

УДК 573.354:635.64

Т. П. Лісовська – кандидат біологічних наук, доцент кафедри ботаніки і садово-паркового господарства Волинського національного університету імені Лесі Українки;
В. П. Войтюк – кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри ботаніки і садово-паркового господарства Волинського національного університету імені Лесі Українки;
І. І. Кузьмишина – кандидат біологічних наук, доцент кафедри ботаніки і садово-паркового господарства Волинського національного університету імені Лесі Українки

Цитологічний і генетичний аналіз мейотичної мутації томата *dsm₁*

Роботу виконано на кафедрі ботаніки і садово-паркового господарства ВНУ ім. Лесі Українки

Наведено результати цитологічного та генетичного аналізу мейотичної мутації томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *dsm₁* – спонтанної мутації, виділеної за стерильністю в польових посівах томата сорту Глорія. Дослідження встановили рецесивний моногенний характер успадкування досліджуваної мутації, а проведений цитологічний аналіз дає підставу віднести її до синаптичних із середнім ступенем десинапсису.

Ключові слова: мейоз, мейотичні мутанти, синапсис, кросингвер, генетичний аналіз, томат.

Лисовская Т. П., Войтюк В. П., Кузьмишина И. И. Цитологический и генетический анализ мейотической мутации томата *dsm₁*. Приведены результаты цитологического и генетического анализа мейотической мутации томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *dsm₁* – спонтанной мутации, выделенной по стерильности в полевых посевах томата сорта Глория. Исследования установили рецессивный моногенный характер наследования данной мутации, а проведенный цитологический анализ дает основание отнести ее к синаптическим со средней степенью десинапсиса.

Ключевые слова: мейоз, мейотические мутанты, синапсис, кроссингвер, генетический анализ, томат.

Lisovska T. P., Voytiuk V. P., Kuzmishyna I. I. Cytological and Genetic Analysis of Meiotic Mutation Tomato *dsm₁*. The results of cytological and genetic analysis of meiotic mutation tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *dsm₁* was presented. The *dsm₁* is spontaneous mutation, selected for sterility in field tomato crops varieties Gloria. Research have established the recessive nature of inheritance of this monogenic mutation and performed cytological analysis suggests that it be moderate desynaptic.

Key words: meiosis, meiotic mutants, desynapsis, crossing-over, genetic analysis, tomato.

Постановка наукової проблеми та її значення. Мейоз – складний тип поділу статевих клітин, внаслідок якого кількість хромосом у дочірніх клітинах зменшується вдвічі. Завдяки мейозу підтримується сталість хромосомного набору в нащадків під час статевого розмноження, а також відбуваються такі важливі генетичні процеси, як репарація і рекомбінація спадкового матеріалу [1; 2; 9]. Найбільш тривалою і складною за процесами, які відбуваються під час мейозу, є профаза першого (редукційного) поділу, під час якої відбувається кон'югація гомологічних хромосом. Попарне сполучення гомологічних хромосом та/або кросингвер між несестринськими хроматидами і збереження хізм до анафази I є необхідною передумовою для точного розподілу гомологічних хромосом між полюсами клітини [14].

Процеси взаємодії гомологічних хромосом у мейозі складні й контролюються значною кількістю генів [2; 9]. Успіх у дослідженні генетичного контролю елементарних подій, які забезпечують синапсис хромосом, репарацію і рекомбінацію генетичного матеріалу, регулярне розходження гомологів в анафазі I, пов'язаний із вивченням мейотичних мутантів, які порушують нормальний перебіг мейозу. Переважна більшість досліджених на сьогодні мейотичних мутантів рослин представлені синаптичними мутантами, які впливають на розпізнавання і синапсис гомологічних хромосом, формування синаптонемного комплексу, кросингвер та підтримання хізм [10; 11]. Це свідчить про важливість процесів, що відбуваються під час профазы I мейозу, і велику кількість генів, які задіяні в їх генетичному контролі. Дослідження якомога більшої кількості мейотичних мутацій різних організмів дасть змогу з'ясувати процеси, які забезпечують регулярний перебіг мейозу, їхню універсальність та специфічність. У лабораторії генетики і селекції біологічного факультету ВНУ ім. Лесі

Українки зібрана унікальна колекція мейотичних мутантів томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.), до складу якої входить досліджувана мутація [5]. У нашому дослідженні наведено результати цитологічного, рекомбінаційного та генетичного аналізу мейотичної мутації томата *dsm₁*.

Матеріали й методи. Матеріалом дослідження була мейотична мутація *dsm₁* – спонтанна мутація, виділена за стерильністю в польових посівах томата сорту Глорія [12]. Рослини морфологічно не відрізнялися від інших рослин цього сорту. Квіти були звичайної будови, відбувалося нормальне цвітіння, але плоди не зав'язувалися. Через повну чоловічу стерильність мутація підтримується у вигляді популяції ВС від схрещування гомозиготних за мей-геном рослин як материнської форми із фертильними гетерозиготами як батьківської форми.

У тест на алелізм були включені мутації, які входять до складу колекції мейотичних мутантів томата: *as₅*, *as_b*, *amd* і *sti*. Мутації *as₅* і *as_b* – спонтанні мутації, виділені за стерильністю в польових посівах томата сорту San Marzano і Bountry, відповідно [13], *amd* – мутація додаткового поділу мейозу, виділена у *M₂* сорту Факел, отриманого з насіння, опроміненого γ -променями в дозі 300 гр [5]. Мутація *sti*, у якій виявлено порушення конденсації хроматину, виникла спонтанно у польових посівах томата сорту Глорія [12].

Мейотичні бутони фіксували в суміші етанол і крижана оцтова кислота у співвідношенні 3:1, зберігали їх у 70 % етанолі, фарбували ацетокарміном згідно із загальноприйнятою методикою [6]. Для цитологічних досліджень готували давлені препарати пиляків на різних стадіях мейозу. Фертильність пилку визначали ацетокарміновим методом. Фотографії мейоцитів зроблені з використанням світлового мікроскопа Ахіоскор-40 при збільшенні $\times 1000$, пилкових зерен – при збільшенні $\times 400$.

Частоту рекомбінації в маркованих зонах геному визначали з використанням ліній, які містили маркерні гени у 4-й (*e*, *ful*) і 11-й (*hl*, *a*) хромосомі. Застосовані маркерні гени мають чіткий фенотиповий вияв і легко ідентифікуються на стадії сіянців [4]. Частоту кросинговеру (*rf*) розраховували за методом добутків. У зв'язку з майже повною чоловічою стерильністю досліджуваного мейотичного мутанта *dsm₁ / dsm₁* в усіх генотипів оцінку величини *rf* проводили на підставі даних ВС, в яких досліджувані рослини були материнською формою.

Статистичну обробку даних здійснювали за методом χ^2 і *t*-критерієм Стьюдента [3].

Виклад основного матеріалу й обґрунтування отриманих результатів дослідження. Цитологічний вияв мутації. У рослин, гомозиготних за мутацією *dsm₁*, початок профазі I мейозу, а саме таких її стадій, як пахітена, лептотена, зиготена і диплотена проходить без видимих відхилень. Так, у зиготені можна побачити специфічне скупчення хромосом у ядрах мейоцитів у вигляді синаптичних вузлів або букетів хромосом. У пахітені спостерігаються потовщені кон'юговані гомологічні хромосоми. В діакінезі в томата ($2n = 24$) в нормі формується 12 бівалентів, які підтримуються до стадії анафази I (рис. 1а).

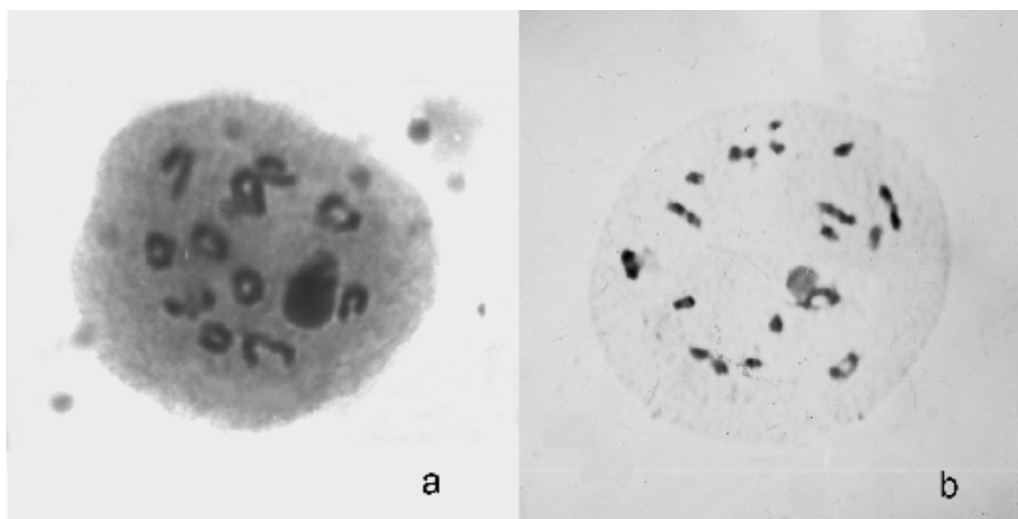


Рис. 1. *a* – діакінез у томата сорту Глорія: шість бівалентів з 2-ма хіазмами, шість із однією; *b* – діакінез у десинаптичного мутанта томата *dsm₁*: два біваленти з 2-ма хіазмами, шість із однією і вісім унівалентів

Починаючи з діакінезу, в мейоцитах мутантних рослин спостерігається порушення мейозу, а саме передчасне розпадання бівалентів (рис. 1b). Середня частота бівалентів у синаптичного мутанта томата *dsm₁* дорівнює $8,13 \pm 0,13$ із мінливістю в межах від 6 до 10 бівалентів на клітину (рис. 2). Середня частота хіазм становила $8,27 \pm 0,36$, а частота унівалентів – $7,87 \pm 0,57$ на мейоцит.

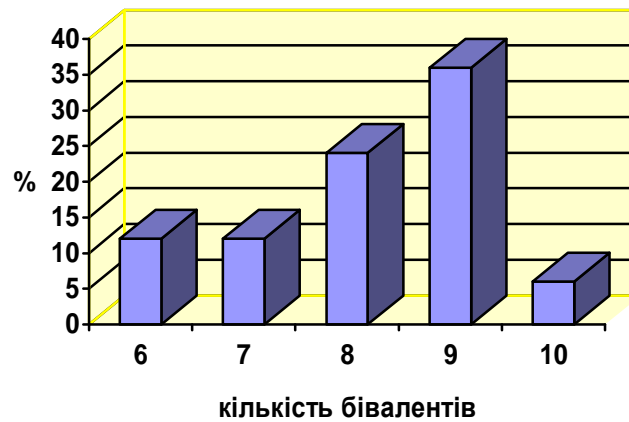


Рис. 2. Розподіл мейоцитів у діакінезі за кількістю бівалентів у мейотичного мутанта *dsm₁*

У прометафазі I біваленти починають рухатися до центру клітини, утворюючи екваторіальну пластинку, а гомологічні хромосоми орієнтуються центромерами до полюсів. У нормі хіазми зберігаються до анафази I, що забезпечує регулярне розходження гомологічних хромосом до полюсів. Проте у мутантної лінії *dsm₁*, як наслідок передчасного розпадання бівалентів в діакінезі, в метафазі I спостерігаються численні порушення у вигляді забігання унівалентних хромосом. На стадії анафази I хромосоми нерегулярно розходяться до полюсів, спостерігається відставання унівалентів, які не потрапляють до полюсів і, зрештою, можуть сформувати мікроядра. За кількістю відсталих хромосом спостерігалось значне варіювання між мейоцитами – від 1–2 до 7–8 відсталих хромосом на мейоцит.

Частка клітин із порушеннями на цих стадіях мейозу в мутанта *dsm₁* значно більша, ніж у фертильної гетерозиготи (табл. 1).

У другому поділі мейозу лише у частини клітин мейоз проходив нормально. Більшість порушень у мейозі II є наслідком порушень у мейозі I. Так, під час метафази II спостерігали множинні відставання хромосом, в анафазі II хромосоми нерегулярно розходилися до полюсів. Тоді як переважна частина хромосом була біля полюсів, значна їх кількість залишалася в районі екваторіальної площини. Деякі уніваленти, які відстали ще під час анафази I, знаходилися в анафазі II поза межами веретен поділу. Після закінчення мейозу на стадії спорад у десинаптичного мутанта *dsm₁* замість рівних за розміром тетрад мікроспор утворюються діади та нерівні тетради з мікроядрами.

Таблиця 1

Частота порушень мейозу у гомо- і гетерозигот за мутацією *dsm₁*

Стадія мейозу	<i>Dsm₁ / dsm₁</i>			<i>dsm₁ / dsm₁</i>		
	Клітин всього	З порушеннями	Відсоток	Клітин всього	З порушеннями	Відсоток
Метафаза I	821	13	$1,58 \pm 0,44$	219	143	$65,3 \pm 3,22^*$
Анафаза I	957	24	$2,51 \pm 0,50$	250	186	$74,4 \pm 2,76^*$
Метафаза II	733	15	$2,04 \pm 0,52$	227	137	$60,3 \pm 3,25^*$
Анафаза II	571	11	$1,93 \pm 0,57$	220	131	$59,5 \pm 3,31^*$
Споради	544	17	$3,13 \pm 0,73$	320	174	$54,3 \pm 2,78^*$

* Відмінність від контролю (гетерозиготи *Dsm₁ / dsm₁*) істотна при $p \leq 0,05$

Внаслідок нерегулярного розходження сестринських хроматид в анафазі II, в мікроспори потрапляє кількість хромосом, відмінна від гаплоїдного набору і формується стерильний пилок (рис. 3b).

Наші дані свідчать про те, що у досліджуваного мутанта спостерігаються численні порушення на всіх стадіях мейозу, починаючи з діакінезу. Аналіз виявив істотну відмінність мутанта dsm_1 від фертильної гетерозиготи за частотою порушень на усіх досліджених стадіях (див. табл. 1), проте найвищу частоту порушень у мутантній лінії dsm_1 було виявлено на стадії анафази I (74,4 %). Після закінчення мейозу на стадії спорад відсоток клітин із порушеннями дещо зменшився – до 54,3 %. Це можна пояснити тим, що клітини, в яких відбувалися значні порушення мейозу, не переходили на наступний етап, а гинули. Відповідно, клітини із меншими відхиленнями проходили усі стадії цього процесу.

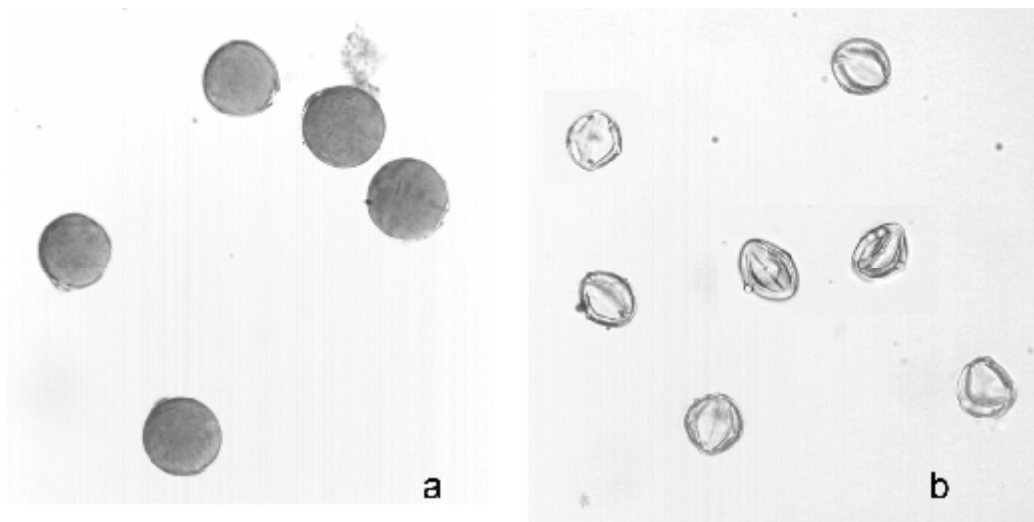


Рис. 3. *a* – фертильний пилок у томата сорту Глорія; *b* – стерильний пилок у десинаптичного мутанта томата dsm_1

В останнє десятиріччя за допомогою методів дослідження спредованих синаптонемних комплексів (СК) була відкрита група десинаптичних мутацій із гетерологічним синапсисом [7; 8]. Світлова мікроскопія не дає можливості детально проаналізувати у томата стадії профазы мейозу, на яких формується СК, однак ми не спостерігали мультивалентних асоціацій на стадіях діакінезу й метафази I, що дає змогу зробити попередній висновок про гомологічний синапсис хромосом у мейотичного мутанта dsm_1 .

За результатами цитологічного аналізу ми віднесли досліджувану мутацію до синаптичних із середнім ступенем десинапсису.

Фертильність продуктів чоловічого та жіночого мейозу. Для оцінки впливу досліджуваних мейотичних мутацій на чоловічий і жіночий мейоз ми провели аналіз життєздатності продуктів чоловічого мейозу за фертильністю пилку, а продуктів жіночого мейозу – за зав'язуванням насінин на плід. Наші дані свідчать про те, що в мутанта dsm_1 порушення мейозу призводять до високої стерильності пилку. Таким чином, фертильність пилку гомозиготних рослин dsm_1 значно нижча (5,7 %), ніж у гетерозиготних (97,7 %) (табл. 2).

Визначення середньої кількості зав'язування насінин на плід показало, що десинаптична мутація dsm_1 має вияв також і в жіночому мейозі, що відбивається у дуже низькій для томата середній кількості насінин, які зав'язуються у плодах гомозиготних рослин під час штучного запилення фертильним пилком. Відмінність від гетерозиготних форм за середньою кількістю насінин на плід, як і за фертильністю пилку, істотна (табл. 2).

Таблиця 2

Порівняння фертильності продуктів чоловічого й жіночого мейозу

Мутанти	Фертильність пилку, %	t-критерій Стьюдента	Кількість насінин на плід	t-критерій Стьюдента
Dsm_1 / dsm_1	$97,70 \pm 0,80$	68,14	$115,00 \pm 14,20$	7,53
dsm_1 / dsm_1	$5,70 \pm 1,09^*$		$6,83 \pm 2,15^*$	

* Відмінність від контролю (гетерозиготи Dsm_1 / dsm_1) істотна при $p \leq 0,05$

Генетичний аналіз. Для встановлення характеру успадкування досліджуваної мутації ми отримали гібриди F_1 між мутантними рослинами і вихідним сортом Глорія. Гетерозиготні за мутацією рослини виявилися фертильними, що свідчить про рецесивний характер успадкування. Генетичний аналіз розщеплення потомства F_2 на фертильні та стерильні рослини виявив моногенний характер успадкування ($\chi^2_{3;1} = 0,83$; $p < 0,01$).

Алельні взаємовідносини досліджуваних мутацій. Ми встановили алельні взаємовідносини між мутацією dsm_1 та деякими іншими мутаціями, які входять до складу колекції мей-мутантів томата, за допомогою функціонального тесту на алелізм. Якщо досліджувані мутації є мутаціями одного гена, то, схрещуючи стерильні гомозиготні рослини із фертильними гетерозиготами за іншим геном: ♀ $mei^- / mei^- \times \text{♂ } mei^- / mei^+$, одержимо в наступному поколінні розщеплення на фертильні й стерильні рослини у співвідношенні 1 : 1. Якщо ж це мутації різних генів, то в результаті схрещування утвориться фертильна дигетерозигота за обома генами.

При схрещуванні гетерозиготних за геном as_b рослин із гомозиготами dsm_1/dsm_1 серед 34 нащадків ми одержали розщеплення на 22 фертильні рослини і 12 стерильних, що відповідає теоретично очікуваному розщепленню 1 : 1 ($\chi^2 = 3,41$, d.f. = 1). Це дає підставу стверджувати, що мутації as_b і dsm_1 є алельними, хоча в них і різний генетичний фон (табл. 3).

Таблиця 3

Результати цис-транс тесту на алелізм

№ з/п	Комбінації схрещування	Фертильні форми	Стерильні форми	χ^2
1	$as_b/+ \times dsm_1/dsm_1$	22	12	3,41
2	$dsm_1/+ \times as_5/as_5$	59	0	
3	$amd/+ \times dsm_1/dsm_1$	36	0	
4	$sti/+ \times dsm_1/dsm_1$	58	0	
5	$dsm_2/+ \times dsm_1/dsm_1$	48	0	

Під час схрещування решти мутантів (табл. 3) ми одержали лише фертильні рослини, що відкидає гіпотезу про їхній алелізм. Тиким чином, тест на алелізм показав, що мутація dsm_1 не алельна мутаціям amd , as_5 , dsm_2 , sti і алельна мутації as_b .

Рекомбінаційний аналіз. Мутації, які впливають на синапсис гомологічних хромосом, було запропоновано поділяти на асинаптичні, у яких спостерігається повна або часткова відсутність кон'югації в профазі I мейозу, й десинаптичні - ті, в присутності яких синапсис гомологів у ранній профазі (пахітені) відбувається, а цитологічні порушення спостерігаються з диплотени - діакінезу і пов'язані з передчасним розпаданням бівалентів [10]. Цитологічний аналіз не дає можливості однозначно встановити причину порушень, які спостерігаємо, тому було запропоновано називати їх синаптичними до уточнення біохімічного продукту, дефектного у досліджуваних мутантів [11]. Слід відзначити, що в процесі точного синапсису і кон'югації гомологів задіяна, за попередніми дослідженнями, велика кількість генів, які впливають на рух теломер хромосом у зиготені, розпізнавання і синапсис гомологів, формування синаптонемного комплексу, кросинговер і підтримання хіазм, які утворилися внаслідок кросинговеру, до анафази I [14].

Для уточнення стадії профазі I мейозу, з якої починає діяти мутантний ген dsm_1 , ми визначили частоту кросинговеру у двох маркованих зонах геному.

Одержані результати свідчать, що гетерозиготні й гомозиготні за мутацією dsm_1 рослини не відрізняються істотно від вихідного сорту Глорія за частотою кросинговеру в маркованих зонах геному томата $e-ful$ і $hl-a$ (рис. 4). Той факт, що гомозиготи dsm_1/dsm_1 не відрізняються істотно від вихідного сорту Глорія і фертильних гетерозигот за частотою кросинговеру у жіночому мейозі (рис. 4) підтверджує дійсно десинаптичний характер мутації dsm_1 .

Таким чином, якщо частота кросинговеру в досліджуваного мутанта не відхиляється від норми, передчасне розходження бівалентів викликано порушенням механізмів, які відповідають за збереження хіазм до анафази I. Останні дослідження довели важливу роль у підтриманні хіазм когезинів - білків, які забезпечують зчеплення сестринських хроматид протягом першого поділу мейозу [1]. Можливо, саме один із цих білків є дефектним у мутанта dsm_1 .

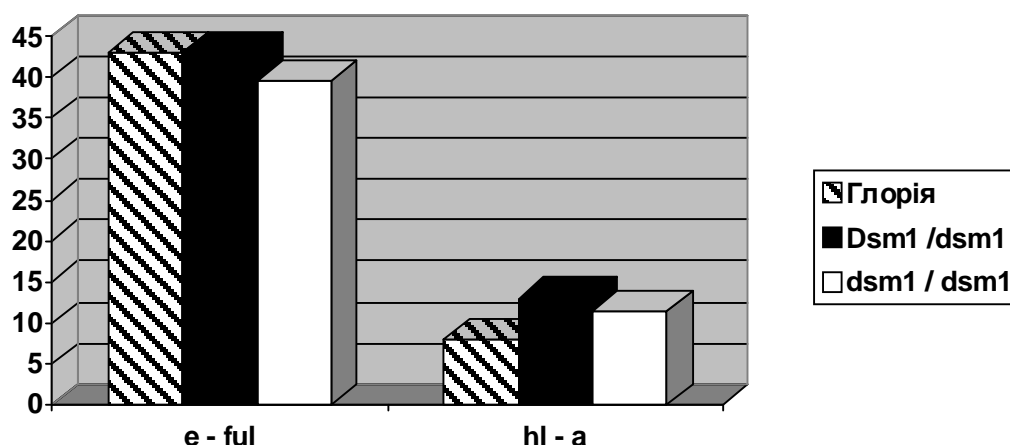


Рис. 4. Вплив мутації dsm_1 томата в гетеро- і гомозиготному стані на частоту рекомбінації у жіночому мейозі (за даними ВС)

Висновки і перспективи подальших досліджень. Мейотична мутація dsm_1 виявила моногенний рецесивний характер успадкування. Вона викликає стерильність продуктів чоловічого й жіночого мейозу. Цитологічний аналіз виявив порушення мейозу, починаючи зі стадії діакінезу, а саме передчасне розпадання бівалентів на уніваленти. Рекомбінаційний аналіз мейотичного мутанта томата dsm_1 дає підставу віднести його до синаптичних із середнім ступенем десинапсису.

Література

1. Богданов Ю. Ф. Белковые механизмы мейоза / Ю. Ф. Богданов // Онтогенез. – 2004. – Т. 35, № 6. – С. 415–125.
2. Голубовская И. Н. Генетический контроль поведения хромосом в мейозе / И. Н. Голубовская // Цитология и генетика мейоза. – М. : Наука, 1975. – С. 312–343.
3. Лакин Г. Р. Биометрия / Лакин Г. Р. – М. : Высш. шк., 1990. – 352 с.
4. Лісовська Т. П. Генетична колекція мутантних ліній томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.) як модельний об'єкт для лабораторного курсу з генетики / Т. П. Лісовська, В. П. Войтюк // Наук. вісн. ВДУ ім. Лесі Українки. – 2006. – № 5. – С. 109–112.
5. Лисовская Т. П. Мейотические мутации томата. Синтетическая теория эволюции : состояние, проблемы, перспективы / Т. П. Лисовская, В. П. Войтюк, И. И. Кузьмишина, Л. А. Коцун // Происхождение видов путем естественного отбора или сохранение благоприятствуемых пород в борьбе за жизнь : Междунар. науч. конф., посвященная 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина и 150-летию выхода книги. – Луганск, 2009. – С. 107–108.
6. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений / Паушева З. П. – М. : Колос, 1974. – 287 с.
7. Соснихина С. П. Проявление мутации su_2 , вызывающей негомологичный синapsис в мейозе у диплоидной ржи *Secale cereale* L. / [С. П. Соснихина, Г. А. Кирилова, О. А. Тихолиз и др.] // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 2. – С. 213–226.
8. Соснихина С. П. Проявление и наследование десинаптической формы ржи с нарушением гомологичности синapsиса / [С. П. Соснихина, Е. И. Михайлова, О. А. Тихолиз и др.] // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 10. – С. 1424–1433.
9. Baker B. S. The genetic control of meiosis/ [B. S. Baker, A. T. C. Carpenter, M. S. Esposito et al.] // Annu. Rev. Genet., 1976. – Vol. 10. – P. 53–134.
10. Gottschalk W. Asynapsis and desynapsis in flowering plants. II. Desynapsis / W. Gottschalk, M. L. H. Kaul // Nucleus. – 1980. – Vol. 23 (1, 2). – P. 97–120.
11. Kaul M. L. H. Mutant genes affecting higher plant meiosis / M. L. H. Kaul, T. G. K. Murthy // Theor. Appl. Genet. – 1985. – Vol. 70. – P. 449–466.
12. Lisovska T. P. Two new tomatoes meiotic mutants appeared spontaneously / T. P. Lisovska, M. I. Grati, Iu. I. Nyutin // Probleme actuale ale genetiicii, biotehnologiei si ameliorarii : Conf. I Nationale. – Chisineu, 1994. – P. 37–38.
13. Moens P. B. Genetic and cytological effects of three desynaptic genes in the tomato / P. B. Moens // Canad. J. Genet. and Cytol., 1969. – Vol. 11, № 4. – P. 857–859.
14. Pawlowski W.P. Coordinating the events of the meiotic prophase / W. P. Pawlowski, W. Z. Cande // Trends in Cell Biology. – 2005. – Vol. 15, № 12. – P. 674–681.

Статтю подано до редколегії
14.05.2010 р.