

**ИНДУЦИРОВАННЫЙ РЕКОМБИНОГЕНЕЗ
ПРИ ОТДАЛЕННОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ ТОМАТА. СООБЩЕНИЕ 2:
влияние γ -излучения и соматоклональной вариабельности *in vitro* на
смещение менделевского моногибридного расщепления и уровня
рекомбинации по несцепленным маркерным генам у гибридов F1
Mo 638 x *L. esculentum* var. *pimpinellifolium*, Mo 638 x *L. hirsutum* var.
*glabratum***

Самовол А.П., доктор с.-х. наук,
Корниенко С.И., доктор с.-х. наук,
Кондратенко С.И., кандидат биол. наук,
Мирошниченко Т.Н., кандидат с.-х. наук,
Замыцкая Т.Н., старший лаборант
Институт овощеводства и бахчеводства НААН

*Изучали влияние γ -облучения семян отдаленных гибридов F1 томата и соматоклональной вариабельности в культуре *in vitro* на проявление эффекта смещения менделевского расщепления и на изменчивость уровня рекомбинации по несцепленным маркерным генам. Для двух вариантов – 4, 10 (контроль + культура *in vitro*) и одного варианта – 11 (γ -обработка семян дозой 60 Гр + культура *in vitro*) установлено достоверное смещение характера менделевского моногенного расщепления в сторону избытка изученных рецессивных генов (**v-2**, **c**, **a**). Установлена также достоверная связь между смещением менделевского расщепления 3:1 гену **v-2** и нарушением независимого расщепления в сторону увеличения на 50% по несцепленным маркерным генам разных хромосом (**c,v-2** / ++), которое хорошо прослеживается в варианте 11 комбинации скрещивания Mo 638 x *L. hirsutum* var. *glabratum*.*

Ключевые слова: γ -облучение, соматоклональные варианты *in vitro*, рецессивные и доминантные гены, менделевское расщепление, независимое расщепление по несцепленным маркерным генам, отдаленная гибридизация.

Введение. Не умаляя достоинства многолетнего применения метода индуцированного мутагенеза в практической селекции, все же считается, © Самовол А.П., Корниенко С.И., Мирошниченко Т.Н., Кондратенко С.И., Замыцкая Т.Н., 2016

что начиная с 60-х годов прошлого столетия и, особенно в настоящее время, пальма первенства убедительно перешла к методу индуцированного рекомбинаогенеза. Этот метод становится основным источником расширения спектра генотипической изменчивости за счет повышения уровня рекомбинационных преобразований в генетической структуре расщепляющихся популяций высших организмов. В этом плане весьма убедительно воспринимается высказывание А. Мюнтцинга (1967, с. 497) [1], который справедливо назвал генетическую рекомбинацию “краеугольным камнем селекции”.

В связи с выше изложенным считается, что традиционная селекция, базирующаяся на гибридизации, рекомбинации и отборе, сегодня и в обозримом будущем будет оставаться основным методом создания новых сортов и гибридов, особенно при решении задач повышения адаптивности растениеводства, его энергоэкономности и природоохранности (А.А. Жученко, А.Б. Король, 1985) [2]. В справедливости этого утверждения легко убедиться, если сопоставить число районированных “мутационных” и “рекомбинационных” сортов – десятки сотен первых и десятки тысяч вторых. Поэтому можно с уверенностью считать, что одним из наиболее эффективных приложений генетики в селекции является разработка новых методов индуцированного расширения спектра рекомбинационной изменчивости, в особенности при межвидовой гибридизации (А. Мюнтцинг, 1967 [1]; А.А. Жученко, 1980 [3]; П. М. Бородин, 1987 [4]; А.П. Самовол, А.А. Жученко, 1997 [5]; и др.).

Методика исследований. Изучали “поведение” 3-х маркерных генов – *v-2* (молодые листья в условиях теплицы приобретают бледноватый оттенок), *c* (картофельный тип листа) и ген *a* (отсутствие антоциановой окраски на вегетативных органах растений) соответственно 2, 6 и 11 хромосомы, как ответной генетической реакции на γ -обработку (дозы 60 и 130 Гр) семян и получение из них в культуре *in vitro* соматоклональных вариантов, производных от межвидовых гибридов F₁ Мо 638 x *L. esculentum* var. *pimpinellifolium* и Мо 638 x *L. hirsutum* var. *glabratum*, посредством первоначального наращивания каллусных клеток из тканей котиленонов и их последующей дифференциацией в течение 6 пассажей на среде МС [6], дополненной 2 мг/л БАП и 2 мг/л ИУК. В дальнейшем, производилась высадка сформированных побегов на жидкую безгормональную среду МС и их микрочеренкование в течение 13 пассажей [7]. Выращенные пробирочные растения в культуре *in vitro* в последующем адаптировали к условиям выращивания *in vivo* и доращивали в условиях остекленной теплицы до полного созревания плодов и выделения из них семян.

Выращивание растений второго поколения и их идентификация по указанным маркерным генам в фазе трёх – пяти настоящих листьев проводилась в пленочной теплице. Полученные, таким образом, результаты генетического эксперимента обрабатывали методами вариационной статистики (П. М. Рокицкий, 1978 и F.R. Immer, 1930) [8; 9].

Результаты исследований. Проведенный нами анализ характера расщепления маркерных признаков в F₂ показал, что задействованный мутагенный фактор – γ -облучение семян гибридов F₁, а также выращивание растений в культуре *in vitro* дифференцированно повлияли на смещение менделевского моногибридного расщепления в пределах исследуемых локусов. Так, например, в F₂ контрольного варианта № 1 комбинации Mo 638 x *var. pimpinellifolium* расщепление, согласно критерия χ^2 , отвечает менделевскому соотношению как 3:1 (табл. 1). В то время как в контрольных вариантах № 4, 10 (растения обеих комбинаций скрещивания Mo 638 x *var. pimpinellifolium* и Mo 638 x *var. glabratum* выращивались в условиях *in vitro*), наблюдается увеличения частоты рецессивного аллеля гена *v-2*. Что касается вариантов № 5 и 6 (γ -обработка семян (60 Гр) + культура *in vitro*, γ -обработка семян (130 Гр) + культура *in vitro*) и № 11 (γ -обработка семян (60 Гр) + культура *in vitro*), то в двух первых из них прослеживается только повышенная тенденция по отношению к смещению менделевского расщепления в сторону избытка выше упомянутого рецессивного аллеля *v-2*. В варианте № 11 наоборот, достоверное смещение менделевского расщепления подтверждено высоким принимаемым значением χ^2 . Следует также отметить, что в указанных выше двух вариантах – 5 и 11, прослеживается аналогичная ситуация по остальным изученным маркерным генам (*c* и *a*, см. табл. 1).

На наш взгляд, существенная разница в соотношении генов в альтернативной маркерной группе *V-2* : *v-2* контрольного и экспериментального вариантов комбинации Mo 638 x *var. glabratum* скрещивания является следствием прямой зависимости от жизнеспособности слабо сбалансированных зигот на уровне семян второго расщепляющегося поколения [подтверждается низким процентом (соответственно 32,4% и 37,8%) выхода нормально развитых растений], неполной пенетрантности гена *v-2*, на которую повлияли условия среды в пленочном вегетационном сооружении, а также, возможно, от неучтенных нами цитогенетических процессов, возникающих во время прохождения мейоза у растений гибридов F₁.

При этом обращает внимание тот факт, что в вариантах 10 и 11 по указанному гену (*v-2*) наблюдается достоверное снижение частоты его проявления.

Результаты проведенных исследований, представленные в таблице 2, указывают на возможность индуцирования эффекта «квазисцепления» с помощью воздействия на семена комплексным мутагенным

1. – Зависимость сегрегации маркерных генов 2,6 и 11 хромосом от γ -излучения семян и выращивания растений межвидовых гибридов F₁ в культуре *in vitro* при условии многократных пассажей на гормональной и безгормональной среде Мурасиге и Скуга (2016 год)

№ опыта	Вариант	Количество		Соотношение между альтернативными маркерными генами			χ^2 (вероятность смещения соотношения менделевского расщепления)		
		высеянных семян, шт.	полученных растений, шт.				V-2 : v-2	C:c	A : a
		F ₂							
<i>Mo 638 x var. pimpinellifolium</i>									
1.	контроль	600	395	2,9 : 1	2,6 : 1	3,5 : 1	0,09	1,63	1,63
4.	контроль (культура <i>in vitro</i>)	500	414	2,1 : 1	2,9 : 1	2,8 : 1	9,94	0,05	0,46
5.	γ -обработка семян (60 Гр) + (культура <i>in vitro</i>)	500	365	2,5 : 1	3,6 : 1	3,8 : 1	2,87	2,11	3,29
6.	γ -обработка семян (130 Гр) + (культура <i>in vitro</i>)	500	386	2,5 : 1	2,7 : 1	3,0 : 1	2,33	0,50	0,06
<i>Mo 638 x var. glabratum</i>									
10.	контроль (<i>in vitro</i>)	500	162	2,0 : 1	4,2 : 1	2,3 : 1	5,52*	3,27	2,09
11.	γ -обработка семян (60 Гр) + (культура <i>in vitro</i>)	500	189	1,4 : 1	4,9 : 1	1,2 : 1	28,99**	6,37**	40,89**

Примечания:

* – значение критерия χ^2 критическое на уровне 3,84 при $p < 0,05$;

** – на уровне 6,63 и более соответственно при $p < 0,01$ и $p < 0,001$, культура *in vitro* – 6 пассажей на модифицированной среде МС, дополненной 2 мг/л БАП и 2 мг/л ИУК + 13 пассажей на жидкой безгормональной среде МС.

2. – Зависимость уровня рекомбинации по несцепленным маркерным генам 2, 6 и 11 хромосом от γ -облучения семян и выращивания растений межвидовых гибридов F1 в культуре *in vitro* при условии многократных пассажей на гормональной и безгормональной среде Мурасиге и Скуга (2016 год)

№ п/п	Вариант	Количество		Генотип	rf \pm m _{гр} (%)	χ^2 (вероятность нарушения уровня независимого расщепления)
		высеянных семян, шт.	полученных растений, шт.			
		F ₂				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Mo 638 x var. pimpinellifolium</i>						
1.	контроль	500	395	<i>av-2/++</i>	50 \pm 2,5	-
		500	395	<i>ac/++</i>	60 \pm 2,2	13,20**
		500	395	<i>cv-2/++</i>	60 \pm 2,2	22,70**
4.	контроль (культура <i>in vitro</i>)	500	414	<i>av-2/++</i>	51 \pm 2,5	-
		500	414	<i>ac/++</i>	44 \pm 3,2	2,28
		500	414	<i>cv-2/++</i>	60 \pm 2,2	30,00**
5.	γ -обработка семян (60 Гр) + (культура <i>in vitro</i>)	500	365	<i>av-2/++</i>	60 \pm 2,3	8,33**
		500	365	<i>ac/++</i>	59 \pm 2,4	5,59*
		500	365	<i>cv-2/++</i>	60 \pm 2,3	39,09**
6.	γ -обработка семян (130 Гр) + (культура <i>in vitro</i>)	500	386	<i>av-2/++</i>	59 \pm 2,3	6,76**
		500	386	<i>ac/++</i>	46 \pm 2,7	1,35
		500	386	<i>cv-2/++</i>	60 \pm 2,3	27,71**

Продолжение таблицы 2.

1	2	3	4	5	6	7
Mo 638 x var. <i>glabratum</i>						
10.	контроль (культура <i>in vitro</i>)	500	162	<i>av</i> -2/++	44±4,3	1,46
		500	162	<i>ac</i> /++	51±3,9	-
		500	162	<i>cv</i> -2/++	59±3,6	2,41
11.	γ- обработка семян (60 Гр) + (культура <i>in vitro</i>)	500	189	<i>av</i> -2/++	51±3,7	-
		500	189	<i>ac</i> /++	40±4,1	2,93
		500	189	<i>cv</i> -2/++	60±3,3	6,78**

Примечания:

* – значение критерия χ^2 критическое на уровне 3,84 при $p < 0,05$;

** – на уровне 6,63 и более соответственно при $p < 0,01$ и $p < 0,001$, культура *in vitro* – 6 пассажей на модифицированной среде МС, дополненной 2 мг/л БАП и 2 мг/л ИУК + 13 пассажей на жидкой безгормональной среде МС.

фактором (γ -обработка семян (60 или 130 Гр) + культура *in vitro*). Установленный эффект с высоким уровнем вероятности (согласно принимаемым значениям χ^2) хорошо прослеживается в 1,4,5 и 6 вариантах комбинации скрещивания Мо 638 x *var. pimpinellifolium* в шести из девяти случаев. При этом нарушение закона независимого наследования наиболее часто встречается по сочетанию генов *cv-2/+* с частотой от 5,59 до 39,09 % (см. табл. 2).

Выводы. Для двух вариантов – 4 и 10 (контроль + культура *in vitro*) и одного варианта – 11 (γ -обработка семян (60 Гр) + культура *in vitro*) установлено достоверное смещение характера менделевского моногенного расщепления в сторону избытка рецессивных генов *v-2*, *c*, *a*.

Достоверное смещение в сторону избытка доминантного гена *C* проявилось только в варианте 11 (γ -обработка семян (60 Гр)+ культура *in vitro*) в комбинации скрещивания Мо 638 x *var. glabratum*.

Только, в единственном, 11 варианте (гены *c v-2/+*) комбинации скрещивания Мо 638 x *var. glabratum* установлена хорошая согласованность между смещением моногенного менделевского расщепления 3:1 и нарушением независимого расщепления по несцепленным маркерным генам в сторону >50 %. Тогда как в остальных вариантах аналогичная связь отсутствует.

Библиография

1. Мюнтцинг А. Генетика (общая и прикладная) / А. Мюнтцинг // М. , Мир, 1967. – 610 с.
2. Жученко А. А. Рекомбинация в эволюции и селекции / А. А. Жученко, А. Б. Король. – М. : Наука, 1985. – 399 с.
3. Жученко А.А. Экологическая генетика культурных растений / А.А. Жученко // Кишинев: Штиинца. – 1980. – 587 с.
4. Бородин П. М. Генетическая рекомбинация в свете эволюции / П. М. Бородин // Природа. – 2007. – № 1. – С. 14 – 22.
5. Самовол А.П. Индуцирование генетической изменчивости у межвидовых гибридов томата. *Сообщение 1*: влияние мутагенных факторов на изменчивость рекомбинационных параметров в классах гетерозигот F_1 с разной конкурентоспособностью /А.П. Самовол, А.А. Жученко // Наукові праці по овочівництву і баштанництву (до 50-річчя інституту). – Х. , 1997. – Т. 1. – С. 63 – 88.

6. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures / Murashige T., Skoog F. // *Plant Physiology*. – 1962. – № 15. – P. 473 – 497.

7. Мирошніченко Т.Н. Особенности длительного культивирования пробирочных растений отдаленных гибридов томата / Т.Н. Мирошніченко, Т.В. Івченко, А.П. Самовол // *Овощи России*. – М., 2015. – № 1 (26). – С. 20 – 26.

8. Рокицкий П.Ф. Введение в статистическую генетику / П.Ф. Рокицкий // Минск : Высшая школа, 1978. – 378 с.

9. Immer F.R. Formulae and tables for calculating linkage intensities / F. R. Immer // *Genetics*. – 1930. – Vol. 15. – P. 81 – 98.

Самовол О.П., Корнієнко С.І., Мірошніченко Т.М., Кондратенко С.І., Заміцька Т.М.

Індукований рекомбіногенез при віддаленій гібридизації томата. *Повідомлення 2*: вплив γ -випромінювання і соматоклональної варіабельності *in vitro* на зсув менделівського моногібридного розщеплення і рівня рекомбінації за незчепленими маркерними генами у гібридів F1 Мо 638 x *L. esculentum* var. *pimpinellifolium*, Мо 638 x *L. hirsutum* var. *glabratum*.

Резюме. Вивчали вплив γ -опромінювання насіння віддалених гібридів F1 томата і соматоклональної варіабельності в культурі *in vitro* на прояв ефекту зсуву менделівського розщеплення та на мінливість рівня рекомбінації за незчепленими маркерними генами. Для двох варіантів – 4 і 10 (контроль + культура *in vitro*) і одного, 11 варіанта (γ -обробка насіння дозою 60 Гр + культура *in vitro*) встановлено достовірне зміщення характеру менделівського моногенного розщеплення в сторону надлишку досліджуваних рецесивних генів (*v-2*, *c*, *a*). Встановлено також достовірний зв'язок між зміщенням менделівського розщеплення 3 : 1 за геном *v-2* і порушень, у бік збільшення на 50 %, незалежного розщеплення за незчепленими маркерними генами різних хромосом (*c*, *v-2* / ++), яке добре простежується у варіанті 11 комбінації схрещування Мо 638 x *L. hirsutum* var. *glabratum*.

Samovol O.P., Kornienko S.I., Miroshnichenko T.M., Kondratenko S.I., Zamytskaya T.N.

INDUCED RECOMBINOGENESIS WITH TOMATO HYBRIDIZATION. *MESSAGE 2*. Effect of γ -radiation and somaclonal

variability in vitro on offset monohybrid Mendelian splitting and recombination level nonentangled marker genes in F1 hybrids Mo x 638 L. *esculentum* var. *pimpinellifolium*, Mo 638 x L. *hirsutum* var. *glabratum*

Summary. We studied the effect of gamma-irradiation of seeds remote tomato F1 hybrids and somaclonal variability in in vitro culture on the expression of Mendelian splitting displacement effect and the variability of the level of recombination none tangled marker genes. For two variants - 4 10 (control + culture in vitro) and one variant - 11 (γ -seed treatment dose of 60 Gy + culture in vitro) have been found significant shift character Mendelian monogenic cleavage towards excess studied recessive genes (v- 2, c, a). Already it has been established as a reliable link between displacement Mendelian splitting 3:1 gene v-2 and the violation of independent cleavage in the direction of increasing by 50% no entangled marker genes of different chromosomes (c, v-2 / +) This is clearly seen in the embodiment 11 mating combinations Mo 638 x L. *hirsutum* var. *glabratum*.