

ЛІСОВСЬКА Т.П.

Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки,
Україна, 43025, м. Луцьк, пр. Волі, 13, e-mail: tlisovska@ukr.net

МЕЙОТИЧНІ МУТАНТИ ТОМАТУ, ЯКІ ВИЯВЛЯЮТЬ ФЕНОТИП ДЕСИНАПСИСУ

Редукцію числа хромосом у мейозі забезпечують специфічні взаємодії гомологічних хромосом і хроматид в профазі першого мейотичного поділу, а саме когезія сестринських хроматид і синапсис гомологічних хромосом. Якщо когезія сестринських хроматид спостерігається також і під час мітозу до анафази, то синапсис гомологів притаманний лише мейотичному поділу [1]. У рослин, як і в переважній більшості видів інших таксонів, синапсису передують утворення дволанцюгових розривів ДНК, що, як вважають, включає механізм репарації і сприяє розпізнаванню ідентичних послідовностей ДНК у не-сестринських хроматидах гомологічних хромосом [2]. Синапсис по всій довжині гомологів забезпечує формування синаптонемного комплексу (СК), латеральні елементи якого формуються на основі білків – когезинів. Когезинові комплекси, ядро яких складається із чотирьох субодиниць – двох білків, що належать до родини білків структурного підтримання хромосом – SMC1 і SMC3, клейзинів Rec8 (паралог мітотичного Rad21 / SCC1) та SCC3 (в мейозі у дріжджів замінюється на паралог Rec11), утворюють кільця, що охоплюють репліковані сестринські хроматиди та організують осьовий елемент хромосоми (в подальшому – латеральний елемент синаптонемного комплексу) [3]. Когезія сестринських хроматид встановлюється переважно під час реплікації хромосом, а руйнування когезинів відбувається ступінчасто, у три етапи [4]. Фермент сепараза руйнує лише фосфорильовані α -клеязини когезинових комплексів спочатку протягом профазі I мейозу, що пов'язують з інтенсивною конденсацією хромосом у цей період [2]. Після руйнування СК гомологи утримуються у бівалентах хіазмами, що становлять собою фізичний зв'язок між хромосомами внаслідок кросинговеру. Для збереження хіазм необхідно, щоб сестринські хроматиди були когезовані у ділянках плечей хромосом дистальніше хіазми. Когезинові комплекси у плечах хромосом руйнуються під час переходу від метафази I до анафази I, що сприяє «сповзанню» хіазм і дозволяє гомологіч-

ним хромосомам розійтися до протилежних полюсів клітини під час анафази I [1]. Передчасна втрата когезії сестринських хромосом дистальніше хіазм призводить до розпаду бівалентів на уніваленти і нерегулярного розподілу до полюсів гомологів у мейозі I та сестринських хроматид у мейозі II. Анеуплоїдні продукти мейозу гинуть або дають початок анеуплоїдним організмам, які мають критично низьку життєздатність у тварин, зокрема, людини.

Третій етап руйнування когезинів відбувається під час переходу від метафази до анафази другого мейотичного поділу. До цього часу когезини в прицентромерних ділянках хромосом захищені білками-шугошинами, які дефосфорилують α -клеязини, що робить їх недоступними до дії сепарази [1, 2].

Крім основних чотирьох білків когезинового комплексу (які мають гомологи та паралоги як всередині виду, так і у різних таксонах), на сьогодні для різних видів встановлена їх асоціація ще із приблизно 20 білками, які впливають на завантаження когезинових комплексів на хромосоми та їх своєчасне розщеплення [3]. Якщо мутації за α -клеязином REC8 викликають критичні пошкодження мейозу аж до повної відсутності першого мейотичного поділу, то мутації за деякими додатковими білками можуть призводити до десинаптичного фенотипу мейоцитів.

У пропонованій роботі наведена порівняльна характеристика шести мейотичних мутантів томату *Lycopersicon esculentum* Mill., які виявляють десинапсис різного ступеня.

Матеріали і методи

Мейотичний мутант *dsm1* – спонтанний мутант, виділений за стерильністю в польових посівах томату сорту Глорія [5], мутант *dsm2* був виділений за стерильністю серед рослин – регенерантів, одержаних із культури калюсу томату сорту Вікторина. Мутація *dsm3* виділена у M_2 сорту Факел, отриманого із насіння, опроміненого γ -променями в дозі 300 Гр. Мутації as_1 , as_5 і as_6 – спонтанні мутації, виділені за сте-

рильність у польових посівах томату сорту San Marzano і Bountry відповідно [6, 7]. Через високу чоловічу стерильність але дещо збережену жіночу фертильність, мутації підтримуються у вигляді популяцій, отриманих від схрещування гомозиготних за мейотичною мутацією рослин у якості материнської форми із фертильними гетерозиготами в якості батьківської форми.

Бутони розміром 2–3 мм фіксували в суміші етанол : крижана оцтова кислота у співвідношенні 3:1, зберігали у 70 % етанолі, фарбували ацетокарміном згідно загальноприйнятої методики. Досліджували мейоз у мікроспорогенезі на давлених препаратах пиляків. Фертильність пилку визначали ацетокарміновим методом.

Результати та обговорення

Рослини, гомозиготні за мутаціями, морфологічно не відрізнялися від інших рослин

вихідних сортів. Квіти були звичайної будови, відбувалося нормальне цвітіння, але плоди майже не зав'язувалися, а ті, що зав'язалися, містили дуже мало насіння.

Гетерозиготні за мутаціями рослини виявили нормальний перебіг мейозу у мікроспорогенезі із формуванням у діакінезі переважно 12 бівалентів.

За виявом на цитологічному рівні всі досліджені мутації мають подібний характер: початок мейозу був очевидно (на рівні світлової мікроскопії) нормальний, порушення у вигляді передчасного розпаду бівалентів спостерігали, починаючи зі стадій диплотени-діакінезу (рис. 1 а, б).

Нами проаналізовано досліджені мутанти за частотою бівалентів і унівалентів на мейоцит у діакінезі, за частотою хіазм на мейоцит і на бівалент (табл.).

Таблиця. Цитологічні показники гомо- та гетерозиготних за мутаціями рослин на стадії діакінезу у мікроспорогенезі

Генотип	Середня частота показників на мейоцит			Частота хіазм на бівалент
	бівалентів	унівалентів	хіазм	
Dsm1/dsm1	11,80±0,08	0,40±0,04	16,75±0,41	1,42±0,04
dsm1/dsm1	8,13±0,13*	7,87±0,57*	8,27±0,36*	1,03±0,01*
Dsm2/dsm2	11,95±0,05	0,10±0,01	16,95±0,41	1,40±0,04
dsm2/dsm2	8,10±0,35*	7,60±0,66*	9,95±0,61*	1,22±0,05*
Dsm3/dsm3	12,00±0,00	0	17,46±0,53	1,46±0,05
dsm3/dsm3	10,25±0,11*	4,12±1,30*	12,05±0,21*	1,18±0,02*
As ₁ /as ₁	11,90±0,04	0,20±0,02	15,00±0,34	1,25±0,03
as ₁ /as ₁	7,50±0,36*	9,00±0,72*	7,92±0,43*	1,05±0,02*
As ₅ /as ₅	11,60±0,11	0,80±0,22	13,75±0,26	1,24±0,03
as ₅ /as ₅	7,15±0,25*	9,70±0,50*	8,55±0,37*	1,20±0,02
As _b /as _b	11,89±0,07	0,20±0,14	15,11±0,37	1,29±0,03
as _b /as _b	6,73±0,23*	10,60±0,55*	7,72±0,27*	1,15±0,02*

Примітки: * – різниця між гомо- і гетерозиготними за мутацією *dsm2* рослинами істотна при $P < 0,01$.

Усі мутантні лінії виявили істотну різницю за дослідженими показниками у порівнянні з відповідними гетерозиготами за одним винятком, про що сказано нижче. Найвищу середню частоту бівалентів на мейоцит спостерігали у гомозиготних рослин *dsm3/dsm3* – 8,13±0,13, найменшу – у гомозигот *as_b/as_b* – 6,73±0,23 (табл.). Середня частота хіазм на мейоцит коливалася в межах від 12,05±0,21 у гомозиготних за мутацією *dsm3* рослин до 7,72±0,27 у гомози-

гот *as_b/as_b*. Частота хіазм на бівалент коливалася в межах від 1,22±0,05 у гомозиготи *dsm2/dsm2* до 1,03±0,01 у гомозиготи *dsm1/dsm1*. Встановлено високу позитивну кореляцію між середньою частотою бівалентів на мейоцит і частотою хіазм на мейоцит ($r = +0,92$), що зрозуміло. Але кореляція між частотою хіазм на мейоцит і частотою хіазм на бівалент була набагато меншою ($r = +0,57$). Наші дані свідчать про те, що біваленти з однією хіазмою розпадаються частіше, у той час, як біва-

ленти, з'єднані двома хіазмами, можуть зберегти обидві. Прикладом слугує мейотичний мутант *as₅*, в якого відсутні істотні відмінності за частотою хіазм на бівалент, що зберігся у діакінезі, у порівнянні з фертильними гетерозиготами (табл.).

У метафазі I біваленти рухаються до центру клітини, утворюючи екваторіальну пластинку, а гомологічні хромосоми орієнтуються центромерами до різних полюсів. У нормі хіазми зберігаються до анафазі I, що забезпечує регулярне розходження гомологічних хромосом. Проте у досліджених мутантних ліній у метафазі I спостерігаються численні унівалентні хромосоми, які знаходяться поза межами веретена поділу як наслідок передчасного розпаданя бівалентів у діакінезі (рис. 1 в).

На стадії анафазі I хромосоми нерегулярно розходяться до полюсів, спостерігається від-

ставання 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, характерне для всіх досліджених мутантів. У мейотичного мутанта *dsm2* у багатьох мейоцитах спостерігали передчасне розщеплення центромери, тобто в анафазі першого мейотичного поділу до полюсів відходять як уніваленти, так і окремі сестринські хроматиди (рис. 1 г). Отже, у цього мутанта порушений не лише другий етап руйнування когезивів, але і третій.

У другому поділі мейозу спостерігали нерегулярне розходження сестринських хроматид, що призводить до утворення нерівних тетрад мікроспор і мікроядер.

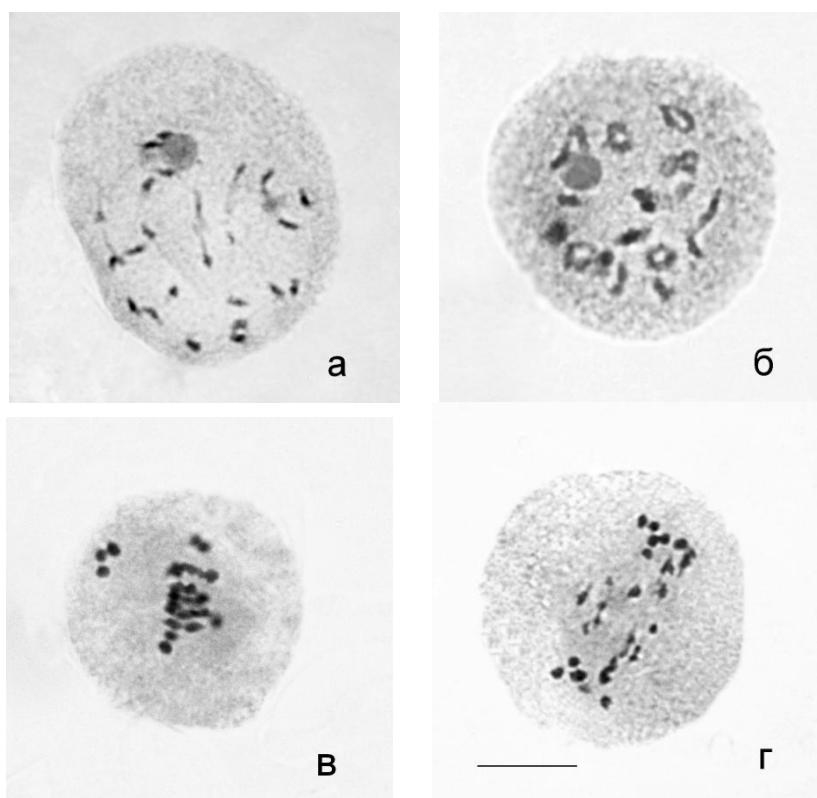


Рис. 1. Ранній діакінез у мейотичного мутанта *dsm2* (а); діакінез у мутанта *as₅* (б); в – метафаза I у мутанта *as₁* (в); анафаза I у мутанта *dsm2* (передчасне розщеплення центромер) (г). Масштабна лінійка – 10 мкм.

Гетерозиготні за мутаціями рослини мали високу фертильність пилку (в межах 97,70–92,01 %), що відбиває нормальний перебіг мейозу у цих рослин і свідчить про рецесивний характер успадкування мутацій. Ми визначили

середню фертильність пилку гомозиготних за мутаціями рослин відносно відповідних гетерозигот (рис. 2). Через те, що цитологічний аналіз мейозу у мегаспороцитах ускладнений, ми визначили кількість насінин, що зав'язалися на

плід, у гетеро- і гомозиготних за мутаціями рослин при запиленні гомозиготних рослин фертильним пилюком. Виходячи з того, що кількість насіння в плоді залежить від сорту томату, ми

також розрахували відсоток насіння, що зав'язалося у плодах, відносно відповідних гетерозигот (рис. 2).

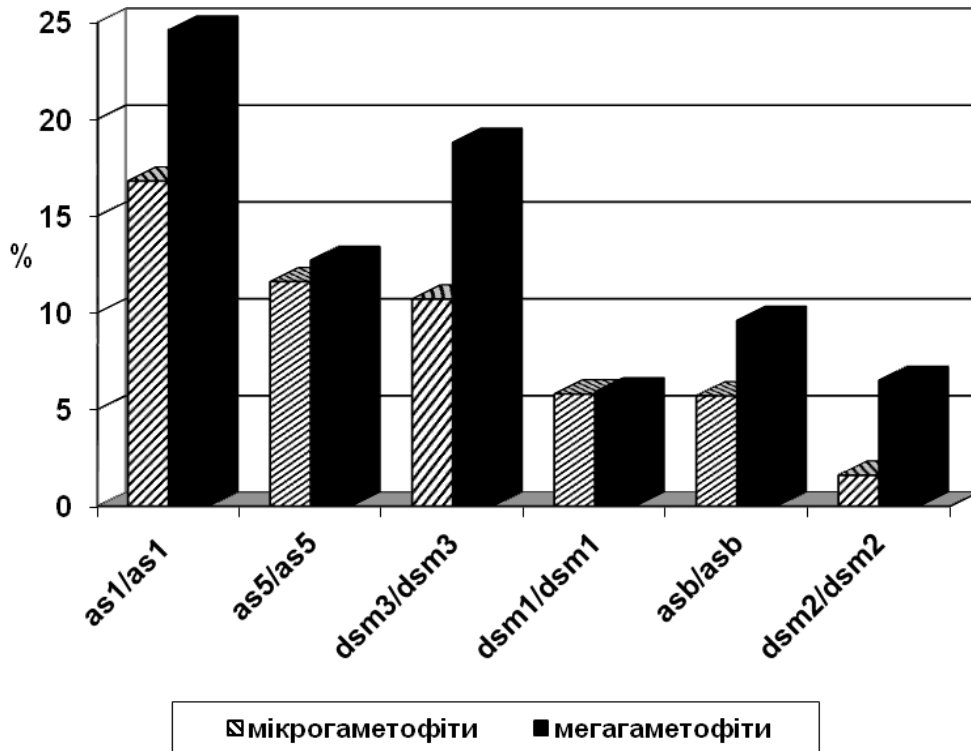


Рис. 2. Фертильність мікро- і мегагаметофітів мейотичних мутантів томату у відсотках відносно показників відповідних гетерозиготних рослин.

Аналіз фертильності мікро- і мегагаметофітів показав, що найвища фертильність продуктів мейозу зберігається у рослин, гомозиготних за мутацією *as1*, найнижчу фертильність виявили у рослин, гомозиготних за мутацією *dsm2*. Ми встановили високу позитивну кореляцію між фертильністю мікро- і мегагаметофітів ($r = +0,91$), що свідчить про приблизно однаковий вияв мутацій як у чоловічому, так і в жіночому мейозі. Згідно з нашими даними фертильність яйцеклітин, здебільшого, перевищує фертильність пилюку (рис. 2).

Цікаво, що між частотою збережених бівалентів на мейоцит і фертильністю пилюку також встановлена позитивна кореляція, що дорівнює $+0,46$. Те, що залежність між цими показниками носить менш виражений характер, ніж попередніми, свідчить про те, що на фертильність продуктів мейозу може впливати також передчасне розщеплення центромер гомологічних хромосом в анафазі I, яке спостерігається,

наприклад, у мейотичного мутанта *dsm2* і призводить до появи ще більшої кількості анеуплоїдних мікроспор.

Усі досліджені мутації виявили моногенний рецесивний характер успадкування. Тест на аallelізм показав, що мутації *as1*, *as5*, *asb* і *dsm2* не аallelні одна одній. Мутація *dsm1* виявилася аallelною мутації *dsm3* ($\chi^2 (1:1) = 3,41$) і мутації *asb* ($\chi^2 (1:1) = 2,58$) і не аallelною іншим дослідженим мутаціям. Аallelні мутації мають різне походження і відрізняються за ступенем порушення мейозу, що дозволяє передбачити, що це різні аallelі одного гена.

Попередньо проведена нами оцінка гомологічної рекомбінації у маркованих зонах геному встановила, що частота кросинговеру у мейотичних мутантів *dsm1*, *dsm2* і *as1* не відрізняється істотно від гетерозиготних за відповідними мутаціями рослин і вихідних сортів [8]. За даними П. Моенса [7] у мейотичного мутанта *as1* частота кросинговеру між генами 2-ої хро-

мосоми дорівнювала контролю, а у мутанта as_b перевищувала контроль. Ми передбачаємо, що процес кросинговеру у цих мутантів не порушений, а десинапсис пов'язаний із передчасною втратою когезії сестринських хроматид.

За літературними даними, у мейотичних мутантів as_1 , as_5 і as_b спостерігали лише окремі фрагменти повністю зібраного синаптонемного комплексу різної довжини [9].

Успіх у дослідженні генетичного контролю елементарних подій, які забезпечують синапсис хромосом, репарацію і рекомбінацію генетичного матеріалу, регулярний розподіл хромосом у гамети, пов'язаний із вивченням мейотичних мутантів – організмів із порушенням нормального перебігу мейозу. До генетичного контролю мейозу залучена велика кількість генів, про що свідчить існування багатьох неалельних мейотичних мутацій. У виду *Saccharomyces cerevisiae*, мейоз якого досліджений найкраще, встановлено понад 300 мутацій, які впливають на мейоз і споруляцію [10], у дрозофіли – більше 80-ти [11]. У рослин, переважно арабідопсису, кукурудзи і рису – видів із найбільш дослідженим мейозом серед рослин – встановлено близько 80 неалельних генів, які контролюють окремі ланки мейозу – від вступу в мейоз до закінчення цього процесу [1, 12].

Серед мейотичних мутантів рослин існує велика група генів які за цитологічним виявом класифікували у минулому сторіччі як “десинаптичні”. Розвиток молекулярних та ульт-

траструктурних методів дослідження мейозу дозволив встановити, що подібний фенотип зумовлює велика група генів, які пов'язані із формуванням гетерологічного синапсису, порушенням формування СК, кросинговеру, експресією генів та регуляцією процесу своєчасного завантаження та розщеплення когезинових комплексів [3, 4, 12]. Дослідження мейотичних мутантів, які виявляють фенотип десинапсису, дозволить з'ясувати генетичний контроль підтримання когезії сестринських хроматид у мейозі.

Висновки

Надана порівняльна характеристика шести мейотичних мутацій томату *Lycopersicon esculentum* Mill., у яких порушений механізм підтримання хіазм до анафази I мейозу. Мутантні рослини виявили нормальний вегетативний ріст, але низьку фертильність пилюку і кількість насіння у плодах. Досліджені мейотичні мутанти мають подібний цитологічний вияв із різним ступенем десинапсису. Мутації виявили рецесивний моногенний характер успадкування. Тест на алелізм показав, що мутації as_1 , as_5 і as_b і $dsm2$ не алельні одна одній. Мутація $dsm1$ виявилася алельною мутаціям $dsm3$ і as_b . Виходячи з того, що попередні дослідження не виявили зниження частоти кросинговеру в маркованих зонах геному, передбачаємо передчасне руйнування когезинів, які утримують сестринські хроматиди дистальніше хіазм у цих мутантів.

Література

- Zamariola L., Tiang C.L., De Storme N., Pawlowski W., Geelen D. Chromosome segregation in plant meiosis // *Front. Plant Sci.* – 2014. – V. 5, Article 279. doi: 10.3389/fpls.2014.00279.
- Mercier R., Mezard Ch., Jenczewski E., Macaisne N., Grelon M. The molecular biology of meiosis in plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2015. – V. 66 – P. 5.1–5.31. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-035923.
- Peters J.-M., Tedeschi A., Schmitz J. The cohesin complex and its roles in chromosome biology // *Genes & Development.* – 2008. – V. 22. – P. 3089–3114.
- De K., Sterle L., Krueger L., Yang X., Makaroff C.A. *Arabidopsis thaliana* WAPL is essential for the prophase removal of cohesin during meiosis // *PLoS Genet.* – 2014. – 10 (7). – e1004497. doi: 10.1371/journal.pgen.1004497.
- 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.
- Soost R.K. Comparative cytology and genetics of asynaptic mutants in *Lycopersicon esculentum* Mill. // *Genetics.* – 1951. – V. 36. – P. 110–134.
- Moens P.V. Genetic and cytological effects of three desynaptic genes in the tomato // *Canad. J. Genet. and Cytol.* – 1969. – V. 11, № 4. – P. 857–859.
- Лісовська Т.П., Страту Л.С., Войтюк В.П., Дмитроца О.Р. Чотири мейотичні мутації томату редукують частоту хіазм і виявляють нормальний або високий рівень гомологічної рекомбінації // *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: 36. наук. праць. / Укр. Т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова.* – К.: Логос, 2007. – Т. 1. – С. 109–113.
- Havekes F.W., de Jong J.H., Heyting C., Ramanna M.S. Synapsis and chiasma formation in four synaptic mutants of the tomato (*Lycopersicon esculentum*) // *Chromosome Research.* – 1994. – V. 2. – P. 315–325.
- Enyenihi A.H., Saunders W.S. Large-Scale Functional Genomic Analysis of Sporulation and Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics.* – 2003. – V. 163, № 1. – P. 47–54.

11. Гришаева Т.М., Богданов Ю.Ф. Генетический контроль мейоза у дрозофилы // Генетика. – 2000. – Т. 36, № 10. – С. 1301–1321.
12. Mercier R., Grelon M. Meiosis in plants: ten years of gene discovery // Cytogenet. Genome Res. – 2008. – V. 120. – P. 281–290.

LISOVSKA T.P.

*Lesia Ukrainka Eastern European National University,
Ukraine, 43025, Lutsk, Voli prosp., 13, e-mail: lisovskaia52@mail.ru*

MEIOTIC MUTANTS TOMATOES WITH DESYNAPTIC PHENOTYPE

Aim. A comparative analysis of the cytological manifestation in the meiosis of six meiotic mutants was carried out.

Methods. Buds with anthers 2–3 mm long fixed in ethanol: glacial acetic acid in a ratio of 3:1, were stored in 70 % ethanol, stained with acetocarmine. For cytology preparations prepared pressure anthers at various stages of meiosis. Pollen fertility was determined by staining with acetocarmine. **Results.** Meiotic mutations tomato dsm1, dsm2, dsm3, as1, as5 and asb not affect the vegetative growth of plants, but have low fertility of pollen and number of seeds in the fruit. They are similar cytological manifestation. The beginning of meiosis occurred apparently normal, as violations of premature decay bivalent observed since diplotene. Chiasma frequencies in pollen mother cells ranged from 8.13 to dsm3 / dsm3 to 6.73 in asb / asb. All investigated mutations revealed monogenic recessive character of inheritance. Mutations as1, as5 and asb and dsm2 are not allelic to each other. The mutation dsm1 appeared allelic to mutations dsm2 and asb. **Conclusions.** Investigated meiotic mutations failure of chiasma maintenance in the pollen mother cells with varying degrees of desynapsis. Based on the fact that the previously published data did not reveal a reduction in the recombination frequency in marked areas of the genome, we anticipate premature removal of cohesin that hold sister chromatids distal chiasmata.

Keywords: meiosis, meiotic mutants, sister chromatids cohesion, premature separation of the bivalents, *Lycopersicon esculentum* Mill.