

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *GLOBULARIA*
BISNAGARICA И *GLOBULARIA TRICHOSANTHA* (PLANTAGINACEAE)
ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ**

Автореферат бакалаврской работы

Студента 4 курса 422 группы

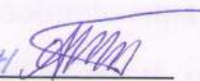
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Мосалева Андрея Сергеевича

Научный руководитель:

доцент, к. б. н.


08.06.24 

А. С. Пархоменко

дата, подпись

Зав. кафедрой:

д. б. н., доцент

08.06.24 

О. И. Юдакова

дата, подпись

Саратов 2024

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Согласно данным Красного списка видов, находящихся под угрозой исчезновения, Международного союза охраны природы более 25 тыс. видов растений считаются вымершими или находящимися под угрозой исчезновения. К ним также относятся такие реликтовые виды, как *Globularia bisnagarica* L., занесённый в Красную книгу РФ, а также в Красные книги всех регионов, в которых он произрастает, и *Globularia trichosantha* Fisch. & CA Mey. (B2 по МСОП), занесённый в Красную книгу Краснодарского края, Республики Крым и РФ.

Установлено, что редкие виды имеют меньшее генетическое разнообразие, чем широко распространённые, и поэтому более подвержены вымиранию при изменении условий окружающей среды. Для разработки эффективных программ по сохранению редких видов, очевидно важны знания об их генетическом разнообразии.

Сохранение биоразнообразия – одна из пяти основных глобальных экологических проблем, с которыми человечество вошло в XXI век. В последнее время, на всех уровнях (генетическом, видовом, биоценотическом) под воздействием, прежде всего, антропогенного фактора оно исчезает катастрофическими темпами. Для планомерной и целенаправленной организации эксплуатации, охраны и возобновления природных богатств необходимы постоянный мониторинг биоразнообразия, оптимизация структуры всех его основных уровней, исследование резервов репродукции редких и исчезающих видов, а также выработка мер по сохранению генофонда видов.

Указанному направлению как нельзя соответствует выявление внутривидового разнообразия уязвимых плиоценовых реликтов *Globularia bisnagarica* и *G. trichosantha* с дизъюнктивными ареалами и облигатной кальцефильностью с целью разработки мер по их сохранению при

возрастающей угрозе разрушения мест их произрастания за счёт, прежде всего, разработки полезных ископаемых и выпаса.

Проводившиеся ранее исследования по изучению генетического полиморфизма методом таргетного секвенирования, показали генетическую однородность в популяциях, поэтому было решено провести их цитогенетическое исследование.

Цель работы заключается в анализе кариотипов образцов *Globularia bisnagarica* и *Globularia trichosantha* по количеству и морфологии хромосом, а также локализации в них некоторых олигонуклеотидных последовательностей.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. выявить внутри- и межпопуляционную изменчивость по числу хромосом образцов *Globularia bisnagarica* и *G. trichosantha*;
2. исследовать морфологические параметры хромосом образцов из популяций *Globularia bisnagarica* и *G. trichosantha*;
3. идентифицировать хромосомы образцов из популяций *Globularia bisnagarica* и *G. trichosantha* методом флуоресцентной *in situ* гибридизации;
4. провести сравнительный цитогенетический анализ видов *Globularia bisnagarica* и *G. trichosantha*.

Структура и объём работы. Выпускная квалификационная работа состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка использованных источников и содержит 6 рисунков и 6 таблиц. Общий объём работы составляет 53 страницы. Количество использованных литературных источников составило 73 шт., из них 46 шт. на иностранном языке.

Научная новизна и значимость работы. У обоих видов обнаружена миксоплоидия анеуплоидного ряда. Впервые получены данные о морфометрических параметрах хромосом у *G. bisnagarica*. Метод флуоресцентной *in situ* гибридизации позволил установить межвидовые отличия в локализации некоторых олигонуклеотидных последовательностей *G. bisnagarica* и *G. trichosantha*.

Публикации. По теме выпускной квалификационной работы опубликована 1 работа, которая была представлена на Всероссийской научной конференции с международным участием «Живые системы: передовые междисциплинарные технологии изучения, управления и сохранения» в 2023 г. (г. Саратов).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Понятие о флуоресцентной *in situ* гибридизации. В главе представлен обзор литературных данных о методике и возможностях метода FISH, также представлены некоторые открытия в исследованиях генома растений, полученные при помощи этого метода.

2 Характеристика рода *Globularia*. В главе представлена таксономическая структура рода, история изучения видов рода, а также ботаническое и экологическое описание двух видов, произрастающих на территории России.

3 Материал и методы. Материалом для исследования служили семянки *G. bisnagarica*, собранные в пяти естественных местообитаниях в 2021-2022 гг., на территории Хвалынского (гряда Елоха, холм Заяц и гора Пиче-Пандра) и Вольского (окр. с. Тёпловка и окр. с. Труёвая Маза) районов Саратовской области, и семянки *G. trichosantha*, собранные на территории Крыма в Бахчисарайском (окр. с. Хаджа-Сала) районе.

Подсчет количества хромосом проводили на временных препаратах. Постоянные препараты обезвоживались в 96 % этиловом спирте и параформальдегиде, после этого многократно отмачивались в 2×SSC и производилась обработка РНКзой. На готовые препараты наносилась гибридизационная смесь с прямомеченными олигонуклеотидными зондами, синтезированными ООО «НПФ Синтол». Всего опробировано 20 олигонуклеотидных зондов.

4 Результаты и их обсуждение.

4.1 Результаты кариотипического анализа образцов *Globularia bisnagarica*.

4.1.1 Изменчивость числа хромосом в популяциях *G. bisnagarica*. У *G. bisnagarica* основное гаплоидное число хромосом – 8 ($n=x=8$), диплоидное – 16 ($2n=2x=16$). Во всех пяти популяциях стабильно и примерно в равной степени на одном и том же образце встречались метафазные пластинки с 14-ю и 16-ю хромосомами, что говорит о наличии у вида миксоплоидии анеуплоидного ряда. В единичных случаях в образце среди диплоидных и анеуплоидных клеток, встречались клетки с гаплоидным набором хромосом. Межпопуляционных отличий по количеству хромосом у *G. bisnagarica* не выявлено.

4.1.1 Особенности морфологической изменчивости хромосом в популяциях *G. bisnagarica*. По проведенным нами исследованиям в популяциях морфология хромосом с I по V и с VII по VIII пары идентична. Хромосомы I пары крупные субметацентрики со вторичной перетяжкой на длинном плече. II пара – крупные субметацентрики. III пара – средние субметацентрики со вторичной перетяжкой и спутником на коротком плече. IV пара – средние субметацентрики. V пара – средние метацентрики. В VI паре по положению центромеры наблюдался полиморфизм. В образцах из популяций Заяц и Елоха хромосомы данной группы относились к субметацентрическим, а в образцах из популяций Тёпловка и Труёвая Маза – к метацентрическим. В образцах из популяции Пиче-Пандра наблюдался внутривидовой полиморфизм по хромосомам данной пары: часть просмотренных метафазных пластинок была с субметацентрическими, а часть с метацентрическими хромосомами. VII пара – короткие субметацентрики. VIII пара – короткие метацентрики.

Средняя суммарная абсолютная длина диплоидного хромосомного набора между пятью исследованными популяциями *G. bisnagarica* достоверно не

различалась и в среднем составляла 39 ± 4.1 мкм. Длина хромосом колебалась в пределах от 1.5 до 4 мкм.

При сравнении относительной длины хромосом среди образцов *G. bisnagarica* наибольший диапазон изменчивости отмечен в популяциях Пиче-Пандра и Тёпловка, наименьший – в популяции Елоха.

4.1.2 Идентификация хромосом методом флуоресцентной *in situ* гибридизации в популяциях *G. bisnagarica*. Для идентификации хромосом использовали метод Флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с прямомечеными олигонуклеотидными зондами. Олигонуклеотидные зонды, которые дали сигнал, оказались хромосомоспецифичными.

При работе с *G. bisnagarica* удалось получить сигнал от четырёх флуоресцентных зондов.

ДНК-зонд (AG)₁₀ был локализован в спутнике. Причем сигнал был яркий, и, по своему положению, занимал всю область спутника. SSR-олигонуклеотидный зонд (CT)₁₀ по своему положению, занимал не только весь спутник, но ещё и всё короткое плечо, вплоть до центromеры субметацентрической хромосомы. Последовательность (GACA)₅ была локализована в прицентромержной области короткого плеча субметацентрических хромосом.

Объединённая последовательность 45S рДНК, не смотря на то, что тоже была локализована в спутниках, визуализировалась по-разному в разных популяциях. Так, на образцах из локалитетов Заяц, Елоха, Тёпловка и Труёвая Маза сигнал был слабым и находился в центре спутника. В то время, как, на образцах из популяции Пиче-Пандра данная последовательность дала яркий сигнал на весь спутник. Подобное различие является межпопуляционным.

Интересно, что теломерные повторности (CCCTAAA)₃ и (TTTAGGG)₃ не дали сигнала. Это может говорить или об их отсутствии, или о малом количестве, что более вероятно.

4.2 Результаты кариотипического анализа образцов *Globularia trichosantha*.

4.2.1 Изменчивость числа хромосом в популяции *G. trichosantha*. На каждом препарате в равной степени встречались метафазные пластинки с 14-ю и 16-ю хромосомами, что говорит о наличии у вида миксоплоидии анеуплоидного ряда, равно как и у *G. bisnagarica*. Клетки с гаплоидным набором хромосом не были обнаружены.

4.2.2 Особенности морфологической изменчивости хромосом в популяции *G. trichosantha*. Во всех исследованных образцах *G. trichosantha* морфология хромосом с I по V и с VII по VIII пары идентична. Хромосомы I пары крупные субметацентрики со вторичной перетяжкой на длинном плече и при этом всегда были самыми крупными в кариотипе. II пара – крупные субметацентрики уже без вторичной перетяжки. III пара – средние субметацентрики со вторичной перетяжкой и спутником на коротком плече. IV пара – средние субметацентрики. V пара – средние метацентрики. В VI паре по положению центромеры наблюдался полиморфизм. Половина просмотренных метафазных пластинок имела в данной группе субметацентрические хромосомы, а другая половина – метацентрические. В VII паре хромосомы по длине были близки к хромосомам VI пары, но в отличие от них, являлись стабильными субметацентриками. Хромосомы VIII пары по положению центромеры относились к метацентрическим хромосомам и являлись самыми маленькими в кариотипе

Средняя суммарная абсолютная длина диплоидного хромосомного набора была равна 46 ± 6.2 мкм. Длина хромосом колебалась в пределах от 2-х до 4-х мкм.

4.2.3 Идентификация хромосом методом флуоресцентной *in situ* гибридизации в популяции *G. trichosantha*. При работе с *G. trichosantha* удалось получить сигнал от трёх из 20-ти олигонуклеотидных зондов, а именно

(AG)₁₀, (CT)₁₀ и (GACA)₅. Все три олигонуклеотидных зонда, оказались хромососпецифичными и были локализованы в III паре хромосом.

SSR-олигонуклеотидный зонд (AG)₁₀ был локализован в коротком плече субметацентрических хромосом, причем чётко визуализировался на обеих хроматидах в прицентромерном районе. ДНК-зонд (CT)₁₀ визуализировался в районе центромеры, а последовательность (GACA)₅ была локализована в спутнике. Причем сигнал был яркий, и, по своему положению, занимал всю область спутника.

Теломерные повторы, характерные для большинства высших растений ((CCTAAA)₃ и (TTTAGGG)₃), на образцах *G. trichosantha* не дали сигнала. Отсутствие сигнала при гибридизации указывает либо на отсутствие меченного повтора в ДНК, либо на небольшое их количество.

Последовательность 45S рДНК, которая дала сигнал во всех пяти популяциях у *G. bisnagarica*, не дала сигнала у *G. trichosantha*. Скорее всего, данная последовательность там есть (хотя бы в III паре хромосом), но в таком небольшом количестве, которое выходит за рамки разрешающей способности метода FISH.

4.3 Сравнительный цитогенетический анализ *Globularia bisnagarica* и *G. trichosantha*. Для вида *G. bisnagarica* такое подробное цитогенетическое исследование проведено впервые. Для *G. trichosantha* ранее была предпринята попытка охарактеризовать кариотип турецким ученым, но работа включала в себя только изучение количества хромосом и их морфометрических параметров, без проведения флуоресцентной *in situ* гибридизации.

По результатам кариотипического анализа *G. bisnagarica* и *G. trichosantha* являются диплоидами ($2n=2x=16$). Во всех исследованных нами образцах обоих видов были отмечены случаи миксоплоидии анеуплоидного ряда в соседних клетках апикальной меристемы корешка внутри одного растения. Клетки с гаплоидным набором хромосом были обнаружены только у *G. bisnagarica*. При этом, по литературным данным у *G. trichosantha* из популяции Невшехир

По проведенным нами исследованиям морфология хромосом обоих видов с I по V и с VII по VIII пары идентична. Лишь по хромосомам VI пары наблюдался внутри- (как в случае с популяцией Пиче-Пандра образцов *G. bisnagarica* и популяцией Хаджа-Сала образцов *G. trichosantha*) и межпопуляционный (между популяциями Заяц и Елоха, имеющих субметацентрические, и Тёпловка и Труёвая Маза, имеющих метацентрические хромосомы) полиморфизм. При сравнении полученных нами данных с литературными, совпадает только морфология хромосом VIII пары – метацентрические. Все остальные пары имели отличие. В работе турецкого ученого они все относились к метацентрическим (за исключением V пары, которая у него являлась субметацентрической) и ни одна хромосома не имела вторичной перетяжки.

Идентификация хромосом методом FISH не дала желаемых результатов по различию пар хромосом, так как все метки, которые дали сигнал, оказались локализованы в III паре хромосом. Зато данный метод позволил установить межвидовые отличия в локализации некоторых последовательностей между *G. bisnagarica* и *G. trichosantha*. Данный метод на представителях рода *Globularia* ранее не применялся. Последовательности (AG)₁₀, (CT)₁₀ и (GACA)₅ локализованы у обоих видов в разных частях хромосомы, а последовательность 45S рДНК была обнаружена только у *G. bisnagarica*.

Таким образом, методом флуоресцентной *in situ* гибридизации были получены результаты, доказывающие, что виды *G. bisnagarica* и *G. trichosantha* отличаются друг друга по положению некоторых олигонуклеотидных последовательностей, в то время, как, другие исследованные цитогенетические характеристики этих двух видов оказались схожи.

ВЫВОДЫ

1. По результатам кариотипического анализа *G. bisnagarica* и *G. trichosantha* являются диплоидами ($2n=2x=16$). Во всех исследованных нами

образцах обоих видов были отмечены случаи миксоплоидии анеуплоидного ряда в соседних клетках апикальной меристемы корешка внутри одного растения. Межпопуляционных и межвидовых отличий по количеству хромосом не обнаружено.

2. По морфологическим параметрам хромосомы *G. bisnagarica* были близки к хромосомам *G. trichosantha* с I по V и с VII по VIII. В хромосомах VI пары наблюдался внутри- (у *G. bisnagarica* в популяции Пиче-Пандра и у *G. trichosantha* в популяции Ходжа-Сала) и межпопуляционный (между популяциями Заяц и Елоха, имеющих субметацентрические, и Тёпловка и Труёвая Маза, имеющих метацентрические хромосомы) полиморфизм.

3. Методом FISH установлены межвидовые отличия в локализации всех обнаруженных последовательностей между *G. bisnagarica* и *G. trichosantha*. Последовательности (AG)₁₀, (CT)₁₀, (GACA)₅ были локализованы в разных частях хромосом у обоих видов, а объединённая последовательность 45S рДНК была отмечена только у *G. bisnagarica*. При этом последовательность 45S рДНК выявила межпопуляционное различие: в популяции Пиче-Пандра – значительно большее её количество, чем в остальных популяциях.

4. Отличия между видами *G. bisnagarica* и *G. trichosantha* по количеству хромосом и морфологическим параметрам не выявлены. Только методом флуоресцентной *in situ* гибридизации были установлены межвидовые отличия по положению на хромосомах всех обнаруженных олигонуклеотидных последовательностей.

Морф