

the electron microscopic analysis of synaptonemal complexes (SC), are presented. **Results.** We have analyzed causes of male sterility of hamsters, mice, voles interspecific hybrids. Non-homologous synapsis permits forming stable SC structure and provides further proceeding of meiosis. Probably, this process is under gene control. **Conclusions.** We caution against the direct transfer of the conclusions drawn in the study of species-specific chromosomal rearrangements, on the model of macroevolution.

Key words: speciation, polymorphism, interspecific hybrids, synaptonemal complex.

УДК 573.354:635.64

ЛІСОВСЬКА Т.П., КУЗЬМІШИНА І.І., КОЦУН Л.О., ВОЙТЮК В.П., АНДРЕЄВА В.В.

Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки,

Україна, 43025, м. Луцьк, пр. Воли, 13, e-mail: tlisovska@ukr.net

МЕЙОТИЧНА МУТАЦІЯ ТОМАТУ, ЩО ПОРУШУЄ КОНДЕНСАЦІЮ ХРОМАТИНУ

Мейотичний поділ клітин супроводжується складною реорганізацією хромосом, зокрема конденсацією і когезією сестринських хромосом, синапсисом гомологічних хромосом, регулярним розходженням до полюсів гомологів у першому і сестринських хроматид у другому поділі мейозу, що, зрештою, призводить до редукції числа хромосом вдвічі [15].

У профазі мітозу і мейозу хромосоми додатково конденсуються, хоча конденсація хромосом в мейозі відрізняється від мітотичної, що дозволяє здійснитися синапсису гомологічних хромосом і кросинговеру. В мітозі і мейозі суттєву роль у підтриманні структури хромосом і когезії сестринських хроматид відіграють білкові комплекси – конденсини і когезини. Когезія сестринських хроматид виникає в S-фазі і зберігається в ділянці центромери до анафази під час мітозу та до анафази II під час мейозу [7]. Когезія плеч сестринських хроматид в мейозі зникає до анафази I, що полегшує роз'єднання гомологів у місцях хіазм, але в ділянці центромери, де когезини захищені білком – шугошином, зберігається до анафази II. З'єднання сестринських хроматид у ділянці центромери забезпечує регулярне розходження гомологічних хромосом в анафазі I і регулярне розходження сестринських хроматид в анафазі II.

Останні генетичні та біохімічні дослідження почали проливати світло на молекулярні механізми, що лежать в основі когезії, конденсації і поділу хромосом під час мітотичного циклу клітин. Один з висновків полягає в тому, що конденсацію хромосом і когезію сестринських хроматид регулюють різні, але структурно схожі, мультисубодиничні

білкові комплекси, які називають конденсином і когезином, відповідно. В основі цих двох білкових комплексів лежать члени родини хромосомних АТФаз, так звані SMC (the structural maintenance of chromosomes) і нового класу білків – клейзинів. Конденсин складається з гетеродимерів білків АТФаз класу SMC2 і SMC4, і трьох субодиниць, які називають асоційованими з хромосомами поліпептидами (CAP у *Xenopus leavis* і *Homo sapiens*) [11, 13]. Когезини складаються із гетеродимерів SMC1 і SMC3 і клейзинів sc1 (клейзин α), Scc3 та деяких видоспецифічних. Хоча конденсини і когезини виконують аналогічні функції в обох поділах, в мейозі функціонують мейоз-специфічні ортологи мітотичних когезинів і конденсинів. Наприклад, в мейозі функціонує α -клейзин REC8, ортолог мітотичного Scc1 (Mcd1, Rad21) [16]. В мейозі, крім забезпечення когезії сестринських хроматид, когезини і конденсини задіяні у створенні поздовжніх осей гомологічних хромосом, які згодом формують латеральні елементи синаптонемного комплексу, тобто забезпечують синапсис гомологів в мейозі [17].

На сьогодні відомо про широке коло фенотипових ефектів порушень мейоза, які пов'язують з відсутністю або дефектом окремих конденсинів або когезинів. Показано, що значну гомологію до мейотичного когезина REC8 виявляють гени, мутації яких призводить до «злипання», фрагментації хромосом, порушення конденсації і довжини хромосом, ефектам десинапсису і асинапсису [4, 6, 18]. Заміну першого мейотичного поділу на мітотичний, який викликає мутація *afd* кукурудзи, також пояснюють дефектом гена з високою гомологією до REC8 [9].

До мутацій, які контролюють конденсацію

хромосом в мейозі, належить досліджуваний нами мутант томату (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *sti* (stickiness).

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження слугував мейотичний мутант томату *sti*, який входить до складу колекції мейотичних мутантів, зібраної в лабораторії генетики і селекції біологічного факультету СНУ імені Лесі Українки.

Мутація *sti* була відібрана за стерильністю в польових посівах томату сорту Глорія. Через повну чоловічу і знижену жіночу стерильність мутація підтримується у вигляді популяції ВС від схрещування гомозиготних за мутацією *sti* рослин в якості материнської форми із фертильними гетерозиготами в якості батьківської форми.

Бутони довжиною 2...3 мм фіксували в суміші етанол : крижана оцтова кислота у співвідношенні 3:1, зберігали у 70 % етанолі, фарбували ацетокарміном згідно загальноприйнятої методики. Перебіг мейозу аналізували у мікроспорогенезі. Для цитологічних досліджень готували давлені препарати пиляків на різних стадіях мейозу. Фертильність пилку визначали ацетокарміновим методом. Статистичну обробку даних генетичного аналізу здійснювали за методом χ^2 .

Результати та обговорення

У рослин, гомозиготних за мутацією *sti*, початок профазі I мейозу проходить без видимих відхилень. Так, у пізній лептотені можна побачити специфічне скупчення хромосом у ядрах мейоцитів у вигляді «букета» (рис. а). У пахітені спостерігаються нерівномірно потовщені синапсовані гомологічні хромосоми. Починаючи зі стадії диплотени і діакінезу, хромосоми характеризується нечіткими контурами, нерівномірною конденсацією хромосом, переплетінням хроматину між бівалентами, негомологічними хромосомами і унівалентами, які важко відокремити (рис. б). На стадії метафазі I (рис. в) спостерігається розташування хромосом поза межами екваторіальної площини, у анафазі I виявляються чисельні тяжі хроматину між полюсами та фрагментація хромосом (рис. г).

Оскільки під час першого мейотичного поділу виявляється значна кількість порушень, то до другого поділу переходить незначна кількість клітин. Мейоз II також проходить з

порушеннями типу переплетіння хроматину, містків і фрагментації хромосом.

Унаслідок зазначених порушень протягом мейозу, на стадії спорад утворюються переважно діади, діади з мікроядрами і тріади (рис. д). Частка цитологічно нормальних тетрад становить менше 12 %, подальший мікрогаметогенез зупиняється або порушується.

Мутантні рослини виявляють значну стерильність пилку, так, у гомозигот *sti/sti* фертильність пилку істотно нижча ($1,1 \pm 0,59$ %) у порівнянні з гетерозиготами *Sti/sti* ($81,78 \pm 2,21$ %). У зв'язку з тим, що переважна більшість спорад представлена діадами, стерильний пилкок (рис. е) має більший розмір, ніж пилкок досліджених раніше синаптичних мутантів томату (середня площа пилкових зерен у *sti/sti* $335,70 \pm 17,60$ мкм² порівняно з *Sti/sti* $491,08 \pm 7,21$ мкм² у гетерозигот *Sti/sti*).

У зв'язку із труднощами дослідження мейозу у мегаспорогенезі томату, ми вивчили вплив мутації *sti* на фертильність продуктів жіночого мейозу за зав'язуванням насінин на плід за штучного запилення квіток гомозиготних за мутацією *sti* рослин фертильним пилком гетерозиготних рослин. Середня кількість насінин на плід у гомозиготи *sti/sti* дорівнює $17,5 \pm 2,2$, у порівнянні з гетерозиготою *Sti/sti* $143,0 \pm 11,3$ насінин на плід. Отже мутація *sti* має вияв як у мікроспорогенезі, так і у мегаспорогенезі.

Генетичний аналіз встановив, що мутація *sti* має рецесивний характер успадкування і контролюється одним геном (χ^2 1:1 = 3,15). Треба відзначити, що в популяціях, отриманих від аналізуючого схрещування, спостерігали певну нестачу гомозиготних за мутацією рослин. За допомогою функціонального тесту на алелізм було встановлено, що мутація *sti* не алельна виявленим раніше мейотичним мутаціям томату *dsm1*, *dsm2*, *amd* і *as₄*.

Необхідно відмітити значну подібність за цитологічним виявом мейотичної мутації томату *as₄*, яка була досліджена П. Моенсом [14] і *sti*. За повідомленням П. Моенса, мутант *as₄* підвищує частоту одинарних кросоверних обмінів між маркерними генами 2-ої хромосоми [14] і, найбільш значно, в 7 разів, подвійних [1]. Мутація *as₄* має рецесивний моногенний характер успадкування. За нашими даними, ці мутації є неалельними.

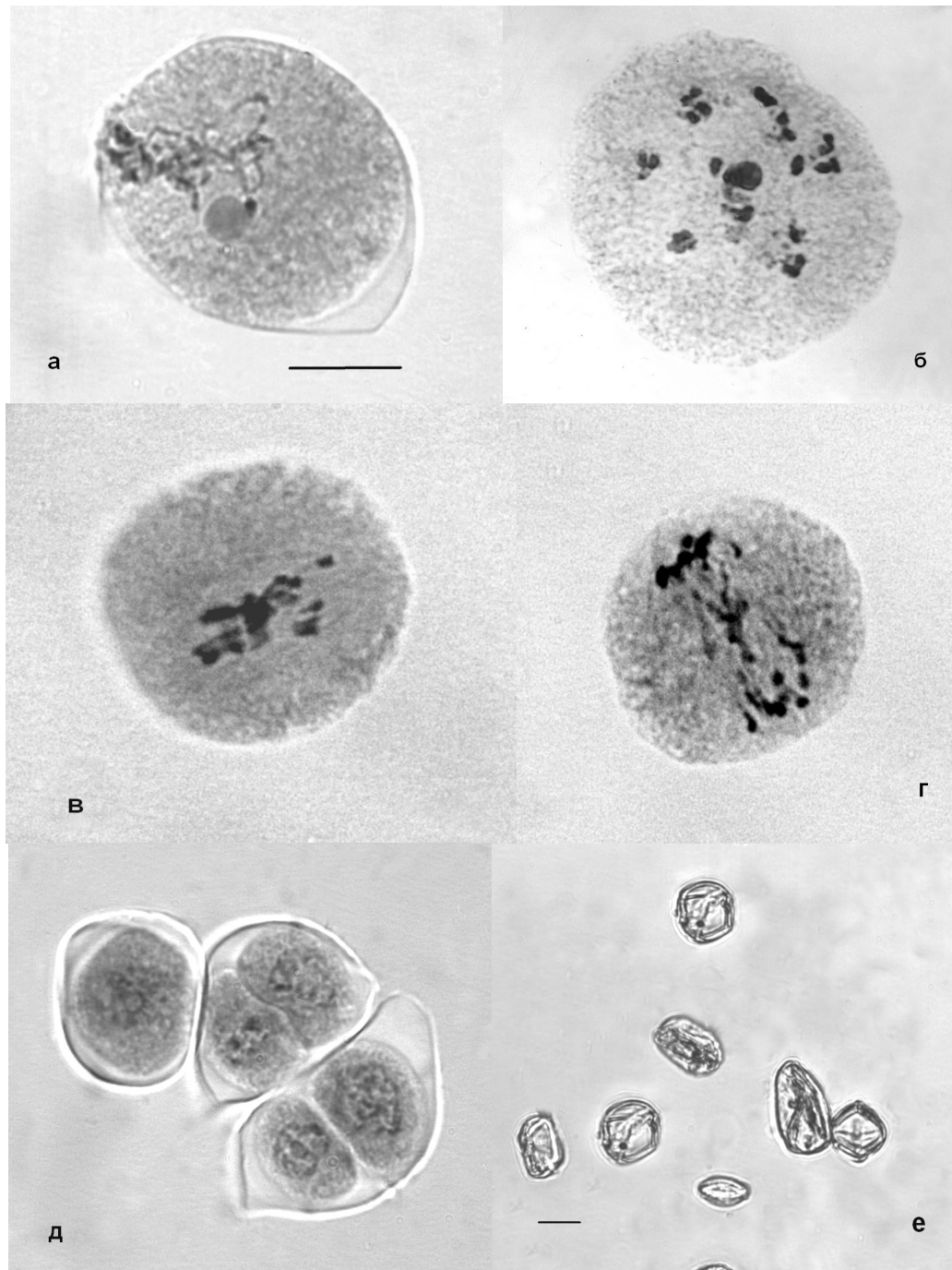


Рис. Мейоз у гомозигот *sti/sti*: **а** – пізня лептотена, **б** – діакінез, **в** – метафаза I, **г** – анафаза I, **д** – споради, **е** – пилкок. Масштабна лінійка – 10 мкм

Раніше нами було встановлено, що мутант *sti* виявив істотно вищий від контролю рівень спонтанних та індукованих рентгенівським опроміненням хромосомних аберацій в мітозі та істотно вищу частоту кросинговеру у гетерозигот і, більш значно, у гомозигот за цим геном [2].

Вперше мутація, яка викликала порушення конденсації і злипання хроматину, була описана у кукурудзи [5]. Фенотипові подіб-

ні мутації описані для різних видів рослин – лисохвоста [12], жита [3] та деяких інших. Залучення до дослідження мейозу молекулярно-біологічних методів дозволило встановити, що деякі дефектні гени, які фенотипово виявляються у порушенні конденсації хроматину, переплетінні хроматину негомологічних хромосом і їх фрагментації, належать до родини RAD21/REC8 клейзинів – складових когезинів. Зокрема, гомологію до REC8 виявив мутантний

ген SYN1/DIF1 *Arabidopsis thaliana* [4, 6] та ген OsRad21-4 *Oryza sativa* [18], цитологічний вияв яких дуже подібний до досліджуваного нами мутанту sti томату.

За конденсацію хроматину в профазі мейозу відповідають комплекси конденсинів і когезинів. До складу когезинів в мітозі входять щонайменше два представники клейзинів α – Scc1 (мейотичний ортолог Rec8) і Scc3. Клейзин Scc3 приєднується до центру молекули Scc1 і таким чином з'єднує кільце, складене із гетеродимерів SMC1 і SMC3. Такі кільця охоплюють сестринські хроматиди, утримуючи їх разом до анафази [7, 10].

Ми передбачаємо, що дуже подібні за фенотиповим виявом в мейозі неалельні мутації томату as₄ і sti можуть бути мутаціями мейотичних ортологів клейзинів α : Scc1 (Rec8) і Scc3 (мейотичний ортолог на сьогодні невідомий). Можливо, це мутації генів – паралогів Rec8. Так, у геномі арабідопсису знайдено три гена RAD21 (мейотичний ортолог

Rec8) [8], а в геномі рису – чотири гена RAD21 [18], які розрізняються за подібністю до родини клейзинів Rec8. Сподіваємося, що подальші дослідження мутантів томату дозволять детально дослідити механізми структурного підтримання хромосом в мейозі рослин.

Висновки

Мейотична мутація томату sti характеризується очевидно нормальним перебігом початку мейозу, порушення конденсації хроматину спостерігаються, починаючи з диплотени профазі I. Починаючи зі стадії диплотени і діакінезу, хромосоми характеризується нечіткими контурами, нерівномірною конденсацією хромосом, переплетінням хроматину між бівалентами, негомологічними хромосомами і унівалентами, які важко відокремити. Мутація виявляє рецесивний моногенний характер успадкування. Вона виявляє повну чоловічу і знижену жіночу стерильність.

Література

1. Жученко А.А., Король А.Б. Рекомбинация в эволюции и селекции. – М.: Наука, 1985. – С. 71–72.
2. Лісовська Т.П., Войтюк В.П., Кузьмичина І.І., Страту Л.С. Рекомбінаційні і репараційні властивості двох мейотичних мутантів томату // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: зб. наук. пр. – К.: Логос, 2012. – 4. – С. 139–144.
3. Соснихина С.П., Кириллова Г.А., Михайлова Е.И. Нарушение конденсации мейотических хромосом, вызываемое мутацией mei8 у ржи *Secale cereal* L. // Генетика. – 2003. – 39, № 3. – С. 362–369.
4. Bai X., Peirson B.N., Dong F., Xue C., Makaroff C.A. Isolation and Characterization of SYN1, a RAD21-like Gene Essential for Meiosis in Arabidopsis // The Plant Cell. – 1999. – 11. – P. 417–430.
5. Beadle G.W. A gene for sticky chromosomes in *Zea mays* // Z. Indukt. Abstamm. Vererbungsl. – 1932. – 63. – P. 195–217.
6. Cai X., Dong F.G., Edelmann R.E., and Makaroff C.A. The Arabidopsis SYN1 cohesin protein is required for sister chromatid arm cohesion and homologous chromosome pairing // J. Cell Sci. – 2003. – 116. – P. 2999–3007.
7. Calvente A., Barbero J.L. Cohesins and Cohesin-Regulators in Meiosis [Електронний ресурс] // Meiosis – Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity /Edited by Andrew Swan. – InTech. – 2012. – P. 35–66. – Режим доступу: <http://www.intechopen.com>.
8. Dong F., Cai X., Makaroff C.A. Cloning and characterization of two Arabidopsis genes that belong to the RAD21/REC8 family of chromosome cohesin proteins // Gene. – 2001. – 271. – P. 99–108.
9. Golubovskaya I.N., Hamant O., Timofejeva L., Wang C.R., Braun D., Meeley R., Cande Z. Alleles of afd1 dissect REC8 functions during meiotic prophase I // Journal of Cell Science, 2006. – 119. – P. 3306–3315.
10. Haering C.H., Kim N. Building and breaking bridges between sister chromatids // BioEssays. – 2003. – 25. – P. 1178–1191.
11. Hirano T. The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair // Genes & Development. – 2002. – 16. – P. 399–414.
12. Johnsson H. Meiotic aberrations and sterility in *Alopecurus myosuroides* Huds // Hereditas. – 1944. – 30. – P. 469–566.
13. Losada A., Hirano T. Shaping the metaphase chromosome: coordination of cohesion and condensation // Bioessays. – 2001. – 23. – P. 924–935.
14. Moens P.B. Genetic and cytological effects of three desynaptic genes in the tomato // Canad. J. Genet. and Cytol. – 1969. – 11, N 4. – P. 857–859.
15. Pawlowski W.P., Cande W.Z. Coordinating the events of the meiotic prophase // Trends in Cell Biology. – 2005. – 15, N 12. – P. 674–681.
16. Schleiffer A., Kaitna S., Maurer-Stroh S., Glotzer M., Nasmyth K., Eisenhaber F. Kleisins: a superfamily of proteins associated with the heads of both bacterial and eukaryotic SMC proteins // Mol. Cell. – 2003. – 11. – P. 571–575.

17. Yu H.G., Koshland D. Chromosome Morphogenesis: Condensin-Dependent Cohesin Removal during Meiosis // Cell. – 2005. – 123. – P. 397–407.
18. Zhang L., Tao J., Wang Sh., Chong K., Wang T. The rice OsRad21-4, an orthologue of yeast Rec8 protein, is required for efficient meiosis // Plant Molecular Biology. – 2006. – 60. – P. 533–554.

LISOVSKA T.P., KUZMISHYNA I.I., KOTSUN L.O., VOITIUK V.P., ANDREEVA V.V.

*Lesia Ukrainka Estern European National University,
Ukraine, 43025, Lutsk, Voli prosp., 13, e-mail: tlisovska@ukr.net*

TOMATO MEIOTIC MUTATION THAT DISORDERS CHROMATIN CONDENSATION

Aims. This paper presents the results of cytological and genetic analysis of new meiotic mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sti. **Methods.** Studies on meiosis in microsporogenesis were made in iron-acetocarmine smears of anther fixed in acetic alcohol (3:1). **Results.** Cytological analysis revealed that starting from the stage dyplotene and diakinesis chromosomes showed defects in condensation by fuzzy contours, irregular chromosomes condensation, intertwined chromatin, non-homologous chromosomes and univalents that are difficult to identification. Meiotic mutation tomato sti (stickyness) is monogenic recessive nature of inheritance. Mutant plants exhibit a high male and female sterility. **Conclusions.** Meiotic mutant of tomato sti is defected in chromosome condensation.

Key words: meiosis, meiotic mutants, chromosome condensation, *Lycopersicon esculentum* Mill.

УДК 579.873.71:577.214.2:004.9

ПОЛИЩУК Л.В., МАЦЕЛЮХ Б.П.

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
Украина, 03680, г. Киев, ул. Заболотного, 154, e-mail: LVPolishchuk@ukr.net*

рРНК-ГЕНЫ АКТИНОМИЦЕТОВ, ГОМОЛОГИЧНЫЕ ГЕНАМ рРНК-КЛАСТЕРА *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-2

Установлено, что рибосомальная РНК составляет до 75 % всей РНК клеток как эукариот, так и прокариот [1]. Определено наличие 3 видов рРНК в клетках прокариот: 16S рРНК, 23S рРНК и 5S рРНК [1–5]. По одному рРНК-гену трех видов образуют в хромосомах микроорганизмов кластер и транскрибируются в виде одной молекулы прерибосомальной РНК с последующим сплайсингом [1]. Выявлена множественность рРНК-оперонов генов в клетках организмов эукариот и прокариот [1–3]. Например, у *Streptomyces ambofaciens* обнаружено 4 копии рРНК-оперонов, 7 копий у *S. venezuela*, по 6 копий у *S. lividans*, *S. coelicolor*, *S. griseus* и многих других видов (*Rhodobacter sphaeroides* – 3 копии) [2–4]. По одному оперону найдено в хромосоме других родов актиномицетов – *Mycobacterium bovis*, *M. leprae* [5].

У ряда штаммов актиномицетов выявлены отличия в строении рРНК-оперонов. Так, у *S. niveus* NCIMB 11891 (NZ_CM002285) в хромосоме выявлены 6 рРНК-оперонов, но только в двух из них есть 5S рРНК-гены, а 23S рРНК-гены представлены в виде 2 фрагментов

(996 пн и 1396 пн). Только 2 рРНК-оперона из трех содержат 5S рРНК-гены у штамма *Rothia dentocaris* ATCC 17831 (NC_014643).

Как известно, ДНК стрептомицетов характеризуется ГС-богатым составом (69–73 %), однако, рРНК-кластеры имеют уменьшенное содержание данных нуклеотидов. Так, рРНК гены *S. ambofaciens* содержат 59 %, 57 % и 60 % (соответственно, 16S рРНК-гены, 23S рРНК-гены и 5S рРНК-гены) [1].

В настоящее время большое внимание исследователей уделяется изучению нуклеотидного строения рРНК-генов микроорганизмов [1–7, 10]. Например, сравнительный анализ первичного строения 16S рРНК-гена используется для определения таксономической принадлежности. Одними из основных положений генотипирования бактерии служат нуклеотидный состав (соотношение Г/С и А/Т пар) хромосомной ДНК и степень гомологии нуклеотидных последовательностей 16S рРНК. Кроме того, установлено, что устойчивость к аминогликозидным антибиотикам может быть вызвана модификациями 16S рРНК: метилированием рРНК или ее gts-мутацией [6, 7].