

ПАЦЮК М. К.[✉], СЕВАСТЬЯНОВА І. Ю.

Житомирський державний університет імені Івана Франка,

Україна, 10008, м. Житомир, вул. В. Бердичівська, 40, ORCID: 0000-0003-1185-8101

[✉] kostivna@ukr.net, 0971695724ФЕНОТИПОВИЙ ПОЛІМОРФІЗМ КОНЮШИНИ ПОВЗУЧОЇ
(*TRIFOLIUM REPENS* L.)

Мета. Проаналізувати поліморфізм *Trifolium repens* L. за рисунком «сивої» плями на листках, які зростають на територіях з різним антропогенним навантаженням (околиці м. Житомира). **Методи.** Аналіз та визначення фенотипів рослин за Brewbaker, 1955; кластерний аналіз; визначення частки різних фенотипів та генотипів, індексу співвідношення фенів, показників внутрішньої популяційної розмаїтості (μ), подібності популяцій (r) та критерію ідентичності (I). **Результати.** У популяціях *T. repens* вперше проаналізовано різноманітність фенотипових класів за ознакою рисунок «сивої» плями на листку. Найбільша кількість фенів характерна для паркових зон м. Житомира – 11 (*O*, *A*, *АН*, *B*, *C*, *E*, *D*, *ВН*, атипічна форма *O*, атипічна форма *A*, атипічна форма *АН*), найменша – для берегу річки (4 фени (*O*, *C*, *A*, *B*)), для галявин – 5 фенів (*O*, *B*, *A*, *АН*, *D*). За критерієм ідентичності від перших двох популяцій відрізняється генетичний склад третьої популяції. Для першої та другої вибірок спільними фенами є *O*, *A*, *B*; для другої та третьої – *O*, *A*, *B*, *C*, для першої та третьої – *O*, *A*, *АН*, *B*, *D*. **Висновки.** Для паркових зон характерні рослини з атипічною формою листової пластинки трьох фенотипів (*O*, *A*, *АН*), а також нормальні рослини з фенотипами *ВН* та *E*. Для вивчених популяцій конюшини повзучої з різних територій спільними фенами є *O*, *A* та *B*.

Ключові слова: *Trifolium repens* L., «сива» пляма на листку, фен, паркові зони, берег річки, галявина, м. Житомир.

Дослідження популяційної мінливості живих організмів пов'язано з вивченням поліморфізму, який проявляється в генетичній гетерогенності, що виникає внаслідок мутаційного процесу, результатом якого є нові спадкові ознаки. Багато організмів піддаються впливу антропогенних факторів, в результаті чого змі-

нюється метаболізм, що виникає внаслідок мутацій. Для синантропної рослинності характерне утворення нових ознак в забруднюючому середовищі. Ряд видів рослин використовуються науковцями в якості біоіндикаторів для оцінки ступеню екологічної чистоти місцевості [1, 3, 4, 6, 11–14]. Конюшина повзуча (*Trifolium repens* L.) використовується для визначення забруднення повітря та ґрунту [7, 15]. В якості ознаки розглядається спадковий поліморфізм за формою, розміщенням, забарвленням, інтенсивністю прояву «сивої» плями на листку [3, 4, 10]. Різноманітність рослин обумовлена серією множинних алелей гену *v*. Наявність «сивої» плями на листках – ознака домінантна (*V*), її відсутність – рецесивна (*v*). В генотипі рослин присутня лише одна пара алелей, їх взаємодія визначає розвиток ознаки, так як кожна має певну ступінь домінування. Різні алелі на окремих етапах онтогенезу порушують нормальний розвиток хлорофілу в палісадних клітинах світлової зони листків й призводять до скорочення в них кількості хлоропластів, навіть до їх повної відсутності. За даними ряду робіт, зокрема Дж. Брюейкера, налічується 11 (або більше) алелів цього гену [2]. Доведено, що в більш сприятливих умовах середовища відмічається переважання генотипів *vv* та *IVV*, а в середовищах існування, які піддаються антропогенному впливу, спостерігається велике різноманіття генотипів [2–4, 6, 11–14]. В останні роки дослідженню морфогенетичного поліморфізму природних популяцій *T. repens* за рисунком «сивої» плями на листку присвячено чимало досліджень (Торяник В. М., Біда Т. М., 2021; Торяник В. М., Міронець Л. П., 2020) [3, 4, 11–14]. У 2019 р. досліджено особливості морфогенетичного поліморфізму *T. repens* за малюнком «сивої» плями на листку на антропогенно змінених територіях села Житне Роменського району Сумської області та встановлено, що морфогенетична

© ПАЦЮК М. К., СЕВАСТЬЯНОВА І. Ю.

гетерогенність локальних популяцій *T. repens* визначається комбінаціями серії 8 алелів: *v*, *V*, *VH*, *VB*, *VBh*, *VP*, *VF*, *VS*. На території Житомирської області подібні дослідження не проводилися, тому метою роботи було проаналізувати поліморфізм *T. repens* за рисунком «сивої» плями на листках, які зростають на територіях з різним антропогенним навантаженням (околиці м. Житомира).

Матеріали і методи

У травні–вересні 2023–2024 рр. в різних районах м. Житомира зібрані рослини *T. repens*. Для проведення дослідження вивчалась місцевість в різних напрямленнях й розроблявся маршрут з урахуванням достатньої кількості рослин. Вивчення «сивих» плям у конюшини повзучої проводилося в період цвітіння рослини. Збір проводився таким чином, щоб з однієї рослини (або з куртини, яка може бути клоном) брати лише один листок. Для цього листки збирали на відстані 5 кроків один від одного. Всього проаналізовано 4080 рослин на 25 пробних ділянках. Проводили підрахунок листків рослин *T. repens* з різними формами «сивих» плям на листках.

Аналіз та визначення фенотипів рослин проводили за [2] (рис. 1).

Дані накопичували у базах даних у вигляді електронних таблиць Microsoft Excel 2007. Розрахунки значення індексу подібності складу фенів різних територій, побудову дендрограми та визначення її стабільності за допомогою Bootstrap-аналізу проводили з використанням програми PAST 1.18 [8, 9].

Зустрічність різних фенотипів та генотипів розраховували як частку листків певного генотипу/фенотипу у вибірці, зібраних з певної досліджуваної території, що виражається у відсотках.

Похибка репрезентативності (*m*) розраховувалася за формулою:

$$m = \sqrt{\frac{pq}{n}}, \text{ де}$$

p – зустрічність фенотипу/генотипу,

q = 100 – *p*.

Оцінка ступеня забруднення ґрунтів розраховувалася з використанням індексу співвідношення фенів (*ICΦ*):

$$IC\Phi = 100 \times (n_1 + n_2 + n_3 + nn) / N (\%), \text{ де}$$

*n*₁ – число рослин без малюнку; *n*₂, *n*₃, *nn*

– число рослин з певним малюнком; *N* – загаль-

на кількість всіх обстежених куртин конюшини повзучої.

Для порівняльної характеристики генетичного різноманіття в трьох популяціях *T. repens* оцінювалися показники внутрішньої популяційної розмаїття (*μ*), частки рідкісних фенотипів (*h*), враховувався показник подібності популяцій (*r*) та критерій ідентичності (*I*) [5].

Результати та обговорення

У ході збору матеріалу в різних районах м. Житомира виявлено 11 фенотипових класів: без плям – *O* (1538); повна $\wedge$ -подібна пляма – *A* (631); повна $\wedge$ -подібна висока пляма *АН* (343); $\wedge$ -подібна розірвана пляма – *B* (785); центральна пляма – *C* (348); трикутна низька пляма при основі – *E* (89); велика суцільна пляма при основі – *D* (76); розірвана висока пляма – *BH* (84); атипічна форма *O* (чотирилистник) – 34; атипічна форма *A* (п'ятилистник) – 28; атипічна форма *АН* (чотирилистник) – 23.

Встановленим фенотиповим класам відповідають генотипи: без плям – *vv*; повна $\wedge$ -подібна пляма – *VV*; повна $\wedge$ -подібна висока пляма – *VHVV*; $\wedge$ -подібна розірвана пляма – *VBVB*; центральна пляма – *VPVP*; трикутна низька пляма при основі – *VSVS*; велика суцільна пляма при основі – *VFVF*; розірвана висока пляма – *VBhVBh*; атипічна форма листової пластинки без плям (чотирилистник); атипічна форма листової пластинки з повною $\wedge$ -подібною плямою (п'ятилистник); атипічна форма листової пластинки з повною $\wedge$ -подібною високою плямою (чотирилистник).

Було встановлено, що в досліджених популяціях м. Житомира найчастіше трапляються рослини таких класів: без плям – *vv* (38 %); повна $\wedge$ -подібна пляма – *VV* (15,5 %); повна $\wedge$ -подібна висока пляма – *VHVV* (8 %); $\wedge$ -подібна розірвана пляма – *VBVB* (19 %); центральна пляма – *VPVP* (8,5 %); трикутна низька пляма при основі – *VSVS* (2 %); велика суцільна пляма при основі – *VFVF* (1,9 %); розірвана висока пляма – *VBhVBh* (2 %); атипова *vv* – 0,8 %; атипова *VV* – 0,7 % атипова *VHVV* – 0,6 %.

Велика кількість рослин, які мають мутантний генотип, може свідчити про високий рівень взаємодії зовнішніх або внутрішніх факторів.

	1	2	3	4	5	6	7	8
	v	V	V ^m	V ^s	V ^{ms}	V ^r	V ^r	V ^s
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								

Рис. 1. Гомо- і гетерозиготи за алелем гену *V*, який визначає фенотип листків *T. repens* [2].

Всього було виявлено 11 фенотипових класів, зокрема 3 – з атипичною формою листкової пластинки у формі «чотирилистника» та «п'ятилистника»; при цьому мінімальна кількість різних фенів становила – 4, а максимальна – 11, що говорить про різну ступінь морфогенетичного поліморфізму у рослин конюшини повзучої, яка зростає на територіях з різним ступенем антропогенного навантаження.

Популяції конюшини повзучої в умовах територій з низьким ступенем антропогенного навантаження характеризуються більшою морфологічною однорідністю. У популяції біля берегу річки було виявлено лише 4 фенотипових класів, а в популяціях галявин – 5, у паркових зонах – 11, останні мали, як нормальну, так і атипичну форму листка. Атипична форма листка виявлена лише серед рослин трьох фенотипів (*O*, *A* та *AH*) (табл. 1).

Аналізуючи фенотипову різноманітність у популяціях конюшини повзучої, які зростають на територіях з підвищеним антропогенним

навантаженням (паркові зони), було встановлено найбільшу кількість фенотипових класів у популяціях *T. repens* – 11 фенів: *O*, *A*, *B*, *AH*, *BH*, *C*, *D*, *E*, з атипичною формою листкової пластинки без плями (чотирилистник); з атипичною формою листкової пластинки з повною плямою (п'ятилистник); з атипичною формою листкової пластинки з повною плямою високою (чотирилистник). Окрім того, для паркових зон окрім рослин з нетиповими листковими пластинками характерні й рослини з фенотипом *BH* та *E*. У цих популяціях переважає фенотип *O*, далі за частотою зустрічності йдуть рослини з фенотипами *B* та *AH*.

Популяція конюшини повзучої, яка зростає біля берегу річки за морфологічним поліморфізмом характеризується низьким антропогенним навантаженням. У цих популяціях переважають фенотипи *O* (*vv*), *C* (*VPVP*) та *A* (*VV*), далі за частотою зустрічності йдуть рослини з фенотипом *B* (*VBVB*).

Таблиця 1. Частота трапляння фенотипових класів у популяціях *T. repens* (м. Житомир), %

Генотип, умовне позначення	Фен	Галєвини, різнотрав'я	Берег річки (р. Кам'янка)	Паркові зони (Гідропарк, м. Житомир)
<i>vv</i>	<i>O</i>	42±1,2	36±1,1	34±0,8
<i>VV</i>	<i>A</i>	12±1,1	28±0,8	6±1,1
<i>VHVH</i>	<i>AH</i>	10±1,3	–	14±1,2
<i>VBVB</i>	<i>B</i>	27±0,6	12±0,5	17,5±1,1
<i>VPVP</i>	<i>C</i>	–	22±0,5	3,6±0,3
<i>VSVS</i>	<i>E</i>	–	–	6±0,6
<i>VFVF</i>	<i>D</i>	7±0,5	–	5,1±1,2
<i>VBhVBh</i>	<i>BH</i>	–	–	5,7±1,3
Атипічна форма <i>vv</i> (чотирилистник)	<i>O</i>	–	–	2±1,3
Атипічна форма <i>VV</i> (п'ятилистник)	<i>A</i>	–	–	2±1,2
Атипічна форма <i>VHVH</i> (чотирилистник)	<i>AH</i>	–	–	1,6±0,5

Популяція *T. repens* галєвин характеризується 5 фенотиповими класами: *O* (*vv*), *B* (*VBVB*), *A* (*VV*), *AH* (*VHVH*), *D* (*VFVF*).

З трьох вивчених популяцій конюшини повзучої (галєвин, берегу річки та паркових зон) спільними фенотиповими класами є *O* (пляма відсутня), *A* (з повною плямою) та *B* (з розірваною плямою).

В умовах паркових зон популяція *T. repens* зазнає антропогенного навантаження у вигляді забруднення повітря від найближчих автомагістралей, що обумовлює високу частоту мутаційного процесу та виражається в найбільшій кількості різних фенів даної популяції. Загальний індекс співвідношення фенів (*ICΦ*) становить 35,5 %, що свідчить про невисоку ступінь забруднення ґрунтів.

Загальний індекс співвідношення фенів (*ICΦ*) в популяціях біля берегу річки становить 32,3 %, на галєвинах – 37,08 %, що також свід-

чить про невисоку ступінь забруднення ґрунтів. При цьому в цих популяціях наявні ті ж фени, що і в паркових зонах. Зниження генетичного поліморфізму *T. repens* відбувається внаслідок пригнічення домінування цього виду в рослинних угрупованнях, які характеризуються високим видовим різноманіттям та адаптації рослин й конкуренції між ними.

За результатами кластерного аналізу фенотипові класи у популяціях *T. repens* формують дві групи: у першу потрапили фени, які характерні для паркових зон, у другу – галєвин та берегу річки (вірогідність існування цих двох кластерів складає 100 та 51 % відповідно) (рис. 2). Оригінальність першого комплексу визначають рослини з атипічними листовими пластинками *O*, *A*, *AH* та з фенами *BH* та *E*. Специфіку другого комплексу визначають рослини з фенами *AH* та *D* (характерні для галєвин) та *C* (характерний для берегу річки).

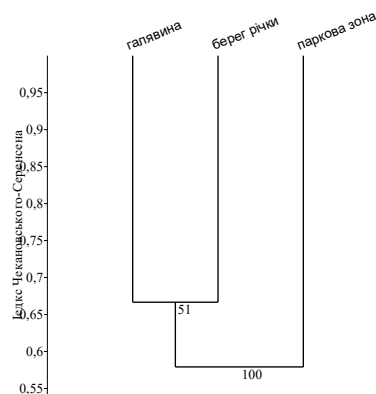


Рис. 2. Подібність у складі фенотипових класів *T. repens* за індексом Чекановського-Серенсена (у вузлах дендрограми вірогідність кластерів у % при 1000 перестановок).

Таблиця 2. Характеристика різноманіття фенотипів в трьох популяціях *T. repens* м. Житомира

Популяції	Частоти фенотипів											Середнє число фенотипів, μ	Частота рідкісних фенотипів, h
	<i>O</i>	<i>A</i>	<i>АН</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<i>ВН</i>	<i>АФО</i>	<i>АФА</i>	<i>АФАН</i>		
Галявини, різнотрав'я	0,42	0,12	0,10	0,27			0,07					3,6±0,13	0,050±0,012
Берег річки	0,36	0,28		0,12	0,22							3,2±0,12	0,041±0,01
Паркові зони	0,34	0,06	0,14	0,18	0,04	0,06	0,05	0,06	0,02	0,02	0,016	8,2±0,14	0,038±0,02

Таблиця 3. Показник попарної подібності та критерій ідентичності для трьох популяцій *T. repens*

Популяції, які порівнюються	Перша-друга	Друга-третя	Перша-третя
Критерій ідентичності, <i>I</i>	62,4	32,5	44,2
Показник попарної подібності, $r \pm s$	0,534±0,016	0,519±0,013	0,532±0,014

За індексом Чекановського-Серенсена найбільша частка спільних фенів спостерігається між галявинами та берегом річки (50 %), найменш подібний склад фенів паркової зони та берегу річки (36 %).

З таблиці 2 видно, що перша та друга популяції майже не відрізняються за середнім числом фенотипів, що свідчить про незначну ступінь різноманітності фенів в цих групах. Частка рідкісних фенотипів досить висока. Генетична різноманітність третьої популяції вища й за частотами фенотипів вона більш вирівняна.

У найбільшій мірі за критерієм ідентичності від перших двох популяцій відрізняється генетичний склад третьої популяції, рослини якої зростають у паркових зонах. Для першої та другої популяції спільними фенами є *O*, *A*, *B*; для другої та третьої – *O*, *A*, *B*, *C*, для першої та третьої – *O*, *A*, *АН*, *B*, *D* (табл. 3).

Висновки

Отже, у популяціях *T. repens* м. Житомира вперше проаналізовано різноманітність феноти-

пових класів за ознакою «рисунок «сивої» плями на листку». Встановлено, що найбільша кількість фенів характерна для паркових зон м. Житомира – 11, найменша – для берегу річки (4 фени), для галявин, які представлені різнотрав'ям – 5 фенів. Встановлено, що для паркових зон характерні рослини з атипичною формою листової пластинки трьох фенотипів (*O*, *A*, *АН*), а також нормальні рослини з фенотипами *ВН* та *E*. Для вивчених популяцій *T. repens* з різних територій (галявин, паркових зон, біля берегу річки) спільними фенами є *O*, *A* та *B*. За індексом Чекановського-Серенсена найбільша частка спільних фенів спостерігається між галявинами та берегом річки (50 %), найменш подібний склад фенів паркової зони та берегу річки (36 %). Чим більше варіантів «сивого» рисунку виявлено на певній території, тим більше мутацій відбувається в гені *V*, отже, множинний алелізм у локусі гена *V T. repens* можна використовувати як показник оцінки антропогенного навантаження на територію, а сама рослина є зручним і доступним біоіндикатором.

References

- Andrae J. White clover establishment and management guide. *University of Georgia. Cooperative Extension Bulletin*. 2016. Vol. 1251. 10 p.
- Brewbaker J. L. V-leaf Markings of White Clover. *J. Hered.* 1955. Vol. XLVI, № 3. P. 115–125.
- Bida T. M. Occurrence of *Trifolium repens* L. in phytocoenoses of anthropogenically altered territories of Zhytne village, Romny district, Sumy region. *Theoretical and applied aspects of research in biology, geography and chemistry: materials of the III All-Ukrainian correspondence scientific conference of students and young scientists* (Sumy, April 30, 2020). Sumy : FOP Tsioma S. P., 2020. P. 12–14. [in Ukrainian]
- Bida T. M., Toryanyk V. M. Features of phenotypic polymorphism of *Trifolium repens* L. by the pattern of gray spots on the leaf in phytocoenoses of pastures with different ecological regimes. *Actual problems of environmental research: Proceedings of the IX International Scientific Conference* (Sumy, May 25–27, 2021). Sumy : Sumy State Pedagogical University named after A. S. Makarenko, 2021. P. 207–209. [in Ukrainian]

5. Educational field practice in genetics. Guidelines for second-year students of the Faculty of Biology. Compiled by Afanasieva K. S., Kiryachenko S. S., Rushkovsky S. R., Lazarenko L. M., Shuvalikov V. B., Kozetska I. A. Kyiv : Phytosociocenir. 2005. 32 p. [in Ukrainian]
6. Gamalero E., Lingua G., Berta G., Glick B. R. Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Can. J. Microbiol.* 2009. Vol. 55 (5). P. 501–514. <https://doi.org/10.1139/W09-010>.
7. Grytsak L., Barna I., Kodliuk I., Selska I., Splavinska Y., Sukar H., Barna S. Bioindication methods for the needs of systematic analysis of environmental quality. Constructive geography and geoecology. *Scientific notes*. 2017. № 2. P. 153–165. [in Ukrainian]. Retrieved from: <http://dspace.tnpu.edu.ua/handle/123456789/9128>.
8. Hamilton R. S., Cresswell A. Iger Innovations, 1999. P. 12–15.
9. Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D. PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. electronic*. 2001. Vol. 4, Iss. 1, Art. 4. P. 1–9.
10. Krupa Z., Krupa M., Gruszecki W. I. Changes in chlorophyll spectral characteristics in rye seedlings grown under heavy metal stress. *Science Access*. CSIRO. 2008. S. 36–008. <https://doi.org/10.1071/SA0403680/>.
11. Toryanyk V. M., Mironets L. P. Morphogenetic polymorphism of *Trifolium repens* by pattern in different territories of Sumy with different anthropogenic load. *Factors of Experimental Evolution of Organisms: a collection of scientific papers*. Kyiv : Vavilov Ukrainian Society of Geneticists and Breeders, 2019. Vol. 25. P. 92–96. [in Ukraine] <https://doi.org/10.7124/FEEQ.v25.1145>.
12. Toryanyk V. M., Mironets L. P. Variability of the “gray” spot pattern on the leaf of *Trifolium repens* L. as a bioindicator of nitrate nitrogen and heavy metals content in agricultural soil. *Factors of experimental evolution of organisms: a collection of scientific papers*. Kyiv : Vavilov Ukrainian Society of Geneticists and Breeders, 2020. Vol. 27. P. 309–313. <https://doi.org/10.7124/FEEQ.v27.1345>. [in Ukrainian]
13. Toryanyk V. M., Bida T. M. Biogeochemical features of different phenotypes of *Trifolium repens* L. on the pastures of Zhytne village, Romny district, Sumy region. *Educational and scientific dimensions of the natural sciences: materials of the II All-Ukrainian correspondence scientific conference* (Sumy, December 8, 2021). Sumy : Sumy State Pedagogical University named after A. S. Makarenko, 2021a. P. 31–33. [in Ukrainian]
14. Toryanyk V. M., Bida T. M. Intrapopulation polymorphism of *Trifolium repens* L. by the pattern of “gray” spot on the leaf in anthropogenically altered areas of Zhytne village, Romny district, Sumy region. *Natural sciences: Collection of scientific papers*. Sumy : Sumy State Pedagogical University named after A. S. Makarenko, 2021b. Is. 18. P. 58–64. [in Ukrainian]
15. Wodala B., Eitel G., Gyula T. N. et al. Monitoring moderate Cu and Cd toxicity by chlorophyll fluorescence and P 700 absorbance in pea leaves. *Photosynthetica*. 2012. Vol. 50 (3). P. 380–386. <https://doi.org/10.1007/s11099-012-0045-3>.

PATSYUK M. K., SEVASTYANOVA I. Yu.

*Zhytomyr Ivan Franko State University,
Ukraine, 10008, Zhytomyr, Velyka Berdychivska str., 40*

PHENOTYPIC POLYMORPHISM OF *TRIFOLIUM REPENS* L.

Aim. To analyze the polymorphism of *Trifolium repens* L. according to the pattern of «gray» spots on leaves growing in areas with different anthropogenic load. **Methods.** Analysis and determination of plant phenotypes according to Brewbaker, 1955; cluster analysis; determination of the proportion of different phenotypes and genotypes, the phen ratio index, indicators of intra-population diversity (μ), population similarity (r) and identity criterion (I). **Results.** In populations of *T. repens*, the diversity of phenotypic classes based on the pattern of the «gray» spot on the leaf was analysed for the first time. The largest number of fens is characteristic of park zones of the city of Zhytomyr – 11 (*O, A, AH, B, C, E, D, BH*, atypical form *O*, atypical form *A*, atypical form *AH*), the smallest – for the river bank (4 fens (*O, C, A, B*)), for meadows – 5 fens (*O, B, A, AH, D*). According to the criterion of identity, the genetic composition of the third population differs from the first two populations. For the first and second samples, the common phens are *O, A, B*; for the second and third – *O, A, B, C*, for the first and third – *O, A, AH, B, D*. **Conclusions.** Park zones are characterized by plants with an atypical leaf blade shape of three phenotypes (*O, A, AH*), as well as normal plants with phenotypes *BH* and *E*. For the studied populations of creeping clover from different areas, the common fens are *O, A* and *B*.

Keywords: *Trifolium repens* L., «gray» spot on the leaf, phene, park areas, river bank, lawn, Zhytomyr city.