

Avtorica prispevka:

Tatjana Vidic, OŠ Simona Jenka Kranj, Slovenija, tatjana.vidic@gmail.com

Velikost genoma je povezana z uspešnostjo preživetja rastlinskih vrst v ekstremnih okoljih

Izvleček

Velikost jedrnega genoma se med evkarionti razlikuje za več kot pet velikostnih razredov. Spremenljivost velikosti genoma ni povezana s kompleksnostjo organizma. Izvor in biološki pomen spremenljivosti še vedno porajata številna vprašanja. Eno od vprašanj je povezano tudi s tem, ali velikost genoma vpliva na preživetje organizma. Geografska porazdelitev rastlin z znanimi velikostmi genoma nakazuje, da so na ekstremne razmere v okolju bolj občutljive vrste z velikim genomom kot tiste z majhnim. V raziskavi smo preverili hipotezo, ali je velikost genoma rastlin povezana z uspešnostjo preživetja na mestih z močnim gradientom ekoloških dejavnikov, ki so nastali zaradi emisij plinov topilnice. Velikost genoma smo izmerili s slikovno denzitometrijo po barvanju s Feulgenovo reakcijo. Opazili smo statistično značilno negativno povezavo med koncentracijo kovin v tleh in deležem vrst z velikimi genomom. Z raziskavo dokazujemo, da so rastlinske vrste z velikimi genomi neuspešne v ekstremnih ekoloških razmerah.

Ključne besede: velikost genoma, evkarionti, onesnaženje s kovinami

Genome size is associated with differential survival of plant species in extreme environmental conditions

Summary

In eukaryotes, nuclear genome sizes vary by more than five orders of magnitude. This variation is not related to organismal complexity, and its origin and biological significance are still disputed. One of the open questions is whether genome size has an adaptive role. Geographical distribution of plants with known genome sizes suggests that species with large genomes are more sensitive to extreme environmental conditions than those with small genomes. Here we assess the adaptive value of genome size with a comparative study of grassland communities occurring on a gradient of environmental conditions caused by pollution from a smelter. We measured genome size with image densitometry after staining with the Feulgen reaction. We demonstrate a negative correlation between metal pollution

and the proportion of species with large genomes in plant communities. We thus provide direct evidence that genome size is associated with differential survival of plant species in extreme environmental conditions.

Key words genome size, eukaryotes; metal pollution

1 Uvod

Eno izmed vprašanj, s katerim se ukvarjajo biologi, je povezano z razjasnitvijo izvora in pomena velikih razlik v velikosti jedrnega genoma med organizmi. Na začetku raziskav s področja genoma so raziskovalci domnevali, da ima bolj kompleksen organizem tako večje število genov kot tudi večjo količino jedrne DNA, kar se je v nadaljevanju znanstveno raziskovalnega dela izkazalo za netočno. Raziskave so pokazale, da je število genov pri človeku primerljivo s številom genov pri rastlini vrsti *Arabidopsis thaliana* (Messing, 2001). Količino jedrne DNA izražamo z vrednostjo C. Vrednost C (Swift, 1950), je konstantna tako med celicami posameznega organizma kot med posamezniki iste vrste (Dounce, 1955). Velikost haploidnega genoma (vrednost 1C) je pri človeku 3,5 pg DNA, pri vrsti *Arabidopsis thaliana* pa 0,2 pg DNA (Pagel in Johnstone, 1992; Bennett et al., 2003). Nepovezanost med velikostjo jedrnega genoma in kompleksnostjo organizmov so poimenovali paradoks vrednosti C (Orgel in Crick, 1980; Pagel in Johnstone, 1992). Danes razlike v velikosti genoma med organizmi pripisujemo predvsem ponavljajočim zaporedjem DNA, ki naj bi se v evoluciji organizmov tako izbrisala kot vstavila (v: Gregory, 2003).

V botaniki so raziskave zgradbe genoma vodile v spoznanje, da poleg informacije, zapisane v genotipu, na izražanje fenotipa rastlin vplivajo tudi fizične lastnosti DNA, kot so količina jedrne DNA ter masa, prostornina, dolžina in število kromosomov (Bennett, 1987). Za opisovanje teh fizičnih lastnosti DNA je Bennett (1972) uvedel izraz nukleotip. Raziskave podpirajo hipotezo o povezanosti nukleotipa in fenotipa. Tako je možno, da ima vrsta z večjim genomom v določenih ekoloških razmerah selektivno prednost pred vrsto z majhno količino jedrne DNA ali obratno (Price, 1988).

Zveza med količino jedrne DNA rastlin in razmerami v okolju je kompleksna (Bennett, 1987; Knight in Ackerly, 2002) in še ne povsem raziskana. Več raziskav na primer opisuje korelacijo med velikostjo genoma, podnebnimi razmerami in razširjenostjo rastlinskih vrst, med velikostjo genoma in obdobjem rasti listov v rastni sezoni, med velikostjo genoma in občutljivostjo rastlin na zmrzal (pregled v Grime, 1998). Glede na spoznanja o povezavi med ekološkimi dejavniki in velikostjo genoma rastlin bi morali pri iskanju odgovora na vprašanje, kako se rastline odzivajo na spremenjene razmere v okolju, upoštevati kot možni prilagoditveni dejavnik tudi velikost genoma (Grime in Mowforth, 1982; Grime, 1998; Bennett et al., 2000). Namreč, vse več raziskav kaže, da je majhna količina jedrne DNA v ekstremnih okoljih prednostna pred večjo količino jedrne DNA (Grime in Mowforth, 1982; Bennett, 1987; Knight in Ackerly, 2002). Nukleotipski učinek manjše količine jedrne DNA se izrazi v krajšem trajanju celičnega cikla in mejoze (Bennett, 1972), zato naj bi bile rastline z majhno količino jedrne DNA v ekstremnih okoljih uspešnejše kot vrste z večjo količino jedrne DNA (Grime in Mowforth, 1982; MacGillivray in Grime, 1995; Knight in Ackerly, 2002). Na ekstremno hladnih območjih s kratkimi rastnimi sezonami se pojavljajo predvsem kratkotrajnice in enoletnice z majhnimi jedrnimi genomi (Price, 1988). Knight in Ackerly (2002) sta ugotovila, da se vrste z majhnimi genomi pojavljajo v različnih okoljih, vrste z velikimi genomi pa so v ekstremnih okoljih redke. Vrste z majhnimi genomi naj bi tudi bolje prenašale vodni stres in višje temperature (Price, 1988).

V naši raziskavi smo povezali velikost genoma z uspešnostjo preživetja rastlin v ekstremnih razmerah. Kot raziskovalni model smo izbrali močno onesnaženo območje v okolici topilnice

svinca v Žerjavu v Mežiški dolini. Raziskali smo, ali se velikost genoma izbrane skupine rastlinskih vrst spreminja z gradientom onesnaženja tal.

V prvem delu raziskave smo ovrednotili stanje ekosistema na onesnaženem območju, v drugem delu pa smo izmerili velikost genoma za različne vrste slovenske flore. V zaključnem delu smo ovrednotili povezavo med ekološkimi dejavniki in nukleotipskimi znaki.

2 Metoda

Na osrednjem grebenu Doline smrti (Koroška) smo izbrali vzorčne ploskve, ki so bile različno oddaljene od dimnikov topilnice svinca v Žerjavu: ploskev 5 (330 m, 800 m nmv), ploskev 6 (420 m, 825 m nmv), ploskev 7 (520 m, 865 m nmv) in ploskev 8 (670 m, 875 m nmv).

S plamensko atomsko absorpcijsko spektrofotometrijo smo za posamezno vzorčno mesto ocenili stopnjo obremenjenosti tal s svincem, cinkom in kadmijem. Vzorčno ploskev R smo izbrali v sosednji dolini (v bližini kmetije Mrdavs; razdalja od vira emisij približno 2000 m, 700 m nmv), ki ni bila neposredno izpostavljena emisijam iz dimnikov topilnice in predelovalnice svinca v Žerjavu. Vse vzorčne ploskve so bile kvadratne ploskve velikosti 10 m x 10 m.

Za rastlinske vrste z vzorčnih ploskev osrednjega grebena Doline smrti in z vzorčne ploskve R smo ocenili tri nukleotipske znake: velikost genoma (vrednost 2C), število kromosomov (2n) in povprečno velikost metafaznih kromosomov.

Rastlinski material za kariološko analizo smo barvali po Feulgenju. Po barvanju tkiv s Feulgenovo reakcijo je obarvanost jeder sorazmerna količini jedrne DNA, zato lahko z merjenjem intenzitete obarvanosti jeder ocenimo količino jedrne DNA. Količino jedrne DNA smo ocenili z denzitometričnim programom. Za oceno velikosti genoma smo večinoma analizirali interfazna jedra.

3 Rezultati

Na vzorčnih ploskvah so bile izmerjene celokupne koncentracije Pb, Cd in Zn višje od kritičnih vrednosti, predpisanih v Uradnem listu Republike Slovenije (Ur.l. RS št. 68/96; tabela 1). Izjema je bila vzorčna ploskev R, kjer niso bile presežene koncentracije za nobeno izmed kovin, ter vzorčna ploskev 8, kjer ni bila presežena kritična vrednost za Zn.

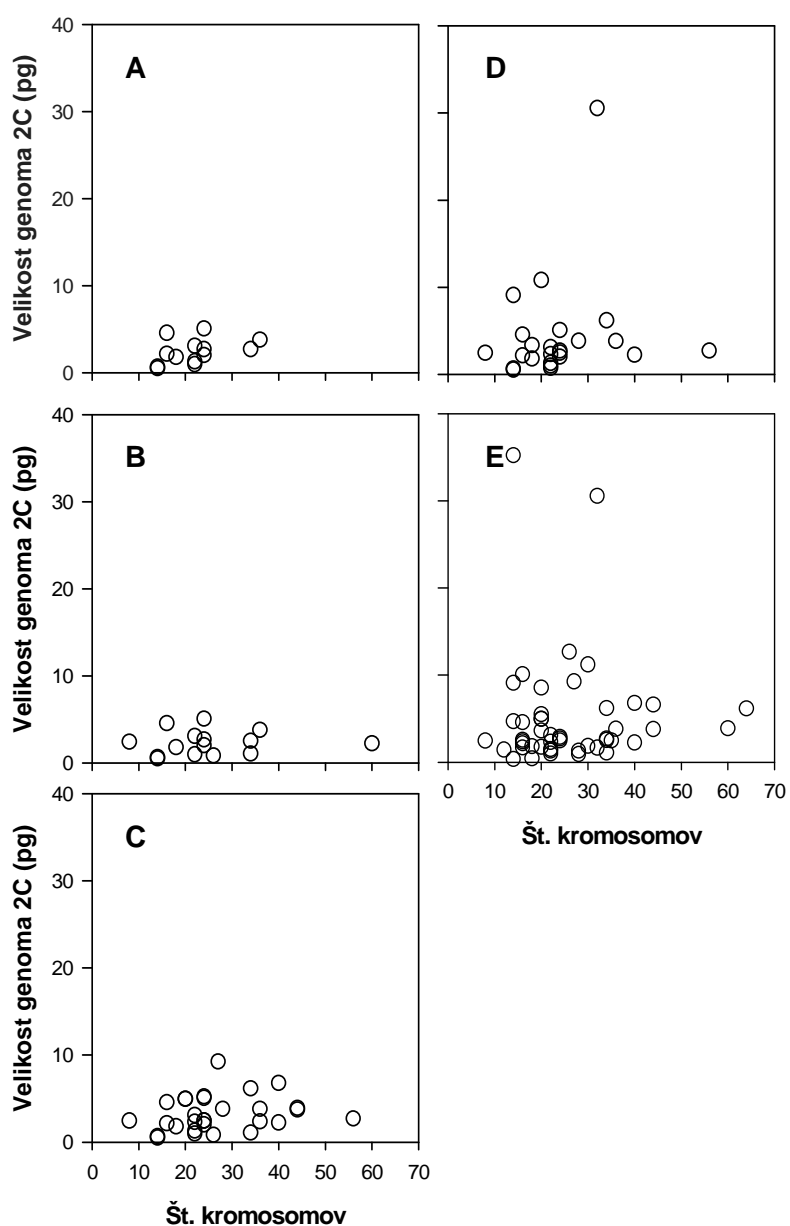
Tabela 1: Koncentracije Pb, Cd in Zn v tleh

Kovina	Vzorčna ploskev	5	6	7	8	R
530	Celok.	33320	20133	15217	6976	114.8
	Pb	SN	706	490	163	82
12	Celok.	120.0	138.3	77.6	37.7	1.0
	Cd	SN	1.1	3.6	0.0	0.0
720	Celok.	2282	2441	1395	554	129.4
	Zn	SN	99	92	69	18

Koncentracije Pb, Cd in Zn v tleh: **Celok.** – celokupna koncentracija kovin po razklopu v zlatotopki. V vrstici z oznako **SN** so prikazane standardne napake (N = 3). V stolpcu **Kovina** je v vrstici **Celok.** prikazana v kurzivi kritična vrednost za celokupno koncentracijo kovine

(mg / kg suhih tal) po slovenski zakonodaji (Ur. l. RS, 1996).

Na vseh vzorčnih ploskvah smo kariološko analizirali popisane zelnate trajnice iz skupine dvokaličnic (v nadaljevanju besedila ZTD), razen na vzorčni ploskvi R, kjer smo analizirali 48 od 52 popisanih vrst. Velikost in porazdelitev nukleotipskih znakov za posamezne vrste na vzorčnih ploskvah 5, 6, 7, 8 in R sta prikazani na sliki 1.



Slika 1: Velikost nukleotipskih znakov za posamezne vrste na vzorčnih ploskvah 5, 6, 7, 8 in R

Vsak krogec prikazuje število kromosomov in velikost genoma za posamezno rastlinsko vrsto. **A** – vzorčna ploskev 5, **B** – vzorčna ploskev 6, **C** – vzorčna ploskev 7, **D** – vzorčna ploskev 8, **E** – vzorčna ploskev R.

Pri obdelavi podatkov za velikost genoma smo rastlinske vrste, ki so imele velikost genoma večjo od tretjega kvartila vrednosti 2C vseh analiziranih ZTD, označili kot vrste z velikim genomom. Te vrste so imele velikost genoma (vrednost 2C) večjo od 5,2 pg DNA. S podobnim pristopom smo vrste, ki so imele število kromosomov večje od tretjega kvartila vseh vrst ($2n > 34$), definirali kot vrste z velikim številom kromosomov, in vrste, ki so imele velikost metafaznih kromosomov večjo od 0,47 pg DNA, kot vrste z velikimi kromosomi. Delež vrst z velikimi nukleotipskimi znaki na posameznih vzorčnih ploskvah je prikazan v tabeli 2.

Tabela 2: Delež vrst (ZTD) z velikimi nukleotipskimi znaki na vzorčnih ploskvah 5, 6, 7, 8 in R

Vzorčna ploskev		5	6	7	8	R
Velik genom	Število	0	0	4	4	13
	Delež (%)	0	0	14	17	27
Veliko št. kromosomov	Število	1	2	7	3	8
	Delež (%)	8	13	24	13	17
Veliki kromosomi	Število	1	2	5	5	14
	Delež (%)	8	13	17	21	29

Za vsako vzorčno ploskev je prikazano število vrst z velikimi nukleotipskimi znaki (jedrni genom $2C > 5,2$ pg DNA, število kromosomov > 34 , povprečna velikost metafaznih kromosomov $> 0,47$ pg DNA). Prikazan je tudi delež vrst z velikimi nukleotipskimi znaki na vsaki vzorčni ploskvi.

Rezultati kažejo na trend naraščanja deleža vrst z velikim genomom od vzorčne ploskve 5 do R (tabela 2), s statistično značilno negativno korelacijo med deležem vrst z velikim genomom in celokupno koncentracijo Pb v tleh (tabela 3). Povezava med deležem vrst z velikim številom kromosomov in celokupno koncentracijo Pb v tleh ni bila statistično značilna, medtem ko je bila negativna korelacija med deležem vrst z velikimi kromosomi in celokupno koncentracijo Pb v tleh statistično značilna. Podobne rezultate kot za Pb smo dobili tudi za povezavo med deležem vrst z velikimi nukleotipskimi znaki in koncentracijo Cd in Zn v tleh (tabela 3).

Tabela 3: Korelacija med deležem rastlinskih vrst z velikimi nukleotipskimi znaki in koncentracijo kovin v tleh

Parameter	Nukleotipski znak		
	Velikost genoma	Število kromosomov	Velikost kromosomov
Pb	-0,919	-0,495	-0,975
	<i>0,027</i>	<i>0,396</i>	<i>0,005</i>
	*	sn	**
Cd	-0,980	-0,363	-0,934
	<i>0,003</i>	<i>0,548</i>	<i>0,020</i>
	**	sn	*
Zn	-0,976	-0,376	-0,937
	<i>0,004</i>	<i>0,533</i>	<i>0,019</i>
	**	sn	*

Prikazan je Pearsonov korelacijski koeficient s pripadajočo vrednostjo p v kurzivi in simbolom, ki označuje stopnjo statistične značilnosti.

4 Diskusija

Na vzorčnih ploskvah vzdolž osrednjega grebena Doline smrti smo izmerili velike koncentracije Pb, Cd in Zn v tleh (tabela 1).

Za izbrane rastlinske vrste, ki smo jih popisali v Dolini smrti in na vzorčni ploskvi R, smo opravili kariološko analizo. Poleg velikosti genoma (vrednost C) smo ocenili tudi število kromosomov (2n) in velikost metafaznih kromosomov.

Za analizo povezave med ekološkimi parametri in nukleotipskimi znaki smo kariološko analizo omejili na zelnate trajnice iz skupine dvokaličnic (ZTD), ki so taksonomsko in funkcionalno definirana skupina rastlin. Pri izboru rastlinske skupine smo upoštevali, da obstajajo splošne

razlike v velikosti genoma med enokaličnicami in dvokaličnicami (Bennett, 1972; Grime in Mowforth, 1982; Vinogradov 2001), med enoletnicami in trajnicami (Bennett, 1972; Vinogradov 2001), in med zelnatimi in lesnimi vrstami (Grime in Mowforth, 1982). Poleg tega so bile ZTD tudi dobro zastopane med popisanimi vrstami v Dolini smrti in na vzorčni ploskvi R; med 156 popisanimi vrstami je bil delež ZTD 47%.

Med vrste z velikim genomom, velikimi kromosomi in veliki povprečnimi velikostmi metafaznih kromosomov smo uvrstili tiste, ki so imele vrednosti posameznih nukleotipskih znakov večje od tretjega kvartila vseh analiziranih vrst. Ugotovili smo, da se od vzorčne ploskve 5 proti 8 postopno povečuje delež vrst z večjim genomom in večjim številom kromosomov (tabela 2). Na vzorčni ploskvi R je bil delež vrst z velikim genomom in velikim številom kromosomov največji (tabela 2).

Z analizo podatkov smo ugotovili, da delež vrst z velikimi genomi in velikimi kromosomi negativno korelira s celokupnimi koncentracijami Pb, Cd in Zn v tleh (tabela 3).

Povezav med nukleotipskimi znaki in koncentracijami kovin v tleh, ki smo jo ugotovili v naši raziskavi, ni lahko razložiti, saj selektivni pomen nukleotipskih znakov še ni dobro raziskan. Možno je, da je velikost genoma na ekstremnih rastiščih v Dolini smrti povezana z uspešnostjo rastlinskih vrst zaradi povezave med nukleotipskimi in fenotipskimi znaki (hipoteza o nukleotipu; Bennett, 1987). Po drugi strani pa gre lahko tudi za specifične negativne učinke povečanih koncentracij kovin v tleh. Povišane koncentracije kovin v rastlinskih tkivih namreč povzročajo motnje v različnih fizioloških procesih. Kovine se vežejo na funkcionalno pomembna mesta biomolekul in tako povzročijo njihovo deaktivacijo, kar vodi do prekinitve encimskih reakcij v rastlinah in motenj v metabolizmu (Dietz et al., 1999).

Kovine imajo lahko tudi genotoksične učinke - negativno vplivajo na procese, povezane z genetskim materialom. Povečane koncentracije Pb, Cd, Zn, Cu, Cr in Ni tako povzročajo poškodbe kromatina, zmanjšanje sinteze in stabilnosti DNA, spremembe tridimenzionalne zgradbe dvojne vijačnice in motnje v citokinezi (Panda in Panda, 2002). Kljub temu, da kovine povzročajo genotoksične učinke, pa ni dobro raziskano vprašanje, ali so nukleotipski znaki povezani s stopnjo poškodb genetskega materiala v prisotnosti kovin in s tem s preživetjem rastlin. Možno je, da so rastlinske vrste z večjimi kromosomi pod vplivom kemikalij bolj občutljive na prelome kromosomov kot vrste z majhnimi kromosomi (v: Grant in Owens, 2001).

Kljub temu, da smo našo raziskavo opravili na modelnem sistemu, v katerem pričakujemo specifične učinke prisotnosti visokih koncentracij kovin v tleh na rastlinstvo, pa lahko opaženo povezavo med nukleotipom in uspešnostjo rastlinskih vrst na ekstremnih rastiščih interpretiramo tudi kot splošen pojav. Naši rezultati namreč podpirajo predhodno hipotezo, da so vrste z relativno majhnim genomom pogoste v različnih ekoloških razmerah, medtem ko so vrste z velikim genomom izključene z ekstremnih rastišč (Grime in Mowforth, 1982; Bennett, 1987; Knight in Ackerly, 2002).

Možno je, da je večja uspešnost rastlin z majhnimi genomi v primerjavi z rastlinami z velikimi genomi povezana s trajanjem mitotskega celičnega cikla in mejoze. Pri rastlinah z majhnim genomom je trajanje mitotskega celičnega cikla krajše kot pri rastlinah z velikim genomom. Podobne ugotovitve veljajo tudi za trajanje mejoze (citirano v Bennett, 1987). Rastline z majhnim genomom imajo krajši minimalni generacijski čas (čas od kalitve do nastanka prvih semen; Bennett, 1987) in tako selekcijsko prednost pred rastlinami z večjo količino jedrne DNA.

5 Viri

- Bennett, M.D. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proceedings of the Royal Society of London B.*, 1972, 181, str. 109-135.
- Bennett, M.D. Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytologist*, 1987, 106, str. 177-200.
- Bennett, M.D., Bhandol, P., Leitch, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses - 807 new estimates. *Annals of Botany*, 2000, 86, str. 859-909.

- Bennet, M.D., Leitch, I.J., Price, J.H., Johnston, S.J. Comparisons with *Caenorhabditis* (~100Mb) and *Drosophila* (~175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25% larger than the Arabidopsis Genome Initiative estimate of ~125 Mb. *Annals of Botany*, 2003, 91, str. 547-557.
- Dietz, K.J., Baier, M., Krämer, U. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. V: Heavy Metal Stress in Plants – From Molecules to Ecosystems. Prasad M.N.V. in Hagemeyer J. (ur.). Berlin, Springer-Verlag, 1999, str. 73-99.
- Dounce, A.L. The isolation and composition of cell nuclei and nucleoli. V: The nucleic acids. Chargaff E. in Davidson J.N. (ur.). Academic Press, New York, 1955, str. 93-153.
- Grant, W.F., Owens, E.T. Chromosome aberration assays in *Pisum* for the study of environmental mutagens. *Mutation Research*, 2001, 488, str. 93-118.
- Gregory, R.T. Is small indel bias a determinant of genom size? *Trends in Genetics*, 2003, let. 19, št. 9, str. 485-488.
- Grime, J.P. Plant classification for ecological purposes: is there a role for genome size? *Annals of Botany* 82 (Supl. A), 1998, str. 117.
- Grime, J.P., Mowforth, M.A. Variation in genome size - an ecological interpretation. *Nature*, 1982, 299, str. 151-153.
- Knight, C.A., Ackerly, D.D. Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis. *Ecology Letters*, 2002, 5, str. 66.
- MacGillivray, C.W., Grime, J.P. Genome size predicts frost resistance in British herbaceous plants: implications for rates of vegetation response to global warming. *Functional Ecology*, 1995, 9, str. 320-325.
- Messing, J. Do plants have more genes than humans? *Trends in Plant Science*, 2001, let. 6, št. 5, str. 195-196.
- Orgel, L.H., Crick, F.H.C., Sapienza, C. Selfish DNA. *Nature*, 1980, 288, str. 645-646.
- Pagel, M., Johnstone, R.A. Variation across species in the size of the nuclear genome supports the junk-DNA explanation for the C-value paradox. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 1992, 249, str. 119-124.
- Panda, B.B., Panda, K.K. Genotoxicity and mutagenicity of metals in plants. V: Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. Prasad M.N.V., Strzałka K. (ur.). Nizozemska, Kluwer Academic Publishers, 2002.
- Price, H.J. DNA content variation among higher plants. *Annals of Missouri Botanical Gardens*, 1988, 75, str. 1248-1257.
- Swift, H. 1950. The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, 1950, 36, str. 643-654.
- Vinogradov, A.E. Mirrored genome size distributions in monocot and dicot plants. *Acta Biotheoretica*, 2001, 49, str. 43-51.