

## Резюме

Проаналізовано вихід спонтанних мутацій у п'яти поколіннях інбредного розведення самок із 12 природних популяцій *Drosophila melanogaster* України 2010 року збору. У ході досліджень було виділено різні мутації забарвлення очей, пігментації тіла, а також форми та орієнтації крил відносно передньозадньої осі тіла.

Проанализировано выход спонтанных мутаций в пяти поколениях инбредного разведения самок из 12 природных популяций *Drosophila melanogaster* Украины 2010 года сбора. В ходе исследования было выделено разнообразные мутации пигментации глаз, тела, а также формы и ориентации крыл относительно переднезадней оси тела.

We analyzed phenotypic deviations in five generations of laboratory cultured *Drosophila melanogaster* isofemale lines established in 2010 from 12 natural populations from Ukraine. Cultured progeny of the wild-caught flies were investigated for phenotypic deviations in eye coloration, body pigmentation, as well as the form and orientation of the wings relative to the body.

ЛІСОВСЬКА Т.П.<sup>1</sup>, ВОЙТЮК В.П.<sup>1</sup>, КУЗЬМІШИНА І.І.<sup>1</sup>, СТРАТУ Л.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Волинський національний університет імені Лесі Українки,

Україна, 43025, Луцьк, вул. Потапова, 9, e-mail: Tlisovska@ukr.net

<sup>2</sup> Інститут генетики, Молдова, Кишинев, вул. Лісова, 18

## РЕКОМБІНАЦІЙНІ І РЕПАРАЦІЙНІ ВЛАСТИВОСТІ ДВОХ МЕЙОТИЧНИХ МУТАНТІВ ТОМАТУ

Виділення і вивчення значного числа мейотичних мутантів дозволило сформувати уявлення про генетичний контроль окремих етапів мейозу [5]. Мейотичні мутації, що виявляються за порушенням нормального ходу мейозу і стерильності продуктів мейозу, часто контролюють основні процеси метаболізму ДНК, такі як рекомбінація і репарація [5, 7]. Так, мутації, що викликають порушення синапсису або розходження гомологічних хромосом в першому поділі мейозу, можуть впливати на частоту і розподіл кросоверних обмінів [5, 7-11].

Зв'язок рекомбінації і репарації виходить із спільності окремих ферментативних етапів цих процесів, показаних на *Escherichia coli* [9], деяких грибах [5] і дрозофілі [7]. На рослинах подібні дослідження не проводилися. Між тим, вивчення взаємодії процесів рекомбінації і репарації у вищих рослин важливе для розуміння контролю окремих етапів генетичної рекомбінації і можливого керування процесом вивільнення генетичної мінливості [3].

Наша робота присвячена вивченню впливу двох нових мейотичних мутантів томату на процеси генетичної рекомбінації і репарації.

### Матеріали і методи

Робота виконана на двох мейотичних мутантах томату, відібраних в польових посівах томату сорту Глорія. Мутант *dsm<sub>1</sub>* є синаптичним

із середнім ступенем десинапсису [4], мутант *sti* характеризується порушенням конденсації мейотичних хромосом. Обидві мутації виявили моногенний рецесивний характер успадкування і не алельні між собою.

Дослідження впливу мей-генів на частоту рекомбінації проводили з використанням ліній, які містили маркерні гени у 2-ій (*wv*, *aw*, *d*), 4-ій (*e*, *ful*), 6-ій (*m-2*, *c*) і 11-ій (*hl*, *a*) хромосомах.

Частоту кросинговеру (*rf*) розраховували за методом добутків. У зв'язку з майже повною чоловічою стерильністю досліджуваних мейотичних мутантів, у гомозигот за мей-генами оцінку величини *rf* проводили на підставі даних аналізуючого схрещування, в яких рослини, гомозиготні за мей-генами, були материнською формою. Для коректного порівняння у гетерозигот *Dsm<sub>1</sub> / dsm<sub>1</sub>* і *Sti / sti* та вихідного сорту Глорія також оцінювали величину *rf* у мегаспорогенезі (жіночому мейозі).

Вплив мейотичних мутацій на репарацію оцінювали за частотою спонтанних і індукованих Х-променями хромосомних аберацій (ХА) в кореневій меристемі. У зв'язку з неможливістю отримання насіння від самозапилення мутантних рослин, викликаного високою стерильністю рослин, гомозиготних за мей-генами, дослідження проводили на корінцях, що утворюються при вкоріненні живців рослин, попередньо ідентифікованих цитологічно. Коли корінці досягали довжини 0,5-1 см, живці поміщали на холод (+4°C) на 16-18 годин для зупинки клітинних поділів в G<sub>1</sub> – S періодах інтерфази [1]. Корінці опромінювали через 1-2 години після повернення в нормальні умови (+20°C). Джерелом Х-променів був рентгенівський апарат РЕІС-І. Фіксацію матеріалу проводили через 22-25 годин після холодової обробки. З урахуванням затримки мітозов, викликану холодовою обробкою і опромінюванням, час фіксації найімовірніше припадає на другі мітози. Підрахунок частоти ХА (враховували аберації обмінного типу) проводили на давлених препаратах, зафарбованих пропіонлакмоїдом по стандартній методиці. У випадках дуже малої або рівної нулю частоти хромосомних аберацій розраховували довірчі інтервали за спеціальними формулами [2].

### **Результати і обговорення**

#### *Вплив мей-мутацій на репарацію*

В якості первинної оцінки репараційних властивостей мейотичних мутантів використовували визначення частоти хромосомних аберацій. Враховували переважно мости і множинні мости з фрагментами в ана-телофазі кореневої меристеми в нормі і після рентгенівського опромінювання. Аналіз рівня спонтанних аберацій хромосом у рослин, гомозиготних за мутаціями *dsm<sub>1</sub>* і *sti*, а також у вихідного сорту Глорія (норма) показав, що мутант *sti* значно перевищує норму за частотою клітин з мостами і множинними мостами з фрагментами

(табл. 1). Загальна частота клітин з порушеннями становила для  $dsm_1$ ,  $sti$  і Глорії  $1,84 \pm 0,40$  %,  $7,37 \pm 0,91$  % і  $1,30 \pm 0,53$  %, відповідно.

Таблиця 1

Частота спонтанних і індукованих аберацій хромосом в мітозі у мейотичних мутантів  $dsm_1$  і  $sti$  томату

Генотип	Клітин всього	Частота порушень, %		
		всього	мости	множинні мости з фрагментами
Контроль (без опромінювання)				
$sti / sti$	819	$7,37 \pm 0,91^{++}$	$5,19 \pm 0,78^{++}$	$0,51 \pm 0,36^+$
$dsm_1 / dsm_1$	1145	$1,84 \pm 0,40$	$1,17 \pm 0,32$	$0,00 \leq \pi \leq 0,003$
Глорія	462	$1,30 \pm 0,53$	$0,87 \pm 0,43$	$0,00 \leq \pi \leq 0,006$
Опромінювання (Х-промені, 3 Гр)				
$sti / sti$	386	$10,4 \pm 0,55^{++}$	$6,55 \pm 1,25^{++}$	$0,69 \pm 0,42$
$dsm_1 / dsm_1$	258	$4,65 \pm 1,31^*$	$3,88 \pm 1,20^*$	$0,00 \leq \pi \leq 0,012$
Глорія	476	$3,57 \pm 0,85$	$2,52 \pm 0,72^*$	$0,17 \leq \pi \leq 0,25$
Опромінювання (Х-промені, 6 Гр)				
$sti / sti$	464	$16,79 \pm 1,73^{***}$	$11,37 \pm 1,47^{***}$	$1,79 \pm 0,62^+$
$dsm_1 / dsm_1$	782	$6,69 \pm 0,89^{**}$	$5,31 \pm 0,80^{**}$	$0,26 \leq \pi \leq 0,32$
Глорія	319	$8,46 \pm 1,56^{**}$	$6,27 \pm 1,36^{**}$	$0,28 \leq \pi \leq 0,34$

\*, \*\* – відмінності від спонтанного рівня аберацій істотні при  $P \leq 0,05$  і  $P \leq 0,01$ , відповідно <sup>+</sup>, <sup>++</sup> – відмінності від вихідного сорту Глорія істотні при  $P \leq 0,05$  і  $P \leq 0,01$ , відповідно

Дослідження чутливості мей-мутантів до Х – опромінювання проводили при двох дозах – 3 і 6 Гр. Опромінювання дозою 3 Гр викликало збільшення кількості порушень в клітинах меристеми, проте відмінності від спонтанного рівня аберацій в контролі були недостовірні. Істотне збільшення частки клітин із мостами викликала доза 6 Гр. Мутант  $dsm_1$  за рівнем індукованих порушень, так само, як і спонтанних, був близький до контролю, а мутант  $sti$  значно їх перевершував (див. табл. 1). Загальна частота аберацій хромосом складала при 6 Гр для контролю  $8,46 \pm 1,56$  %, для  $dsm_1 / dsm_1$   $6,69 \pm 0,89$  % і для  $sti / sti$   $16,79 \pm 1,73$  %.

#### Вплив мей-мутацій на гомологічну рекомбінацію

Результати оцінки частоти гомологічної рекомбінації (rf), одержані на підставі розщеплення за маркерними ознаками у потомстві від аналізуючого схрещування свідчать, що гомо- і гетерозиготні за синаптичною мутацією  $dsm_1$  генотипи не відрізнялись істотно від вихідного сорту (табл. 2).

Гетерозиготні за геном *sti* рослини виявили зростання *gf* у одній із двох досліджених зон геному – зоні *aw-d* (дистальна частина довгого плеча 2-ої ядерцеутворюючої хромосоми). Мутація *sti* у гомозиготному стані значно – у 1,5 і 2,5 рази – збільшує частоту кросинговеру в обох досліджених зонах (рис.).

Таблиця 2

Вплив мейотичних мутацій томату у гомо- і гетерозиготному стані на частоту рекомбінації у мегаспорогенезі (за даними аналізуючого схрещування)

Генотип	<i>gf</i> , % в зонах			
	<i>e – ful</i>	<i>hl – a</i>	<i>aw – d</i>	<i>m-2 – c</i>
Глорія	42,77 ± 4,98	8,08 ± 2,74	11,94 ± 1,27	27,17 ± 1,70
<i>Dsm<sub>1</sub> / dsm<sub>1</sub></i>	42,72 ± 2,96	12,90 ± 1,93	–	–
<i>dsm<sub>1</sub> / dsm<sub>1</sub></i>	–	11,38 ± 2,00	–	–
<i>Sti / sti</i>	–	–	17,38 ± 1,51*	29,46 ± 3,55
<i>sti / sti</i>	–	–	29,50 ± 2,93**	37,88 ± 3,00*

\*, \*\* – відмінності від контролю істотні при  $P \leq 0,05$  і  $P \leq 0,01$ , відповідно

Величина *gf* для зони *aw-d* дорівнює 29,50 ± 2,93 % у *sti/sti* і 11,94 ± 1,27 % у вихідного сорту Глорія (норма); для зони *m2-c* – 37,88 ± 3,00 % у *sti/sti* і 27,17 ± 1,70 % у контролі. У цьому експерименті моногенні співвідношення в розщепленні були близькі до 1:1 в потомстві від аналізуючого схрещування і не могли, отже, вплинути на оцінку величини *gf*.

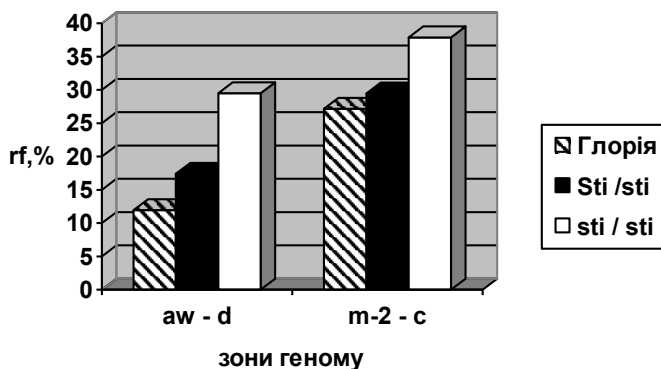


Рис. Частота кросинговеру в маркованих зонах геному у гомозиготі і гетерозиготі за мутацією *sti* та вихідного сорту Глорія

Наші дані свідчать, що мутація *dsm<sub>1</sub>* у гомо- і гетерозиготному стані виявляє частоту кросинговеру близьку до норми – вихідного сорту Глорія, що підтверджує десинаптичну природу даної мутації. За рівнем спонтан-

них і індукованих хромосомних аберацій мутантні рослини також не відрізнялися від вихідного сорту. Мейотична мутація *sti*, на відміну від синаптичного мутанта *dsm<sub>1</sub>*, істотно підвищує частоту кросинговеру у гетерозигот і, більш значно, у гомозигот за цим геном. Гомозиготи *sti/sti* виявляють істотно вищий від сорту Глорія рівень спонтанних та індукованих хромосомних аберацій в мітозі. Хоча за цитологічним виявом мутації *dsm<sub>1</sub>* і *sti* були віднесені нами до повністю рецесивних, одержані дані дозволяють зробити висновок про неповну рецесивність мутації *sti* за впливом на кросинговер.

Необхідно відмітити значну подібність за цитологічним виявом мейотичних мутацій томату *as<sub>4</sub>* і *sti*. За повідомленням Моенса, мутант *as<sub>4</sub>* підвищує частоту одинарних обмінів і, найбільш значно, в 7 разів, подвійних – в 2-ій хромосомі [3, 10]. За нашими даними, ці мутації є неалельними. З огляду на те, що у мутантних рослин *sti / sti* цитологічно виявляється множинна фрагментація і негомологічні асоціації хромосом, ми передбачаємо, що зростання величини кросинговеру у цих мутантів може бути пов'язано з дефектами репарації.

У подібного до *sti* мейотичного мутанта кукурудзи *st* також були виявлені порушення в мітозі, хоча і менш значні ніж в мейозі [6].

Різноманітні ефекти мейотичних мутацій свідчать, що мейотичний кросинговер, мітотична рекомбінація, система репарації і багато інших фундаментальних клітинних процесів здійснюються за допомогою однакових ферментативних систем.

Автори висловлюють вдячність проф. Королю А.Б., під керівництвом якого були розпочаті ці дослідження.

### **Висновки**

Мейотична мутація *sti* з порушенням конденсації хроматину, на відміну від синаптичної мутації *dsm<sub>1</sub>*, істотно підвищує частоту кросинговеру у гетерозигот і, більш значно, у гомозигот за цим геном. Гомозиготи *sti/sti* виявляють істотно вищий від контролю рівень спонтанних та індукованих хромосомних аберацій в мітозі.

### **Література**

1. Бендорайтме Д.И. Влияние  $\gamma$ -излучения и этиленмина на митотический цикл и структурные мутации хромосом ячменя. Автореф. дис. канд. биол. наук. М. – 1979. – 19 с.
2. Закс Л. Статистическое оценивание. – М.: Статистика, 1976. – 598 с.
3. Жученко А.А., Король А.Б. Рекомбинация в эволюции и селекции. – М.: Наука, 1985. – 400 с.
4. Лісовська Т. П., Войтюк В. П., Кузьмішина І. І. Цитологічний і генетичний аналіз мейотичної мутації томату *dsm<sub>1</sub>* // Науковий вісник ВНУ ім. Лесі Українки. Біологічні науки. – 2010. – № 12. – С. 105 – 111.
5. 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.

6. *Beadle G.W.* A gene for sticky chromosomes in *Zea mays* // *Z. Indukt. Abstamm. Vererbungsl.*– 1932. – Vol. 63. – P. 195–217.

7. *Carpenter A. T. C.* Meiotic roles of crossing-over and of gene conversion // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* – 1984. – P. 4–9.

8. *Cornu A., Farcy E., Mousset C.* A genetic basis for variation in meiotic recombination in *Petunia hybrida* // *Genome.* – 1989. – Vol. 32.– P. 46-53.

9. *Kuzminov A.* Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage  $\lambda$  // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1999. – Vol. 63, № 4. – P. 751-813.

10. *Moens P. B.* Genetic and cytological effects of three desynaptic genes in the tomato // *Canad. J. Genet. and Cytol.*, 1969. – Vol. 11, № 4.– P. 857-859.

11. *Rattray B., Rose A.* Increased intragenic recombination and non-disjunction in the Rec-1 strain of *Caenorhabditis elegans* // *Genet. Res.* – 1988, Vol. 51.– P. 89-95.

### **Резюме**

Мейотическая мутация *sti*, характеризующаяся нарушением конденсации хроматина, в отличие от синаптической мутации *dsm<sub>1</sub>*, достоверно увеличивает частоту кроссинговера в маркированных зонах генома, а также уровень спонтанных и индуцированных хромосомных aberrаций в митозе.

Мейотична мутація *sti*, яка характеризується порушенням конденсації хроматину, на відміну від синаптичної мутації *dsm<sub>1</sub>*, істотно підвищує частоту кроссинговеру в маркованих зонах геному, а також рівень спонтанних та індукованих хромосомних aberrаций в мітозі.

Meiotic mutation *sti*, characterized by impaired chromatin condensation, in contrast to the synaptic mutation *dsm<sub>1</sub>*, significantly increases the frequency of crossing-over in the labeling of areas of the genome, as well as the level of spontaneous and induced chromosome aberrations in mitosis.

### **МАЛЕЦКИЙ С.И.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН, пр. Акад.Лаврентьева, 10, г. Новосибирск, 630090, Россия, e-mail: stas@bionet.nsc.ru*

## **ГЕОМЕТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАСЛЕДСТВЕННОСТИ У РАСТЕНИЙ**

Наследственность – свойство организмов обеспечивать материальную и функциональную преемственность между поколениями; воспроизводство потомками признаков родителей, реализуемых через системы морфогенетических и физиологических процессов. Морфогенез у растений – это становление формы, образование структур в процессе развития. «Процессы морфогенеза упорядочены, строго закономерны и при том тенденциозны» [7]. Общепринятой теории морфогенеза пока не существует. «Морфогенез – это разворачивающейся в пространстве-времени континуальный процесс. Даже если принять, что каждый шаг морфогенеза связан с активацией или репрессией определенных генов, то пространственно временное расписание активации/репрессии генов должно определяться не ими сами-