

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.¹, ВОЙТЮК В.П.¹, КУЗЬМІШИНА І.І.¹, СТРАТУ Л.С.²

¹Волинський національний університет імені Лесі Українки,

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

² 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 *dsm₁* 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 *Dsm₁ / dsm₁* 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 $G_1 - S$ 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 *dsm₁* 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 *dsm₁*, *sti* і Глорії 1,84±0,40 %, 7,37±0,91 % і 1,30±0,53 %, відповідно.

Таблиця 1

Частота спонтанних і індукованих аберацій хромосом в мітозі у мейотичних мутантів *dsm₁* і *sti* томату

Генотип	Клітин всього	Частота порушень, %		
		всього	мости	множинні мости з фрагментами
Контроль (без опромінювання)				
<i>sti</i> / <i>sti</i>	819	7,37±0,91 ⁺⁺	5,19±0,78 ⁺⁺	0,51±0,36 ⁺
<i>dsm₁</i> / <i>dsm₁</i>	1145	1,84±0,40	1,17±0,32	0,00≤π≤0,003
Глорія	462	1,30±0,53	0,87±0,43	0,00≤π≤0,006
Опромінювання (Х-промені, 3 Гр)				
<i>sti</i> / <i>sti</i>	386	10,4±0,55 ⁺⁺	6,55±1,25 ⁺⁺	0,69±0,42
<i>dsm₁</i> / <i>dsm₁</i>	258	4,65±1,31 [*]	3,88±1,20 [*]	0,00≤π≤0,012
Глорія	476	3,57±0,85	2,52±0,72 [*]	0,17≤π≤0,25
Опромінювання (Х-промені, 6 Гр)				
<i>sti</i> / <i>sti</i>	464	16,79±1,73 ^{***}	11,37±1,47 ^{***}	1,79±0,62 ⁺
<i>dsm₁</i> / <i>dsm₁</i>	782	6,69±0,89 ^{**}	5,31±0,80 ^{**}	0,26≤π≤0,32
Глорія	319	8,46±1,56 ^{**}	6,27±1,36 ^{**}	0,28≤π≤0,34

^{*}, ^{**} – відмінності від спонтанного рівня аберацій істотні при $P \leq 0,05$ і $P \leq 0,01$, відповідно ⁺, ⁺⁺ – 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 недостатівні. Істотне збільшення частки клітин із мостами викликала доза 6 Гр. Мутант *dsm₁* 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±1,56 %, для *dsm₁* / *dsm₁* 6,69±0,89 % і для *sti* / *sti* 16,79±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 *dsm₁* 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>Dsm₁ / dsm₁</i>	42,72 ± 2,96	12,90 ± 1,93	–	–
<i>dsm₁ / dsm₁</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*.

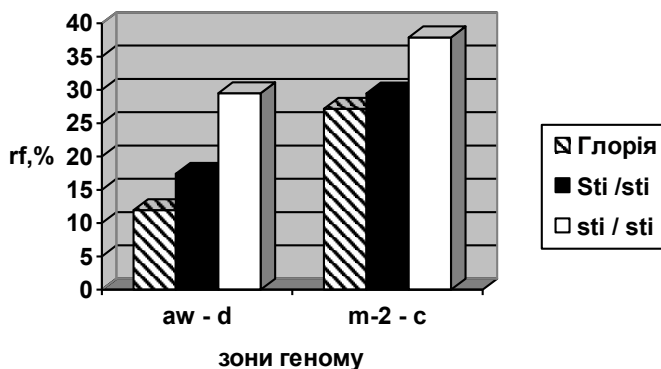


Рис. Частота кросинговеру в маркованих зонах геному у гомозиготі і гетерозиготі за мутацією *sti* та вихідного сорту Глорія

Наші дані свідчать, що мутація *dsm₁* 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 *dsm₁*, 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 *dsm₁* 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 *as₄* і *sti*. За повідомленням Моенса, мутант *as₄* 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 *dsm₁*, 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 γ -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 *dsm₁* // 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 λ // *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 *dsm₁*, 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 *dsm₁*, 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 *dsm₁*, 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-