

## ГОМОЛОГІЧНА РЕКОМБІНАЦІЯ У ГЕТЕРОЗИГОТНИХ ЗА МЕЙОТИЧНИМИ МУТАЦІЯМИ РОСЛИН ТОМАТУ

Генетична рекомбінація є потужним джерелом мінливості живих організмів. Вона забезпечує їхнє пристосування до змінних умов середовища, еволюцію і керувану людиною селекцію [1]. Найбільше значення у цьому відношенні має гомологічна рекомбінація генів — кросинговер, який відбувається у профазі I мейозу. Гомологічна рекомбінація ініціюється дволанцюговими розрізами ДНК, які здійснюються ендонуклеазою — топоізомеразою II, продуктом гена *Spo11*, яка є похідною топоізомеразою VI архебактерій [2]. Після зближення гомологічних хромосом, яке стабілізується синаптонемним комплексом, і розв'язання обмінним або безобмінним шляхом структури Холідея, в першому випадку хроматиди взаємно обмінюються ділянками. Крім індукції комбінаційної мінливості, кросинговер призводить до утримання гомологів у бівалентах в місцях хіазм (обмінів) до анафази I, чим забезпечує регулярну сегрегацію гомологічних хромосом у першому поділі мейозу [3]. Для того, щоб в анафазі першого поділу мейозу гомологічні хромосоми могли вірно розійтися до полюсів, необхідно, щоб між ними відбувся, щонайменше, один кросоверний обмін (облігатний або обов'язковий), який би утримував гомологи разом до анафази I [4].

В останні десятиріччя спостерігається значний прогрес у розумінні процесів перебігу мейозу, кросинговеру, репарації і конверсії генів [2–5]. Хоча остаточної відповіді на питання, які саме гени і у якій послідовності відповідають за процеси нормального перебігу мейозу і важливих генетичних подій, які відбуваються під час мейозу — кросинговеру, конверсії генів і репарації ДНК, ще немає, однак встановлений тісний зв'язок між цими процесами. Значний успіх у розумінні генетичного контролю мейозу і кросинговеру, зокрема, був одержаний під час досліджень еукаріотичних мутантних організмів, які порушують нормальний перебіг мейозу, так званих мейотичних мутантів [6].

Вияв мутацій, що впливають на частоту і розподіл кросоверних обмінів у культурних рослин (кукурудза, жито, томати, рис, просо, у яких

створені колекції мейотичних мутантів), має, крім теоретичного, важливе практичне значення. Знання генетичного контролю рекомбінації надасть людині можливість керувати формоутворюючим процесом [1].

Через переважно високу стерильність мейотичних мутацій у гомозиготному стані важливого значення набуває вияв рекомбінаційних ефектів мейотичних мутацій у гетерозиготному стані, що дозволило би безпосередньо використовувати їх у селекційному процесі.

У роботі наведені результати оцінки впливу мейотичних мутацій томату у гетерозиготному стані на частоту кросинговеру в маркованих зонах геному, а також на відмінності мікро- і мегаспорогенезу за частотою гомологічної рекомбінації.

### Матеріали і методи

Частоту рекомбінації вивчали у чотирьох мейотичних мутантів томату. Мутант *as<sub>1</sub>* був відібраний у польових посівах томату сорту *San Marzano* [7], два — *dsm<sub>1</sub>* і *sti* — виникли спонтанно у польових посівах томату сорту *Глорія* [8, 9], мутант *dsm<sub>2</sub>* був відібраний у потомстві рослин-регенерантів сорту *Вікторина*.

Дослідження впливу мей-генів на частоту рекомбінації проводили з використанням ліній, які містили маркерні гени у 2-й (*wv*, *aw*, *d*), 4-й (*e*, *ful*), 6-й (*m-2*, *c*) і 11-й (*hl*, *a*) хромосомі. Застосовані маркерні гени мають чіткий фенотиповий вияв і легко ідентифікуються на стадії сіянців. Мутації зміненої форми листкової пластинки: *e* (4-а хромосома, 66 сМ) — листки з майже цілокраїми малочисельними сегментами, центральна жилка листа викривлена; *c* (6-а хромосома, 104 сМ) — перший справжній листок звичайно цільний, а наступні менш розчленовані; мутація *hl* (11-а хромосома, 48 сМ) — відсутність волосків на всіх частинах рослин; *d* (2-а хромосома, 70 сМ) — карликові рослини; мутації, які зумовлюють відсутність антоціану в усіх частинах рослини: *a* (11-а хромосома, 68 сМ) і *aw* (2-а хромосома, 59 сМ); хлорофільні мутації *m-2* (6-а

хромосома, 77 сМ) — дуже дрібні хлоротичні плями на листках; *ful* (4-а хромосома, 24 сМ) — листя жовте у точці росту, більш старе листя світло-зелене; *wv* (2-а хромосома, 41 сМ) — сім'я долі і справжнє листя завжди хлоротичні у ранньому віці і зберігають білу плямистість пізніше [10]. Запропоновані мутації характеризуються рецесивним моногенним успадкуванням. Розсаду маркерних ліній, мейотичних мутантів і вихідних сортів томату вирощували в теплиці, на стадії 5–6-ти справжніх листків висаджували у відкритий ґрунт на агробіостанції СНУ ім. Лесі Українки. Схрещування проводили за стандартною методикою на 2–3-й кисті. Через високу чоловічу стерильність мейотичних мутантів їх використовували в якості материнської форми. У наступному році одержували потомство  $F_2$  та від тесткросів з багатомаркерними лініями. Висіювали насіння популяцій, які розщеплюються за маркерними генами, в теплиці за схемою  $2 \times 5$  см, сіянці ідентифікували за фенотиповим виявом на стадії 3–4 справжніх листків.

Для гетерозигот оцінювали величину *rf* на підставі даних розщеплення за маркерними генами в популяціях  $F_2$  і тесткросів, у яких рослини, гетерозиготні за мей-генами, були материнською формою. На основі оцінок величини *rf* у жіночому мейозі і сумарної у  $F_2$  розраховували величину *rf* у чоловічому мейозі за методом максимальної правдоподібності [11].

### Результати та обговорення

За цитологічним виявом три досліджені мутації —  $as_1$ ,  $dsm_1$ ,  $dsm_2$  є синаптичними із різним ступенем редукції частоти хіазм на мейоцит [7, 8]. Наші дані свідчать, що найбільшу редукцію за частотою хіазм виявляє мутант  $dsm_2$ , середню —  $dsm_1$  і найменшу —  $as_1$ .

Мутація *sti* характеризується очевидно нормальним початком мейозу, але вже на стадіях диплотени — діакінезу спостерігаються порушення конденсації хромосом, їх неспецифічні асоціації. В анафазі I виявляються чисельні переплетіння хроматину, фрагменти, злипання хромосом. Мейоз II у переважної більшості мейоцитів у мікроспорогенезі відсутній [9].

Часто в якості оцінки гомологічної рекомбінації використовують оцінку частоти хіазм або кількості рекомбінаційних вузликів на хромосому або мейоцит. Така оцінка, цілком коректна для організмів з нормальним мейозом, не виправдовує себе у мейотичних мутантів, значна кількість яких виявляє передчасне розпадання бівалентів у диплотені-діакінезі профазі першого поділу мейозу. Таким чином організми із нормальним або навіть переважаючим норму рівнем кросинговеру у пахітені профазі I мейозу будуть виявляти низьку частоту хіазм у диплотені-діакінезі. З іншого боку, реєстрація рекомбінаційних вузликів у пахітені може не відповідати кількості кросоверних обмінів у мейотичних мутантів з порушенням механізму розв'язання структури Холідея обмінним шляхом. Саме тому ми звернули увагу на оцінку частоти кросинговеру за результатами генетичного аналізу рекомбінантних класів рослин як завершального продукту рекомбінаційних подій.

Результати оцінки впливу мейотичних мутацій томату в гетерозиготному стані на гомологічну рекомбінацію в окремих зонах геному, одержані на підставі розщеплення маркерних генів в популяції  $F_2$ , не виявили істотної відмінності за частотою кросинговеру від вихідних сортів (табл. 1). Лише гетерозигота за мутацією  $as_1$  виявила істотне зниження частоти рекомбінації у одній із чотирьох досліджених зон геному (табл. 1).

Таблиця 1

Частота кросинговеру (*rf*) в маркованих зонах геному (за даними  $F_2$ ) у гетерозиготних за мейотичними мутаціями рослин томату

Генотип	<i>rf</i> , % в зонах				
	<i>e-ful</i>	<i>hl-a</i>	<i>aw-d</i>	<i>wv-aw</i>	<i>m2-c</i>
San Marzano	35,06±1,83	18,38±1,41	12,13±1,26	17,41±1,51	—
$As_1/as_1$	34,59±1,38	21,68±2,29	10,50±1,20	12,04±1,29*	—
Глорія	—	18,93±4,87	13,06±1,53	18,33±1,83	26,11±1,75
<i>Sti/sti</i>	—	18,18±1,50	15,35±1,38	—	26,28±1,83
$Dsm_1/dsm_1$	—	15,56±1,02	10,55±1,28	14,23±1,49	—
Вікторина	33,25±1,67	14,69±1,08	—	—	—
$Dsm_2/dsm_2$	36,73±1,81	16,60±1,19	—	—	—

Примітка: \* — відмінності від контролю істотні при  $P \leq 0,05$ .

## Частота кросинговеру в маркованих зонах геному в мікро- і мегаспорогенезі

Генотип	Кількість рослин		Зони геному			
			aw-d		m2-c	
	F <sub>2</sub>	BC	rf <sub>♂</sub>	rf <sub>♀</sub>	rf <sub>♂</sub>	rf <sub>♀</sub>
Глорія	441	377	18,58±2,93	12,73±1,16	29,76±4,04	26,79±1,55
Dsm <sub>1</sub> /dsm <sub>1</sub>	259	257	19,54±3,62	11,67±1,41	26,74±5,09	26,85±1,95
Sti/sti	273	268	9,56±3,82	17,54±1,63*	18,45±4,80	25,75±1,88

Примітка: \* — відмінності від контролю істотні при  $P \leq 0,05$ .

У наступному експерименті одночасно з F<sub>2</sub> були одержані популяції від аналізуючого схрещування, в якому рослини Dsm<sub>1</sub>/dsm<sub>1</sub>, Sti/sti і Глорія були материнською формою. Аналіз розщеплення за маркерними ознаками у BC дозволив оцінити частоту рекомбінації в мегаспорогенезі (rf<sub>♀</sub>), а величина rf в мікроспорогенезі була розрахована за програмою на підставі сумісного обліку даних F<sub>2</sub> і BC [11].

Величина rf у гетерозигот Dsm<sub>1</sub>/dsm<sub>1</sub> в чоловічому і жіночому мейозі не відрізняється від контролю — вихідного сорту Глорія (табл. 2). Мутація sti в гетерозиготному стані значно зменшує rf у мікроспорогенезі в обох вивчених зонах та істотно перевищує частоту рекомбінації в зоні aw-d у мегаспорогенезі (17,54±1,63% у Sti/sti в порівнянні з 12,73±1,10% у Глорії).

При цьому міняється співвідношення рівнів рекомбінації в мега- і мікроспорогенезі. Для контролю Глорія і генотипу Dsm<sub>1</sub>/dsm<sub>1</sub> спостерігалася тенденція перевищення частоти рекомбінації в чоловічому мейозі над жіночим (rf<sub>♂</sub>>rf<sub>♀</sub>), а для Sti/sti характерна зворотна тенденція (rf<sub>♂</sub><rf<sub>♀</sub>) (рис.). Отже, мутація sti різноспрямовано модифікує частоту рекомбінації в чоловічому та жіночому мейозі гетерозигот, що приводить до відсутності ефекту в F<sub>2</sub>. За цитологічним виявом досліджені мутації раніше були віднесені нами до повністю рецесивних. Проте одержані дані дозволяють зробити висновок про неповну рецесивність мутацій as<sub>1</sub> і sti за впливом на рекомбінаційні події.

Величина rf, розрахована на підставі даних F<sub>2</sub>, складається з величин rf в жіночому і чоловічому мейозі. З літературних даних відомо існування статевих відмінностей за частотою рекомбінації як у тварин, так і у рослин [12]. Раніше було показано зміну співвідношень рівнів рекомбінації в жіночому і чоловічому мейозі арабідопсиса за експериментальних впливів [13]. Отже, якщо зовнішні або внутрішні чинники різноспрямовано змінюють величину rf в мега-

мікроспорогенезі, величина rf в F<sub>2</sub> може залишатися на постійному рівні.

Мейотичні мутанти за цитологічним виявом є, як правило, рецесивними. Ймовірно, виходячи з того, що у гетерозигот за мей-генами спостерігається нормальний перебіг мейозу, їх майже не вивчали стосовно впливу на рекомбінацію, а у ряді робіт використовували гетерозиготи в якості контролю для порівняння із гомозиготними за мей-генами сибсами. Проте в нечисленних дослідженнях частоти кросинговеру у гетерозигот за мей-генами спостерігали окремі випадки неповного домінування — для генів as і el кукурудзи [14], генів as<sub>6</sub> і as<sub>4</sub> томату [7] і наддомінування для гена c (3) G *Drosophila melanogaster* [15]. Хінтон пояснює ефект наддомінування гена c (3) G тим, що слабкі порушення у гетерозиготі є рекомбіногенними, а в гомозиготі більш виражені порушення запобігають рекомбінації.

Сильні рекомбінаційно-дефектні мутанти *D. melanogaster* проявляють слабкий домігантний ефект на рекомбінацію. Карпенгер і Сандлер відзначили, що вивчені ними мутанти дрозофіли mei-9a, mei-9b і mei-218 є рецесивними відносно пригнічення кросинговеру і виявляють домігантний ефект на розподіл обмінів і коінциденцію [16]. Серед мутацій дрозофіли, які впливають на конденсацію гетерохроматину, виявлені мутації,

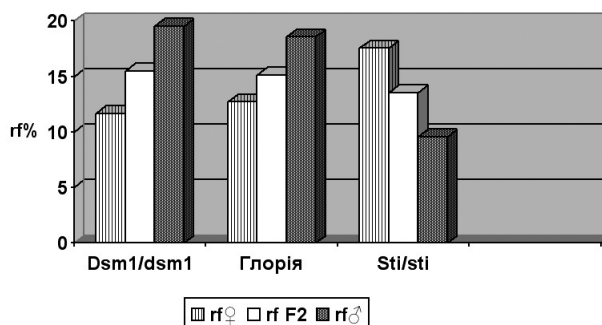


Рис. Вплив мейотичних мутацій у гетерозиготному стані на частоту рекомбінації у зоні aw-d у чоловічому і жіночому мейозі

які, перебуваючи в гетерозиготному стані, збільшують частоту кросинговеру в 3–4 рази і зменшують позитивну інтерференцію [17].

### Висновки

За цитологічним виявом чотири досліджені мейотичні мутації раніше були віднесені нами до повністю рецесивних. Проте одержані дані дозволяють зробити висновок про неповну рецесивність мутацій  $as_1$  і  $sti$  за впливом на рекомбінаційні події.

Досліджені мутації у гетерозиготному стані не впливали істотно на частоту кросинговеру у маркованих зонах геному за даними  $F_2$ , крім гетерозиготи  $As_1/as_1$ , яка виявила зниження  $rf$

у зоні  $wv-aw$ . Оцінка частоти кросинговеру окремо у жіночому і чоловічому мейозі показала, що у контролі — вихідному сорті Глорія і гетерозиготі  $Dsm_1/dsm_1$  частота кросинговеру вище у чоловічому мейозі (мікроспорогенезі), у гетерозиготі  $Sti/sti$  частота  $rf$  була істотно вище у жіночому мейозі. Отже, мей-мутації у гетерозиготному стані (на прикладі  $sti$ ) можуть різноспрямовано впливати на рекомбінацію в чоловічому і жіночому мейозі, змінюючи при цьому співвідношення рівнів  $rf_{\sigma}$  і  $rf_{\varphi}$  у порівнянні з нормою. Використання гетерозигот  $mei/+$ , змінюючих, подібно  $sti/+$ , рівень  $i$ /або розподіл кросоверних обмінів, може представляти інтерес в цілях розширення спектру генетичної мінливості в потомстві.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Жученко А. А., Король А. Б. Рекомбинация в эволюции и селекции. — М.: Наука, 1985. — 400 с.
2. Keeney S, Giroux CN, Kleckner N. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family // *Cell*. — 1997. — 88. — P. 375–384.
3. Pawlowski W. P., Cande W. Z. Coordinating the events of the meiotic prophase // *Trends in Cell Biology*. — 2005. — 15, № 12. — P. 674–681.
4. Korol A. B. Recombination // *Encyclopedia of Biodiversity*. Academic Press. — 2001. — 5. — P. 53–71.
5. Kleckner N. Meiosis: How could it work? // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1996. — 93. — P. 8167–8174.
6. Schwarzach T. Meiosis, recombination and chromosomes: a review of gene isolation and fluorescent in situ hybridization data in plants // *Journal of Experimental Botany*. — 2003. — 54, № 380. — P. 11–23.
7. Moens P. B. Genetic and cytological effects of three desynaptic genes in the tomato // *Canad. J. Genet. and Cytol.* — 1969. — II, № 4. — P. 857–859.
8. Лісовська Т. П., Войтюк В. П., Кузьмішина І. І. Цитологічний і генетичний аналіз мейотичної мутації томата  $dsm1$  // *Науковий вісник ВНУ ім. Лесі Українки*. — 2010. — № 12. — С. 105–111.
9. Лісовська Т. П., Кузьмішина І. І., Коцун Л. О., Войтюк В. П., Андрєєва В. В. Мейотична мутація томату що порушує конденсацію хроматину // *Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр.* — К.: Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова, 2014. — 14. — С. 125–129.
10. Жученко А. А. Генетика томатов. — Кишинев: Штиинца, 1973. — 663 с.
11. Король А. Б., Прейгель И. А., Прейгель С. И. Изменчивость кроссинговера у высших организмов: методы анализа и популяционно генетические модели. — Кишинев.: Штиинца, 1990. — 404 с.
12. Burt A., Bell G. Harvey P. H. Sex differences in recombination // *J. Evol. Biol.* — 1991. — 4. — P. 259–277.
13. Vizir I. Yu., Korol A. B. Sex difference in recombination frequency in Arabidopsis // *Heredity*. — 1990. — 65. — P. 694–717.
14. Nel P. M. Effect of the asynaptic factor on recombination in maize // *Genetics*. — 1975. — 79, № 3. — P. 435–450.
15. Hinton C. W. Enhancement of recombination associated with the  $c(3)G$  of *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. — 1966. — 53, № 1. — P. 157–164.
16. Carpenter A. T. C., Sandler L. On recombination-defective meiotic mutants in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. — 1974. — 76, № 3. — P. 453–475.
17. Westphal Th., Reuter G. Recombinogenic effects of suppressors of position-effect variegation in *Drosophila* // *Genetics*. — 2002. — 160 (2). — P. 609–621.

### LISOVSKA T. P.

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

### HOMOLOGOUS RECOMBINATION IN HETEROZYGOUS BY MEIOTIC MUTATIONS TOMATO PLANTS

**Aims.** Significant progress in understanding the genetic control of meiosis and crossing-over, in particular, was obtained through research eukaryotic mutant organisms that violate the normal course of meiosis, called meiotic mutants. The

article presents the results of estimating the frequency of crossing-over in four heterozygotes for meiotic mutations tomato. **Methods.** The influence of mei-genes on recombination frequency was performed using lines that contain marker genes in the 2nd (wv, aw, d), 4th (e, ful), 6th (m-2, c) and 11 (hl, a) chromosomes. Sex difference in rf was determined on the basis of splitting of marker signs in populations  $F_2$  and testcrosses of  $F_1$  as maternal form with multiple-marker tester. Expected value of rf the maximum likelihood method. **Results.** Mutations in the heterozygous state did not affect significantly the frequency of crossing-over in marked areas of the genome according to  $F_2$ , except heterozygotes  $As1/as1$ , which revealed rf reduction in area wv-aw. Assessment crossover frequency separately in female and male meiosis showed that in control — the initial variety Gloria and heterozygote  $Dsm1/dsm1$  crossover frequency is higher in male meiosis (microsporogenesis) in heterozygotes  $Sti/sti$  rf frequency was significantly higher in female meiosis. **Conclusions.** The meiotic mutation  $as1$  and  $sti$  is recessive completely by cytological manifestation, but not completely recessive to influence the homologous recombination.

*Keywords:* meiotic mutants, heterozygotes, crossing over, sex difference, tomato.