

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «САРАТОВСКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

**ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ ГАПЛОИДИИ У СКЛОННЫХ К
ПАРТЕНОГЕНЕЗУ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 422 группы
направления 06.03.01 Биология
биологического факультета
Нурлубаевой Лилии Рашитовны

Научный руководитель

Доцент кафедры генетики, к.б.н



Ю.А. Беляченко

Научный консультант

Ведущий биолог отдела генетики

и репродуктивной биологии

УНЦ «Ботанический сад» СГУ



Н.В. Апанасова

Заведующий кафедрой генетики,

д.б.н., доцент



О.И. Юдакова

Саратов 2018

Введение. Гаплоидия у семенных растений проявляется на уровне спорофита и выражается в форме появления гаплоидов – особей с гаметическим (редуцированным) числом негомологичных хромосом в соматических клетках.

Несмотря на колоссальную научную и практическую значимость гаплоидии и связанных с ней явлений, большое количество работ, посвященных данной теме, многие закономерности, детали и особенности процесса репродукции у растений в настоящее время недостаточно изучены. Кроме того, учитывая относительно невысокую частоту спонтанной гаплоидии, особую важность имеет разработка эффективных методов выявления гаплоидов, большинство из которых в настоящее время характеризуются либо недостаточно высокой точностью, либо слишком высокой трудоемкостью. В связи с этим особое значение приобретает исследование форм растений, обладающих наследственно обусловленной склонностью к партеногенезу.

Целью настоящей работы являлась оценка частоты гаплоидии у различных вариантов склонной к партеногенезу линии АТТМ. В рамках поставленной цели были сформулированы следующие задачи.

1. Провести сравнительную оценку частоты гаплоидии по данным многолетних полевых исследований, полученным с применением морфологического метода выявления гаплоидов.

2. Выполнить сравнение гаплоидов и диплоидов линии АТТМ по морфометрическим признакам в полевых условиях.

3. Оценить частоту полиэмбрионии и гаплоидии при проращивании зерновок урожая 2013 и 2014 гг. в лабораторных условиях на основе морфологического метода.

4. Провести цитологический анализ для полиэмбрионов и гаплоидов, выявленных с помощью морфологического метода.

Структура и объем работы. Дипломная работа состоит из введения, 2 глав (основной и экспериментальной части), заключения, выводов, списка используемых источников. Список литературы включает 31 источник на русском и английском языках. Работа изложена на 44 страницах машинописного текста.

Основное содержание работы. Материалом для исследования послужили различные варианты склонной к партеногенезу линии АТТМ, полученные в результате скрещивания линии ТМ (Тестер Мангельсдорфа) и линии АТ-1. Линия АТ получена экспериментально на кафедре генетики Саратовского государственного университета В. С. Тырновым. Она характеризуется высокой выраженностью редуцированного партеногенеза.

На основе проведенного анализа данных многолетних полевых исследований описана динамика изменения частоты гаплоидии в 24 вариантах линии АТТМ с 2006 по 2017 гг. При этом нами выделены наиболее перспективные в отношении данного признака варианты с наиболее высокими значениями частот возникновения гаплоидов в указанный период времени. Следует отметить, что во всех изученных вариантах частоты гаплоидии существенно варьируют в разные годы исследования.

На рисунках 1 и 2 приводятся данные о динамике изменения частоты гаплоидии в наиболее перспективных с точки зрения данного признака вариантах. В варианте 1 наибольшая частота гаплоидии (15%) отмечена в 2015 г., а полное отсутствие гаплоидов было зафиксировано в 2006 и 2012 гг. Для варианта 3 наибольшая частота возникновения гаплоидов отмечена в 2008 г. (около 8%), а полное отсутствие гаплоидов наблюдалось в 2006, 2010 и 2011 гг. В варианте 6 частота гаплоидии не превышала 5% (максимальное значение достигалось в 2011, 2015 и 2016 гг.), при этом в 2006, 2010, 2013 и 2014 гг. гаплоиды не были отмечены.

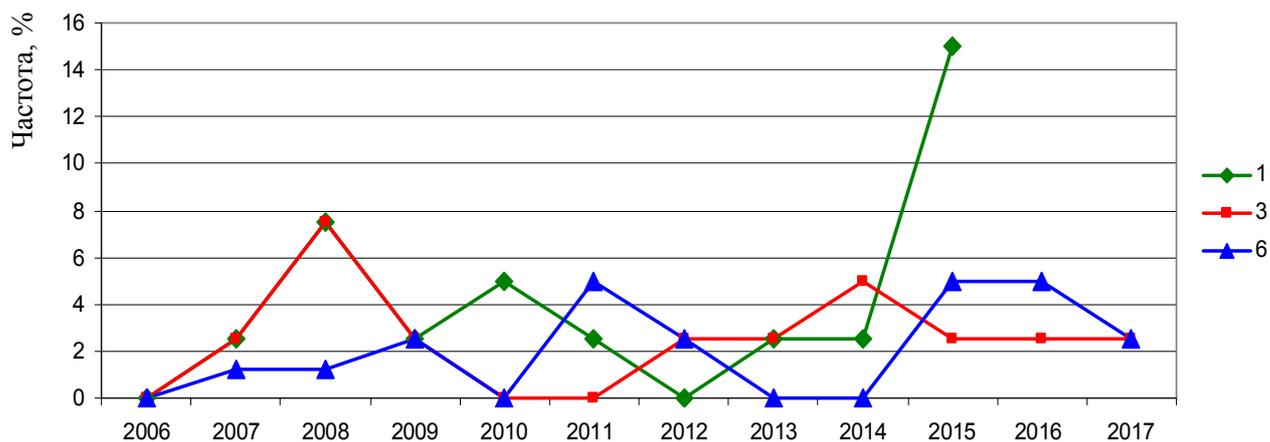


Рисунок 1 – Частота возникновения гаплоидов по полевым данным для форм, вовлеченных в процесс создания вариантов линии АТТМ, гомозиготных по генам: 1, 3 – *bm, lg, y*; 6 – *bm, lg, wx, gl, y*

Для варианта 18 частота гаплоидии в 2013 г. (10%) была наибольшей, а в то время, как в 2006, 2008, 2009 и 2014 г. гаплоиды отсутствовали. Наибольшая частота гаплоидии (свыше 12%) для варианта 19 отмечена в 2012 г., нулевая – в 2006, 2008, 2009 и 2015 гг. В варианте 9 наибольшая частота гаплоидии (10%) отмечена в 2017 г., при этом отсутствием гаплоидов данный вариант характеризовался в 7 полевых сезонах из 12.

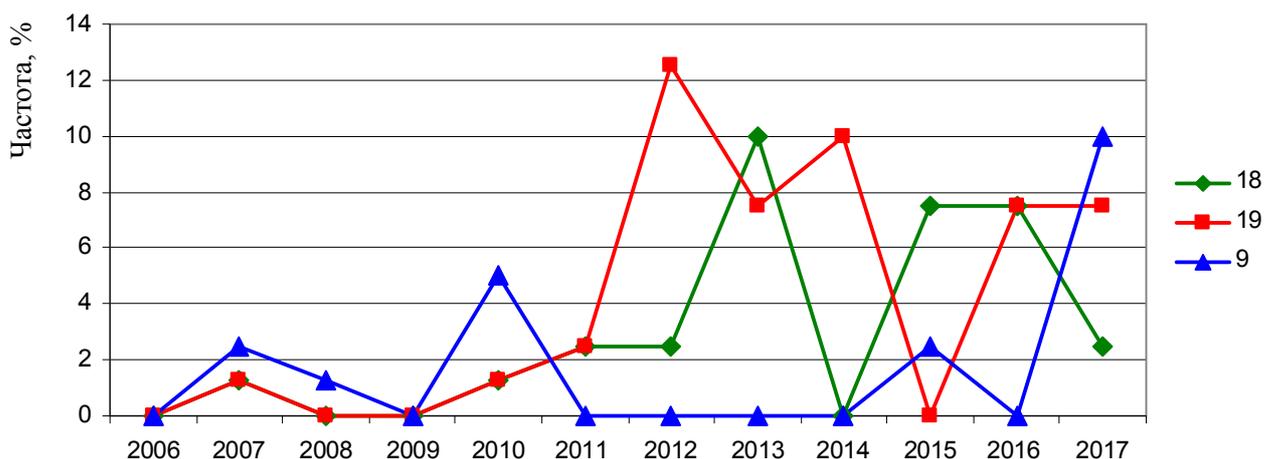


Рисунок 2 – Частота возникновения гаплоидов по полевым данным для форм, вовлеченных в процесс создания различных вариантов линии АТТМ, гомозиготных по генам *bm, y*

Общей особенностью для всех рассмотренных вариантов является относительно невысокая частота гаплоидии в начале селекционного процесса (2006 и 2007 гг.). Также следует отметить, что у многих вариантов в период с 2012 по 2014 гг. отмечались наиболее высокие значения частоты данного явления.

В таблице 1 представлены средние значения частот гаплоидии на разных стадиях селекционного процесса, условно разделенного на равные по продолжительности периоды (2006-2011 гг. и 2012-2017 гг.). Также для каждого рассмотренного варианта линии приводится величина относительного изменения средней частоты гаплоидии во втором периоде относительно первого. В таблице представлены данные только о тех вариантах, для которых наблюдалась тенденция к увеличению средней частоты гаплоидии. Таким образом, согласно проведенному анализу, частота гаплоидии увеличивается в 18 вариантах из 24.

Таблица 1 – Средняя частота гаплоидии (в %) по полевым данным за разные периоды создания различных вариантов линии АТТМ

Вариант	1	3	4	5	6	13	17	18	19	21
2006-2011 гг.	3,3	2,1	1,7	0,8	1,7	1,2	0,4	0,8	0,8	1,2
2012-2017 гг.	5,0	2,9	2,9	2,5	2,5	2,9	2,9	5,0	7,5	3,3
Относительное изменение, %	52	38	71	213	47	142	625	525	838	175

Наибольшее относительное изменение данного параметра отмечено в варианте 19, где средняя частота гаплоидии увеличилась более чем в 9 раз. Очень высокими значениями рассматриваемого показателя характеризуются также варианты 18 и 19, и, в несколько меньшей степени – варианты 5, 13 и 21. Это указывает на крайне высокую эффективность отбора по частоте гаплоидии в данных вариантах линии АТТМ.

В таблице 2 приводятся средние значения различных морфометрических показателей гаплоидов и диплоидов по данным полевых измерений за 2017 г.

В таблице также приводится показатель относительных различий между выборками гаплоидных и диплоидных растений, который рассчитан как отношение разницы в проявлении признака между диплоидом и гаплоидом к значению признака у диплоида. Таким образом, можно заключить, что значения рассматриваемых признаков у гаплоидов, в среднем, на 47-56% ниже, чем у диплоидов, при этом отмеченные различия достоверны ($p < 0,01$).

Таблица 2 – Результаты сравнительного морфометрического анализа гаплоидов и диплоидов линии АТТМ

Параметр	Среднее значение для гаплоидов	Среднее значение для диплоидов	Относительные различия, %	Число степеней свободы	Значение F-критерия ($p < 0,01$)
Высота растения, см	77,7 ± 5,1	145,8 ± 4,8	47	124	328
Диаметр стебля, см	1,5 ± 0,5	2,8 ± 0,4	46	34	16
Ширина нижнего листа, см	2,2 ± 0,8	4,5 ± 0,6	51	34	17
Высота прикрепления первого початка, см	24,0 ± 4,1	54,9 ± 3,6	56	88	126
Число осей метелки	23,0 ± 3,3	44,4 ± 4,1	48	124	50

При этом наиболее стабильный (с точки зрения выполнения данной закономерности) признак – высота растения. Различия по данному признаку обычно выявляются даже при сравнении малых выборок (по 2-5 растений в каждой из сравниваемых групп). Для выявления различий по другим признакам требуются выборки большего размера.

Далее среди проростков оценивалась частота полиэмбрионии. Во всех вариантах среди полиэмбрионов встречались только двойни. В таблице 3 приводятся данные по материалу 2013 г. Указана частота полиэмбрионии среди проростков и частота подтвержденных цитологическим методом гаплоидов среди проростков.

Таблица 3 – Оценка частоты полиэмбрионии и гаплоидии среди проростков самоопыленных (а) и опыленных КМ (б) вариантов линии АТТМ, полученных из зерновок урожая 2013 г.

Вариант	Материнские гены	Частота двоен, %	Частота гаплоидов, %
9а	<i>y, bm</i>	0,0	0,2
9б		0,0	0,0
12а	<i>y, bm, wx</i>	0,5	0,5
12б		0,0	0,0
20а	<i>y, wx, lg</i>	0,8	0,0
20б		0,0	0,0
22а	<i>y, su</i>	5,0	0,0
22б		0,0	0,0

В варианте проращивания зерновок из початков, полученных в результате скрещивания линии АТТМ с линией КМ гаплоидов и полиэмбрионов не было выявлено.

На рисунке 3 показаны частоты гаплоидов и двоен среди проростков для всех исследованных вариантов линии АТТМ, полученные из самоопыленных початков урожая 2014 г. Отсутствие столбиков диаграммы в соответствующих вариантах равнозначно нулевым значениям данных показателей. Анализ представленных на диаграмме данных свидетельствует о максимальных частотах обоих рассматриваемых явлений в варианте 18 линии АТТМ. Интересно, что этот вариант уже выделялся нами ранее среди вариантов, наиболее перспективных по итогам полевых исследований.

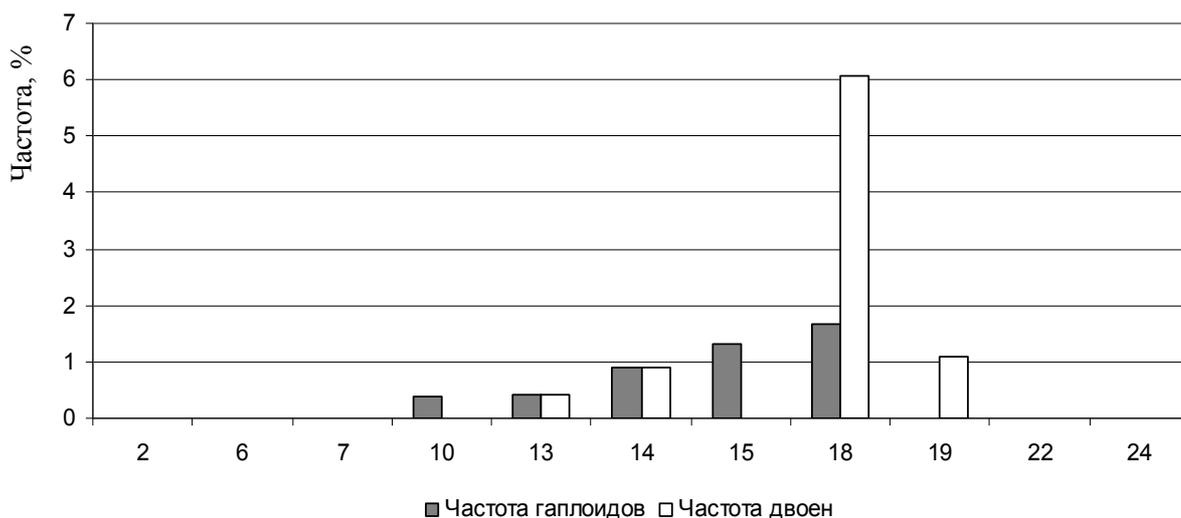


Рисунок 3 – Частота гаплоидов и двоен среди проростков различных вариантов линии АТТМ из самоопыленных початков урожая 2014 г.

На рисунке 4 приводятся аналогичные данные для свободноопыленных початков 2014 г. По частоте двоен здесь следует выделить особо варианты 18, 19 и 22, а по частоте гаплоидии – 2 и 22 варианты линии. Следует отметить, что для 2 и 22 варианта полученные значения частоты гаплоидии существенно различаются в случаях самоопыления и свободного опыления.

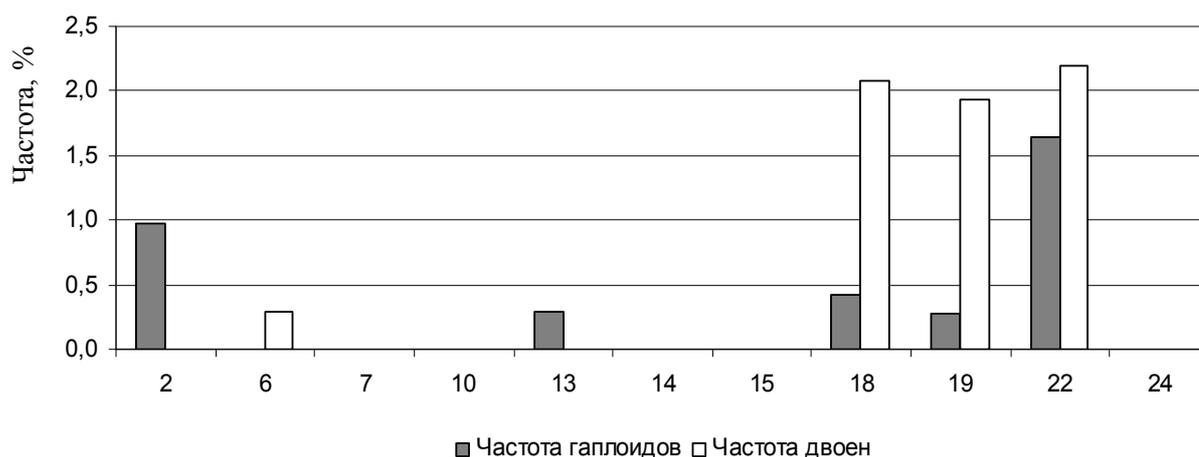


Рисунок 4 – Частота гаплоидов и двоен среди проростков различных вариантов линии АТТМ из свободноопыленных початков урожая 2014 г.

В таблице 4 представлены итоги определения частоты гаплоидов среди разных выборок растений – среди одиночных растений и среди двоен и определена общая частота гаплоидии в соответствующих вариантах самоопыленных и свободноопыленных растений линии АТТМ.

Таблица 4 – Оценка частоты полиэмбрионии и гаплоидии среди самоопыленных (а) и свободноопыленных (б) вариантов линии АТТМ у проростков из зерновок урожая 2014 г.

Вариант	Материнские гены	Частота гаплоидов среди одиночных растений, %	Частота гаплоидов среди двоен, %	Общая частота гаплоидов, %
2а	<i>bm, y</i>	0,0	0	0,0
2б		1,0	0	1,0
6а	<i>bm, lg, wx, gl, y</i>	0,0	0	0,0
6б		0,0	50	0,3
7а	<i>lg, wx, y</i>	0,0	0	0,0
7б		0,0	0	0,0
10а	<i>bm, lg, wx, su, y</i>	0,4	0	0,4
10б		0,0	0	0,0
13а	<i>bm, y</i>	0,4	50	0,9
13б		0,3	0	0,3
14а	<i>bm, y</i>	0,9	100	2,7
14б		0,0	0	0,0
15а	<i>lg, wx, y</i>	1,3	0	1,3
15б		0,0	0	0,0
18а	<i>bm, y</i>	1,8	9	2,6
18б		0,4	25	1,6
19а	<i>bm, y</i>	0,0	0	0,0
19б		0,3	29	1,3
22а	<i>y, su</i>	0,0	0	0,0
22б		1,7	13	2,1
24а	<i>bm, su, y</i>	0,0	0	0,0
24б		0,0	0	0,0

Среди проростков линии АТТМ, полученных из зерновок урожая 2013 г., в вариантах 12, 20 и 22 были отмечены единичные двойни, в которых оба близнеца были представлены диплоидами. Частота двоен в указанных вариантах среди всех проростков составила 0,5, 0,8, и 5,0% соответственно.

При проращивании зерновок 2014 г. встречались все возможные комбинации плоидности проростков-близнецов: диплоид-диплоидные (ДД)

двойни, гаплоид-диплоидные (ГД) и гаплоид-гаплоидные (ГГ) двойни. Соотношение между ними представлено на рисунке 5.

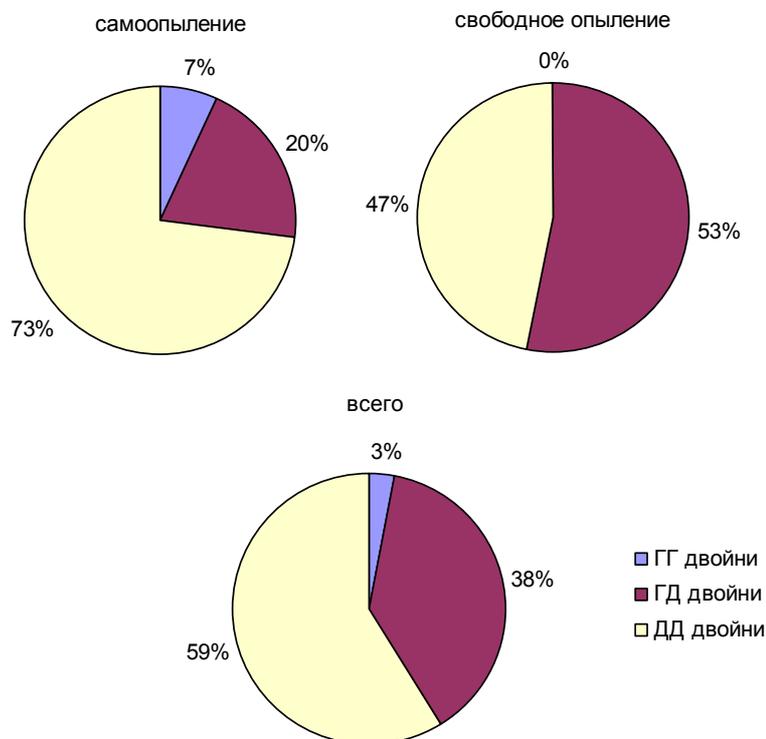


Рисунок 5 – Соотношение разных типов двоен среди проростков линии АТТМ из зерновок урожая 2014 г.

Таким образом, можно заключить, что в проанализированном с помощью морфологического и цитологического методов материале 2013-2014 гг. среди полиэмбрионов встречались различные типы двоен, причем среди проростков из зерновок самоопыленных початков преобладают диплоид-диплоидные двойни, а среди таковых из зерновок свободноопыленных початков – гаплоид-диплоидные двойни.

Максимальная частота двоен среди проростков из зерновок самоопыленных початков в материале 2013 г. составила 5,0% (в варианте 22), а в материале 2014 г. – 6,1% (в варианте 18). Максимальные значения данного показателя для проростков из зерновок свободноопыленных

початков в материале 2014 г. (на уровне 2,1-2,2%) отмечались в вариантах 18 и 22.

В материале 2013 г., полученном в результате опыления материнских растений линии АТТМ пыльцой линии КМ гаплоидов и двоен выявлено не было. В материале 2013 г., полученном в результате самоопыления растений гаплоиды встречались только среди одиночных растений и максимальная частота гаплоидии составила 0,5% в варианте 12.

В материале 2014 г. средняя частота гаплоидов среди одиночных растений, полученных в результате самоопыления составила 0,43%, а в случае свободного опыления – 0,34%. При этом общая частота гаплоидии (с учетом гаплоидов в составе двоен) среди всех растений в двух указанных случаях составила 0,95 и 0,60% соответственно.

Также следует отметить, что максимальная частота одиночных гаплоидов в случае самоопыления отмечена в варианте 18 (1,8%), а общая частота гаплоидов (среди всех растений) была наиболее высокой в вариантах 14 и 18 (2,6-2,7%). В случае свободного опыления максимальные значения данных показателей составляют 1,7 и 2,1% (в варианте 22) соответственно.

Выводы:

1. Частота гаплоидии может значительно варьировать не только между разными вариантами склонной к партеногенезу линии АТТМ, но и в разные годы исследований.

2. Согласно полевым данным, с 2006 по 2017 гг. в большинстве вариантов наблюдается тенденция к увеличению средней частоты гаплоидии из поколения в поколение. Многократное повышение средней частоты гаплоидии свидетельствует о высокой эффективности селекции в отношении данного признака в ряде вариантов, и особенно в вариантах линии 18 и 19.

3. У гаплоидов линии АТТМ отмечаются достоверно более низкие (47-56%) значения ряда признаков (высота растения, диаметр стебля, ширина нижнего листа, высота прикрепления первого початка, число осей в метелке)

по сравнению с диплоидами. При этом наиболее стабильно проявляются различия по признаку высоты растений.

4. В ходе выборочного проращивания некоторых вариантов 2013-2014 гг. среди полиэмбрионов отмечены различные типы двоен с преобладанием сочетания двух диплоидов (при самоопылении) или сочетания гаплоида с диплоидом (при свободном опылении).

5. Двойни и гаплоиды, встречались чаще в самоопыленных вариантах. Максимальные частоты двоен и гаплоидов отмечены в вариантах 18 и 22. Вариант 18 характеризуется максимальной частотой двоен (6,1%), одиночных гаплоидов (1,8%) и общей частотой гаплоидии (2,7%) при самоопылении. Вариант 22 – аналогичными показателями (2,2, 1,7 и 2,1%) при свободном опылении.

6. Средняя частота появления одиночных гаплоидов для изученных вариантов линии АТТМ находится в пределах 0,43%, а общая частота гаплоидии (с учетом гаплоидов в составе полиэмбрионов, составляющих, в среднем, 57% от всех гаплоидов) – в пределах 0,95%.

