobantus*, М – ДНК-маркер «100bp Ladder». Стрілками позначено зони поліморфних фрагментів.

За допомогою сТВР методу було також проаналізовано чотири зразки колобантусу невідомого виду (Рис. 4, зразки 129-132). Встановлено, що їхні ДНК-профілі значно не відрізнялися від ДНК-профілів *C. quitensis*, оскільки містили ідентичні амплікони інтронів генів β -тубуліну в діапазоні довжин від 300 п.н. до 1500 п.н. На перший погляд, результати сТВР аналізу могли б свідчити про належність цих рослин до виду *C. quitensis*, проте вихідні морфологічні дані, зафіксовані під час збору матеріалу, не підтверджують це.

Таким чином, сТВР метод виявився неефективним для диференціації зразків роду *Colobanthus* на видовому рівні.

Загалом, оцінка поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну показала низький рівень генетичного поліморфізму колобантусу в досліджуваному регіоні Антарктики. Це, ймовірно, пов'язано з історичними особливостями формування антарктичних популяцій *D. antarctica* та *S. quitensis*, які, згідно з однією з гіпотез, зазнали суттєвого скорочення чисельності під час останнього зледеніння або ж зникли зовсім і заселилися повторно, а потім, за умов формування сприятливих умов, швидко розповсюдилися на всі придатні для заселення території за допомогою птахів, утворивши популяції з низьким рівнем генетичного різноманіття [33].

Також встановлено, що метод оцінки поліморфізму довжини першого інтрону генів β -тубуліну (ТВР метод) є більш ефективним порівняно з методом оцінки поліморфізму довжини другого інтрону генів β -тубуліну (сТВР метод) для диференціації зразків *S. quitensis* на популяційному рівні. Однак, сТВР метод виявився більш інформативним для характеристики окремих генотипів в межах окремих острівних популяцій.

Додатково, результати проведених досліджень підтверджують ефективність та доцільність використання методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у молекулярно-генетичних дослідженнях різних екотипів перлинниці антарктичної.

ВИСНОВКИ

1. Широкий аналіз досліджень *Colobanthus quitensis* підкреслює його чудову здатність адаптуватися до екстремальних умов Антарктиди за допомогою різних метаболічних, генетичних та екофізіологічних механізмів. Ці адаптації мають вирішальне значення для його виживання і слугують моделлю для розуміння реакції рослин на зміну клімату. Подальші дослідження *C. quitensis* матимуть важливе значення для прогнозування та пом'якшення впливу глобальних кліматичних змін на антарктичні екосистеми.
2. Використання ТВР для вивчення генетичної мінливості *Colobanthus quitensis* пропонує потужний інструмент для розуміння адаптивних стратегій цього виду. Аналізуючи поліморфізм інтронів β -тубуліну, дослідники можуть отримати уявлення про генетичне різноманіття та стійкість *C. quitensis*, що має вирішальне значення для прогнозування його реакції на зміни навколишнього середовища та розробки стратегій збереження.
3. Був оптимізований протокол виділення геномної ДНК із сухих зразків і підібрані умови проведення полімеразної ланцюгової реакції для аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у перлинниці антарктичної.
4. Результати аналізу поліморфізму довжини першого інтрону генів β -тубуліну показують, що серед досліджених популяцій перлинниці виявлено лише два типи ДНК-профілів: один характерний для популяцій з островів Perez, Palmer Anvers, Charkot, Pourquoi-Pas, Blaiklock, Leonie, а інший – для популяцій з Galindez, Barthelot, Tuxen, King Georg, Livingston, Deception, Lagotelleria та Irizar.

5. Аналіз поліморфізму довжини другого інтрону генів β -тубуліну дозволив виокремити окремі генотипи в межах деяких популяцій колобантусу (у 4 з 15 досліджених). Це свідчить про меншу здатність цього варіанту ТВР-методу до диференціації між популяціями перлинниці антарктичної.
6. Загалом, на основі аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну було виявлено низький рівень генетичного поліморфізму антарктичного колобантусу, що, ймовірно, пов'язано з геохронологічними особливостями формування антарктичних популяцій.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bertini L, Proietti S, Fongaro B, et al. Environmental Signals Act as a Driving Force for Metabolic and Defense Responses in the Antarctic Plant *Colobanthus quitensis*. *Plants (Basel)*. 2022;11(22):3176.
2. Galleguillos C, Acuña-Rodríguez IS, Torres-Díaz C, et al. Genetic control underlying the flowering-drought tolerance trade-off in the Antarctic plant *Colobanthus quitensis*. *Plant Cell Environ*. 2023;46(10):3158-3169.
3. Clemente-Moreno MJ, Omranian N, Sáez P, et al. Cytochrome respiration pathway and sulphur metabolism sustain stress tolerance to low temperature in the Antarctic species *Colobanthus quitensis*. *New Phytol*. 2020;225(2):754-768.
4. Kang Y, Lee H, Kim MK, et al. The complete chloroplast genome of Antarctic pearlwort, *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*. 2016;27(6):4677-4678.
5. Cannone N, Malfasi F, Favero-Longo SE, et al. Acceleration of climate warming and plant dynamics in Antarctica. *Curr Biol*. 2022;32(7):1599-1606.e2.
6. Cho SM, Lee H, Jo H, et al. Comparative transcriptome analysis of field- and chamber-grown samples of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl, an Antarctic flowering plant. *Sci Rep*. 2018;8(1):11049.
7. Acuña-Rodríguez IS, Torres-Díaz C, Hereme R, Molina-Montenegro MA. Asymmetric responses to simulated global warming by populations of *Colobanthus quitensis* along a latitudinal gradient. *PeerJ*. 2017;5:e3718.
8. Torres-Díaz C, Gallardo-Cerda J, Lavin P, et al. Biological Interactions and Simulated Climate Change Modulates the Ecophysiological Performance of *Colobanthus quitensis* in the Antarctic Ecosystem. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164844.
9. Androsiuk P, Jastrzębski JP, Paukszto Ł, et al. The complete chloroplast genome of *Colobanthus apetalus* (Labill.) Druce: genome organization and comparison with related species. *PeerJ*. 2018;6:e4723.

10. Prekrasna I, Pavlovska M, Miryuta N, et al. Antarctic Hairgrass Rhizosphere Microbiomes: Microscale Effects Shape Diversity, Structure, and Function. *Microbes Environ.* 2022;37(2):ME21069.
11. Bascuñán-Godoy L, Sanhueza C, Cuba M, et al. Cold-acclimation limits low temperature induced photoinhibition by promoting a higher photochemical quantum yield and a more effective PSII restoration in darkness in the Antarctic rather than the Andean ecotype of *Colobanthus quitensis* Kunt Bartl (Caryophyllaceae). *BMC Plant Biol.* 2012;12:114.
12. Bravo LA, Saavedra-Mella FA, Vera F, et al. Effect of cold acclimation on the photosynthetic performance of two ecotypes of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *J Exp Bot.* 2007;58(13):3581-90.
13. Rosa LH, Almeida Vieira Mde L, Santiago IF, Rosa CA. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol.* 2010;73(1):178-189.
14. Parnikoza IY, Maidanuk DN, Kozeretska IA. Are *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. migratory relicts? *Tsitol Genet.* 2007;41(4):36-40.
15. Bertini L, Cozzolino F, Proietti S, et al. What Antarctic Plants Can Tell Us about Climate Changes: Temperature as a Driver for Metabolic Reprogramming. *Biomolecules.* 2021;11(8):1094.
16. Barrera A, Acuña-Rodríguez IS, Ballesteros GI, et al. Biological Soil Crusts as Ecosystem Engineers in Antarctic Ecosystem. *Front Microbiol.* 2022;13:755014.
17. Day TA, Ruhland CT, Grobe CW, Xiong F. Growth and reproduction of Antarctic vascular plants in response to warming and UV radiation reductions in the field. *Oecologia.* 1999;119(1):24-35.
18. Mosyakin SL, Bezusko LG, Mosyakin AS. Origins of native vascular plants of Antarctica: comments from a historical phytogeography viewpoint. *Tsitol Genet.* 2007;41(5):54-63.

19. Alberdi M, Bravo LA, Gutiérrez A, et al. Ecophysiology of Antarctic vascular plants. *Physiol Plant*. 2002;115(4):479-486.
20. Genomic Resources Development Consortium; Arthofer W, Bertini L, Caruso C, et al. Genomic Resources Notes accepted 1 February 2015 - 31 March 2015. *Mol Ecol Resour*. 2015;15(4):1014-5.
21. Bravo LA, Griffith M. Characterization of antifreeze activity in Antarctic plants. *J Exp Bot*. 2005;56(414):1189-96.
22. Smith RI. Vascular plants as bioindicators of regional warming in Antarctica. *Oecologia*. 1994;99(3-4):322-328.
23. Braglia L, Gavazzi F, Gianì S, Morello L, Breviario D. Tubulin-Based Polymorphism (TBP) in Plant Genotyping. *Methods Mol Biol*. 2023;2638:387-401.
24. Morello L, Braglia L, Gavazzi F, Gianì S, Breviario D. Tubulin-Based DNA Barcode: Principle and Applications to Complex Food Matrices. *Genes (Basel)*. 2019;10(3):229.
25. Amiteye S. Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*. 2021;7(10):e08093.
26. Gavazzi F, Casazza AP, Depedro C, Mastromauro F, Breviario D. Technical improvement of the TBP (tubulin-based polymorphism) method for plant species detection, based on capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2012;33(18):2840-51.
27. Bardini M, Lee D, Donini P, Mariani A, Gianì S, Toschi M, Lowe C, Breviario D. Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome*. 2004;47(2):281-91.
28. Braglia L, Gavazzi F, Morello L, Gianì S, Nick P, Breviario D. On the applicability of the Tubulin-Based Polymorphism (TBP) genotyping method: a comprehensive guide illustrated through the application on different genetic resources in the legume family. *Plant Methods*. 2020;16:86.

29. Wang X, Zhao X, Zhu J, Wu W. Genome-wide investigation of intron length polymorphisms and their potential as molecular markers in rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* 2005;12(6):417-427.
30. Galasso I, Manca A, Braglia L, Ponzoni E, Breviario D. Genomic Fingerprinting of *Camelina* Species Using cTBP as Molecular Marker. *Am J Plant Sci.* 2015;6:1184-1200.
31. Breviario D, Baird WV, Sangoi S, Hilu K, Blumetti P, Giani S. High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined β -tubulin introns. *Mol Breed.* 2007;20:249–259.
32. Rabokon A, Postovoitova A, Bilonozhko Y, et al. Assessment of *Colobanthus quitensis* genetic polymorphism from the Argentine Islands region (maritime Antarctic) by actin, α - and γ -tubulin gene intron analysis. *Ukrainian Antarctic Journal.* 2020;1:93-101.
33. Sagarin RD, Gaines SD. The ‘abundant centre’ distribution: to what extent is it a biogeographical rule? *Ecol Lett.* 2002;5(1):137–147.
34. Eckert C, Samis K, Loughheed S. Genetic variation across species’ geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Mol Ecol.* 2008;17(5):1170–1188.
35. Kang Y, Lee H, Kim MK, et al. The complete chloroplast genome of Antarctic pearlwort, *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae). *Mitochondrial DNA.* 2016;27:4677–4678.
36. Koc J, Androsiuk P, Chwedorzewska KJ, et al. Range-wide pattern of genetic variation in *Colobanthus quitensis*. *Polar Biol.* 2018;41:2467–2479.
37. Braglia LB, Manca AM, Mastromauro FM, Breviario D. cTBP: A successful intron length polymorphism (ILP)–based genotyping method targeted to well defined experimental needs. *Diversity.* 2010;2:572–585.
38. Blume YA, Lloyd CV, Yemets AI. Plant tubulin phosphorylation. In: *The Plant Cytoskeleton: Key Tool for Agrobiotechnology.* Springer-Verlag; 2008. p. 145–159.

39. Breviario D. Plant tubulin genes: Regulatory and evolutionary aspects. In: Plant Cell Monographs. Springer-Verlag; 2008.
40. Galasso I, Manca A, Braglia L, et al. h-TBP: an approach based on intron-length polymorphism for the rapid isolation and characterization of the multiple members of the β -tubulin gene family in *Camelina sativa* (L.) Crantz. *Mol Breed*. 2010;28:635–645.
41. Wang N., Thomson M., Bodles W.J.A. et al. Genome sequence of dwarf birch (*Betula nana*) and cross-species RAD markers. *Molecular Ecology*. – 2013. – Vol. 22, Is 11. – P. 3098–3111. doi: 10.1111/mec.12131.