

fibroblasts and fibroblasts were passaged and incubate for 5–7 days more. After these fibroblasts were fixed and analyzed by standard fluorescence microscopy for GFP signals. **Results.** Microscopy results showed that fibroblasts are present with varying degrees of light intensity in the experimental probes. There were a low signal in order to autofluorescence in the control. **Conclusion.** These results demonstrate the feasibility of reliable transfer of genetic material between cells of WBC and fibroblasts of mice strains with high efficiency and allow us to offer this system as a model to studying the transfer of genetic information between the cells in mammals.

Key words: mice fibroblasts, the WBC of mice, the transfer of genetic information, GFP.

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

*Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки
Україна, 43025, м. Луцьк, пр. Воли, 13, e-mail: tlisovska@ukr.net*

МЕЙОТИЧНА МУТАЦІЯ ТОМАТУ, ЩО КОНТРОЛЮЄ ВИХІД ІЗ МЕЙОЗУ

У життєвому циклі організмів, які розмножуються статевим шляхом, відбувається редукція числа хромосом під час складного поділу – мейозу. Мейоз характеризується значною універсальністю у всіх досліджених на сьогодні організмах як за цитологічними стадіями, так і за третинною будовою і функцією білкових продуктів, які беруть участь в цьому процесі [1]. Вважають, що мейоз виник в процесі еволюції на основі механізмів генетичної рекомбінації і мітозу. Розрізняють не менше чотирьох основних відмінностей мейозу від мітозу. Перша відмінність полягає у синапсі і рекомбінації гомологічних хромосом під час профазі I мейозу. Внаслідок кросинговеру одночасно з когезією сестринських хроматид утворюються хіازми, які дозволяють орієнтуватися бівалентам у екваторіальній площині клітини до протилежних полюсів веретена поділу в мейозі I (першому поділі). По друге, сестринські хроматиди прикріплюються до одного полюса веретена поділу, тобто виявляють уніполярність центромер. Таким чином сестринські хроматиди розходяться до полюсів лише під час анафази другого мейотичного поділу. Монополярне прикріплення кінетохорів сестринських хроматид в мейозі фундаментально відрізняється від мітозу, де спостерігається біполярне прикріплення кінетохорів до протилежних полюсів веретена поділу. Третя значна відмінність виявляється у збереженні когезії між сестринськими хроматидами в ділянці, що оточує центромери, до анафази другого поділу мейозу. Нарешті, для мейозу характерна відсутність S – фази між двома поділами мейозу. В нормі мітотичні поділи не починаються без подвоєння кількості ДНК і реплікації хромосом, а в мейозі це правило порушується – відбувається супресія S – фази після першого мейотичного

поділу, що не заважає клітинам переходити до другого поділу [1, 12]. Ця остання принципова відмінність мейозу від мітозу забезпечує редукцію числа хромосом в дочірніх клітинах.

До генетичного контролю мейозу залучена велика кількість генів, про що свідчить існування багатьох неалельних мутацій, які впливають на нормальний перебіг мейозу, так званих мейотичних мутацій. У кукурудзи і арабідопсису – видів із найбільш значними колекціями мейотичних мутантів серед рослин – встановлено щонайменше 35 неалельних генів, які контролюють окремі ланки мейозу – від вступу в мейоз до закінчення цього процесу [9, 10].

Мейотичні мутації умовно класифікують за подіями, на які вони впливають під час мейозу. Розрізняють мутації, які викликають відсутність мейозу, відсутність першого поділу мейозу, синаптичні мутації, мутації, які впливають на мейотичну рекомбінацію, на другий поділ мейозу і т.д. [див. огляди: 6, 9, 10].

У роботі ми звертаємо увагу на групу мутацій так званого додаткового або третього поділу мейозу. Для мутантів цього типу характерним є наявність одного або кількох додаткових поділів мейозу після завершення нормального перебігу мейозу. Перед таким поділом не відбувається синтез ДНК і реплікація хромосом. Таким чином додатковий поділ є повторенням другого поділу мейозу, а нормальні алелі цих генів відповідають за вихід клітин із мейозу. Мутацій даного типу на сьогодні відомо небагато, їхня класифікація суперечлива (деякі автори відносять їх до мутацій порушення мітозів у мікрогаметогенезі), тому дослідження нових мутацій у різних видів надасть відповідь щодо причин спостерігаємих порушень.

До групи мутацій, які контролюють заве-

ршення мейозу належить досліджуваний нами

Матеріали і методи.

Мутант *amd* був виділений за стерильністю в M_2 томату сорту Факел, отриманого із насіння, опроміненого γ -променями в дозі 500 Гр [3]. Через повну чоловічу стерильність мутація підтримується у вигляді популяції ВС від схрещування гомозиготних за мутацією *amd* рослин в якості материнської форми із фертильними гетерозиготами в якості батьківської форми.

Бутони довжиною 2...3 мм фіксували в

Результати та обговорення

Гомозиготні за мутацією *amd* рослини характеризуються цитологічно нормальним перебігом мейозу в мікроспорогенезі до анафази II. Мейоз не завершується характерним для телофази II цитокінезом з утворенням чотирьох мікроспор, а дочірні ядра знову діляться. Перед цим поділом не відбувається деспіралізації хромосом, реплікації ДНК і подвоєння хроматид, то-

мутант томату (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

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

му хромосоми гаплоїдного набору нерегулярно розходяться до полюсів, після чого відбувається цитокінез. На стадії тетради у мейоцитах спостерігаються від п'яти до вісьми мікроспор неправильної форми (рисунок). Подальший мікрогаметогенез зупиняється або порушується. Мутація отримала назву – *amd* (additional meiotic division).

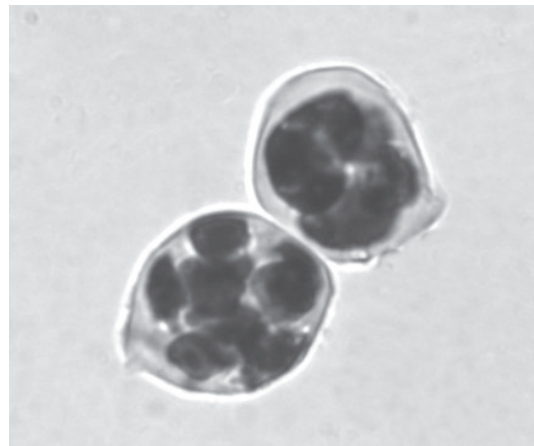


Рис. Мікроспороцити на стадії тетради у гетерозиготних (зліва) та гомозиготних (справа) за мутацією *amd* рослин томату

Внаслідок порушення мейозу у мутантних рослин спостерігається 100 %-ва стерильність пиляку, самозапильні плоди не утворюються. Пилок дуже дрібний, варіює за формою і розміром (середня площа пилякових зерен у *amd/amd* $222,47 \pm 25,20$ мкм² порівняно з $469,48 \pm 4,83$ мкм² у гетерозигот *Amd/amd*). Очевидно, порушення мейозу відбувається лише в мікроспорогенезі, тому що за штучного запилення квіток гомозиготних за мутацією рослин фертильним пиляком гетерозиготних рослин спостерігається зав'язування плодів із життєздатним насінням ($70,60 \pm 6,70$ насінин на плід у гетерозигот *Amd/amd* і $47,60 \pm 5,00$ – у рослин, гомозиготних за мутацією *amd*).

Генетичний аналіз встановив, що мутація

amd має рецесивний вияв і контролюється одним геном ($\chi^2_{3:1} = 0,15$). За допомогою функціонального тесту на алелізм було встановлено, що мутація *amd* не алельна виявленим раніше мейотичним мутаціям томату *dsm1* і *sti*.

До цитологічно подібних належать алельні мутації *po* [7], *ms-4* [2] і *ms-6* [5] кукурудзи, мутація *po* лисохвоста [15], "поділ у тетрадах" жита [4], *ms5-1*, *tdm1*, *pollenless3-2* у *Arabidopsis thaliana* [11, 20, 21] та у деяких інших видів [8, 14 - 16, 19] (таблиця). Додатковий поділ може бути один або декілька. Мутації мають вияв лише у мікроспорогенезі або у мікро- і мікроспорогенезі [10, 17]. У випадках, коли проводили генетичний аналіз, був встановлений рецесивний моногенний характер успадкування, крім

мутації "поділ у тетрадах" жита, яка контролюється двома генами [4] і мутації *tdm1* арабідопсису, яка виявляє неповне домінування залежно від генетичного фону і тривалості світлового дня [20]. Хоча переважна більшість виявлених мутацій цього типу належить до рослин, також подібний фенотиповий вияв притаманний мутації *mus 8* у гриба *Neurospora* [19] та мутація *roughex* у *Drosophila melanogaster* [14]. Той факт, що у найбільших за обсягом колекціях ме-

йотичних мутантів рослин – кукурудзи і арабідопсису, спонтанні та індуковані різними чинниками мутації додаткового поділу мейозу, виділені із різних популяцій, виявились алелями одного гена (*po*, *ms-4* і *ms-6* кукурудзи [17]; *ms5-1*, *tdm1*, *tdm1-1*, *pollenless3-2* арабідопсису [10]) свідчить про те, що за контроль виходу мейоцитів (спороцитів) із мейозу імовірно відповідає один ген.

Таблиця. Мейотичні мутації додаткового поділу мейозу

Символ гену	Вид, походження	Характер успадкування	К-ість додаткових поділів	Літературне джерело
<i>po</i>	<i>Zea mais</i> , sp	1 rs	1-4	Beadle G. W., 1929
<i>ms-4</i> ал <i>po</i>	Zea mais , HMC	1 rs	1-4	Голубовская И.Н., Урбах В.Г., 1981
<i>ms-6</i> ал <i>po</i>	Zea mais	1 rs	1-4	Albertson, M. C., Philips, R. L., 1981
<i>td₁</i> і <i>td₂</i>	<i>Secale cereale</i> L, sp	2 rs	один	Соснихина С. М., 1980.
<i>po</i>	<i>Alopecurus myosuroides</i> , sp	н.д.	один	Johnsson H., 1944
<i>mus 8</i>	Neurospora	н.д.	багато	Raju N. B., 1986
	<i>Chlorophitum elatum</i> , sp	н.д.	1-3	Koul A. K., 1970
	Rumohra aristata , sp	н.д.	один	Bhavandan K. W., 1971
<i>ms5-1</i> ал <i>tdm1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , EMC	1 rs	один	Chaudhury A.M. et al., 1994
<i>ms5-2</i> ал <i>tdm1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>t-DNA</i>	1 неповне домінування	один	Glover et al., 1998
<i>tdm1</i> , ал <i>tdm1-1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>t-DNA</i>	1 неповне домінування	один	Ross K. J. et al., 1997
<i>pollenless3-2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>t-DNA</i>	1 rs	один	Sanders et al., 1999
<i>roughex</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	1 rs	один	Gonczy P. et al., 1994
<i>amd</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> , γ - rays	1 rs	один	Лисовская Т.П., 1994

Примітки. ал – алельний, sp – спонтанна мутація, *t-DNA* – індукований *t-DNA* агробактерії, HMC – індукований нітрозометилсечовиною, EMC – індукований етил метан сульфонатом, н.д. – не досліджували.

У наведених роботах автори розглядають вияв мутантного гену або як повторення другого поділу мейозу, який в нормі відбувається без попередньої реплікації ДНК [6, 14, 20], або як передчасний перехід мікроспор до мітотичних поділів у мікроспорогенезі [4, 7, 17]. Детальний аналіз мутації *amd* томату, виду, який характеризується симультанним типом цитокінезу у мейозі мікроспороцитів, свідчить на користь першої гіпотези, тому що мутантний ген *amd*

викликає додаткове друге ділення мейозу, яке відбувається у томату до цитокінезу і відокремлення мікроспор, тобто до переходу до мікрогаметогенезу.

У арабідопсису було встановлено, що ген *MS5* кодує специфічний білок, який містить 434 амінокислоти, з обмеженою подібністю до білку синаптонемного комплексу щурів *SCP1* і регуляторної одиниці циклін залежної кінази *Xenopus* [13]. *ms5-1* аллель зменшує цей білок до

129 амінокислот (близький за розмірами до *pollenless 3-2*) и *ms5-2* аллель зменшує до 322 амінокислот [13, 21]. Відомо, що у регуляції клітинного циклу значна роль належить циклін-залежним кіназам (CDK), які можуть діяти як в мітозі, так і в мейозі або бути мейоз специфічними. Так, для ксенопуса, було показано що рівень цикліну В, зв'язаного з CDK, різко знижується наприкінці мітозу і лише наполовину у кінці мейозу I, запобігаючи вступу в S-фазу [18]. Білковий продукт гена *Roughex (Rux)* у *Drosophila* дрозофіли діє як інгібітор CDK, га-

льмує вступ в S - фазу, запобігаючи накопичення білка – цикліну Суs А протягом G₁-фази. Його дефіцит у мутанта *roughex* призводить до додаткового порушеного третього поділу мейозу без синтезу ДНК, а надлишкова експресія не дозволяє клітинам переходити до другого поділу мейозу [14]. Дослідження мейотичних мутантів із додатковим поділом мейозу дозволить встановити молекулярні механізми контролю переходу від першого до другого поділу мейозу без S - фази.

Висновки

Мейотична мутація томату *amd* характеризується нормальним перебігом першого і другого поділів мейозу та додатковим поділом ме-

йозу в мікроспорогенезі. Вона виявляє повну чоловічу стерильність але майже нормальну жіночу фертильність.

Література

1. Богданов Ю.Ф. Изменчивость и эволюция мейоза // Генетика. – 2003. – Т. 39, №4. – С. 453-473.
2. Голубовская И.Н., Урбах В.Г. Исследования ателизма мейотических мутаций с фенотипически подобными нарушениями мейоза // Генетика. – 1981. – Т. 17. – С. 1975-1982.
3. Лисовская Т.П. Мейотические мутанты томата, индуцированные гамма-излучением // Молекулярно-генетические маркеры растений: Матер. Всесоюз конф. –К., 1994. – С. 95-96.
4. Соснихина С.М., Смирнов В.Г., Забирова Э.Р. Генетический контроль поведения хромосом в мейозе у инбредных линий диплоидной ржи (*Secale cereale L.*). Сообщение IV. Деления в тетрадах // Генетика. – 1980. – Т. 16, №4. – С. 677-683.
5. Albertson, M. C. and Philips, R. L. Developmental cytology of 13 genetic male sterile loci in maize // Can. J. Genet. Cytol. – 1981. – Vol. 23. – P. 195-208.
6. Baker B.S., Carpenter A.T.C., Esposito M.S. et al. The genetic control of meiosis // Annu. Rev. Genet. – 1976. – Vol.10. – P. 53-134.
7. Beadle G. W. A gene for supernumerary mitoses during spore development in *Zea mays* // Science. – 1929. – Vol. 50. – P. 406-407.
8. Bhavandan K. W. Supernumerary cell division during meiosis in *Rumohra aristata* (Fovst) // Cytologia. – 1971. – Vol. 36, №4. – P. 575-578.
9. Cand W.Z., Golubovskaya I., Wang C.J.R., Harher L. Meiotic genes and meiosis in maize / Bennetzen J.L., Hake S. (eds.) Maize handbook // Genetics and Genomics. – Springer Science, Busness Media LLC, 2009. – Vol. II. – P. 353-375.
10. Caryl A.P., Jones G.H., Franklin F.C.H. Dissecting plant meiosis using *Arabidopsis thaliana* mutants // Journal of Experimental Botany. – 2003. – Vol. 54, is. 380. – P. 25-38.
11. Chaudhury A.M., Lavithis M., Taylor P.E. et al. Genetic control of male fertility in *Arabidopsis thaliana*: structural analysis of premeiotic developmental mutants // Sexual Plant Reproduction. – 1994. – Vol. 7. – P. 17-28.
12. Cnudde F., Gerats T. Meiosis: Inducing Variation by Reduction // Plant Biol. – 2005. – Vol. 7. – P. 321-341.
13. Glover J., Grelon M., Craig S. et al. Cloning and characterization of MS5 from *Arabidopsis*: a gene critical in male meiosis // The Plant Journal. – 1998. – Vol. 15. – P. 345-356.
14. Gonczy P., Thomas B.J., DiNardo S. *roughex* is a dosedependent regulator of the second meiotic division during *Drosophila* spermatogenesis // Cell. – 1994. – Vol. 77. – P. 1015-1025.
15. Johnsson H. Meiotic aberrations and sterility in *Alopecurus myosuroides* Huds. // Hereditas. – 1944. – Vol. 30. – P. 469-566.
16. Koul A. K. Supernumerary cell division following meiosis in the spider plant // Genetica. – 1970. – Vol. 41, №3. – P. 305-310.
17. Liu Q., Golubovskaya I., Cande W. Z. Abnormal cytoskeletal and chromosome distribution in *po*, *ms4* and *ms6*; mutant alleles of polymitotic that disrupt the cell cycle progression from meiosis to mitosis in maize // Journal of Cell Science. – 1993. – Vol. 106. – P. 1169-1178.
18. Pérez-Hidalgo L., Moreno S., Martín-Castellanos C. Modified Cell Cycle Regulation in Meiosis // Genome Dyn. Stab. – R. Egel, D.-H. Lankenau (eds) Recombination and Meiosis: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007. – Vol. 2 – P. 307-353.

19. Raju N. B. Postmeiotic mitosis without chromosome replication in a mutagen sensitive *Neurospora* mutant // Exp. Mycol. – 1986. – Vol. 10. – P. 243-251.
20. Ross K. J., Fransz P., Armstrong S. J. et al. Cytological characterization of four meiotic mutants of *Arabidopsis* isolated from T-DNA-transformed lines // Chromosome Research. – 1997. – Vol.5. – P. 551-559
21. Sanders P.M., Bui A.Q., Weterings K. et al. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants // Sexual Plant Reproduction. – 1999. – Vol. 11. – P. 297-322.

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

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

MEIOTIC MUTAT TOMATY CONTROLLING EXIT FROM MEIOSIS

Aims. This paper presents the results of cytological and genetic analysis of new meiotic mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Methods.** Studies on meiosis in microsporogenesis were made in iron-acetocarmine smears of anther fixed in acetic alcohol (3:1). **Results.** Cytological analysis revealed the normal course of meiosis until anaphase II, after which there is an additional second division of meiosis without S - phase. Meiotic mutation tomato *amd* (additional meiotic division) is monogenic recessive nature of inheritance. Mutant plants exhibit a complete male sterility but normal female fertility. **Conclusions.** Meiotic mutant of tomato *amd* controls the completion of meiosis.

Key words: *Lycopersicon esculentum*, meiosis, meiotic mutants, additional meiotic division.

ЛЫСЕНКО Н.Г., ЛЯН ХАОЮАНЬ, КЛИМЕНКО В.В.,

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина,
Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы 4, e-mail: stemway@gmail.com*

ОВОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И СПОНТАННЫЙ ПАРТЕНОГЕНЕЗ У ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА *BOMBYX MORI* L.

Вариабельность проявления морфологических и физиологических признаков, детерминированных в яйце в результате завершения процессов оогенеза (овогенетическая изменчивость), была показана на зрелых ооцитах тутового шелкопряда, полностью сформировавшихся в яичнике, трансплантированном в полость тела самца на стадии личинки [1]. В качестве донора яичников в этих опытах были использованы клоны, что позволяет продолжать исследования обнаруженного явления на том же самом материале в любое время. Задача сводится к изучению потенциала развития зрелого яйца в зависимости от его положения в овариоле. Партеноклоны являются удобной моделью для решения подобной задачи, поскольку в имаго зрелые ооциты заполняют восемь достаточно длинных овариол, которые легко можно разрезать на части, и, объединив ооциты соответствующих частей от бабочек одного клона, оценить тем или иным способом потенциал развития яиц в каждом отрезке овариолы. Так, овогенетическая изменчивость была подтверждена оценкой амейотического партеногенеза яиц из разных участков овариолы в клонах, отличных от астауровского

клона P29 и во всех изученных клонах без исключения – при оценке с помощью мейотического партеногенеза [2].

В настоящей работе мы используем для оценки потенциала развития неоплодотворенного яйца так называемый спонтанный партеногенез, который известен у тутового шелкопряда уже несколько сот лет и имеет интересную историю [3]. Причина этого очень проста: развивающееся яйцо меняет свою окраску после формирования серозы с желтой на темно-серую в течение нескольких дней после оплодотворения; когда то же самое происходило с яйцами, отложенными девственными самками, это вызывало и до сих пор вызывает живой интерес к развитию, начавшемуся явно без участия самца. Простой эксперимент показывает, что такое развитие не является совершенно самопроизвольным: аккуратно извлеченные из брюшка бабочки неоплодотворенные яйца остаются не пигментированными, а отложенные девственными самками того же клона пигментируются в разной степени с определенной, характерной для клона частотой, что свидетельствует о наличии факторов в половых путях самки, которые активируют зре-