

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МАРКЕРНОЙ ЛИНИИ КУЛЬТУРНОГО ТОМАТА Мо938

© 2019 г. Р. А. Комахин<sup>1</sup>, \*, С. Р. Стрельникова<sup>1</sup>, А. А. Жученко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550 Россия

\*e-mail: recombination@iab.ac.ru

Поступила в редакцию 29.01.2018 г.

После доработки 07.03.2018 г.

Принята к публикации 14.03.2018 г.

У гибридов культурного томата (Марглоб × Мо938) ген “отсутствия антоциана” наследуется сцепленно с геном “карликовости” *d* (*dwarf*) хромосомы 2, но с частотой кроссинговера примерно в 3 раза выше, чем по генетической карте и у других гибридов с линией Марглоб. Цитологический анализ материнских клеток пыльцы гибридов (Марглоб × Мо938) не выявил нарушений мейотического деления и сегрегации хромосом, а также снижения фертильности. Методом функционального теста на аллелизм установлено, что у Мо938 в отличие от других маркерных линий томата Мо500, Мо504 и Мо755 признак “отсутствия антоциана” не детерминируется генами *aw* (*without anthocyanin*) и *aa* (*anthocyanin absent*) хромосомы 2. С использованием потомства F<sub>2</sub> межвидовых гибридов (Мо938 × *Solanum pimpinellifolium*) показано независимое наследование гена “отсутствия антоциана” относительно маркерных генов *wv* (*white virescent*) и *d*, а также шести анкерных маркеров SSR, распределенных на разных участках хромосомы 2. Таким образом, линия томата Мо938 несет маркеры *d* и *wv* в хромосоме 2, а также ген “отсутствия антоциана”, не принадлежащий хромосоме 2.

**Ключевые слова:** томат, *Solanum lycopersicum*, *Solanum pimpinellifolium*, гибриды, генетическая карта, гены, SSR, рекомбинация.

**DOI:** 10.1134/S0016675819010089

Генетическая изменчивость, генерируемая в мейозе у гетерозигот, является совокупным результатом взаимодействия нескольких фундаментальных механизмов. Один из них общеизвестен и реализуется в виде независимой рекомбинации гомологичных хромосом при формировании гаплоидных гамет. Еще два механизма формируют генетическую изменчивость путем перераспределения одно- и двухцепочечных участков ДНК между гомологами и иницируются в профазе мейоза запрограммированными двухцепочечными разрывами ДНК (ДЦР) [1]. Не вся генетическая изменчивость, сформированная на уровне ДНК, может быть обнаружена среди потомства гетерозигот и затем использована для селекционной работы. Естественный отбор на всех этапах жизненного цикла, включая гаметы, зиготы, семена, проростки и т.д., способен элиминировать часть сформированной изменчивости [2].

Для изучения генетической изменчивости в потомстве томатов удобно использовать линии со сцепленными маркерными генами, локализованными на генетических картах и имеющими фенотипическое проявление на ранних стадиях развития растений [3]. Применение альтернативных фенотипических маркеров позволяет относительно

быстро и дешево выполнить анализ нескольких тысяч растений. Это особенно актуально для статистически значимого выявления “слабых” эффектов в наследовании генов при проведении фундаментальных исследований. Недостаток этого подхода, прежде всего, заключается в ограниченности числа фенотипических маркеров, используемых в одной комбинации скрещивания, поскольку они способны снижать жизнеспособность линий, гибридов и их потомства. Обойти это затруднение можно с помощью молекулярных маркеров, однако из-за их высокой стоимости и трудоемкости использования размер анализируемых популяций очень мал (например, [4]), поэтому статистически значимыми могут быть признаны только “сильные” эффекты. Проблема использования молекулярных маркеров дополнительно осложняется низким генетическим разнообразием культурного томата (*Solanum lycopersicum*) [5]. Предпринимались многочисленные попытки построить молекулярные карты сцепления локусов на основе анализа потомства межвидовых гибридов томатов, однако зачастую новые ДНК-маркеры оставались полиморфными только для популяций, в которых были созданы [4, 6]. Поэтому до настоящего времени для проведения

фундаментальных исследований востребованными остаются фенотипические маркеры.

Оценку динамики генетической изменчивости среди потомства гетерозигот проводят по характеру наследования генетических детерминант (локусов, генов, маркеров ДНК), расположенных как в разных хромосомах, так и в одной. Обычно поведение генетических детерминант негомолочных хромосом подчиняется правилу независимого наследования и его соблюдение является одним из основных элементов генетического анализа и используется для их отнесения к той или иной группе сцепления. Разумеется, независимое расщепление характерно и для достаточно удаленных генетических детерминант одной хромосомы. Нарушение случайного комбинирования генов, устанавливаемое при анализе дигибридного расщепления с помощью статистических тестов, свидетельствует о возможности сцепления генов и их принадлежности одной группе сцепления. Характер наследования сцепленных генетических детерминант определяет частоты кроссинговеров между ними, необходимые для установления их взаимного расположения в группе сцепления.

В наших исследованиях была обнаружена ситуация, при которой характер наследования генетически сцепленных маркерных генов *aw* и *d* хромосомы 2 зависел от линий культурного томата, используемых в скрещиваниях. Частота кроссинговера между генами *aw* и *d* составляла 38.7–44.9% у гибридов (Марглоб × Мо938) [7–9] и примерно в 2–3 раза превышала рекомбинационное расстояние 9.4–14.1% у другой комбинации (Марглоб × Мо500) [7, 10], которое в целом соответствовало 11% генетической карты [11, 12]. Направление скрещиваний существенно не влияло на аномально высокую частоту рекомбинации (*rf*), поскольку у обратных гибридов (Мо938 × Марглоб) *rf* на участке *aw* и *d* составляла около 39.9% [9]. Очевидно, различия в частотах кроссинговера у гибридов детерминировались генетическими особенностями линий томата Мо500 и Мо938 с известной локализацией маркерных генов [11, 12].

Цель данной работы заключается в выяснении причины различий в частотах рекомбинации между одинаковыми маркерными генами хромосомы 2 у гибридов томата разных комбинаций скрещиваний.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы гомозиготные линии культурного томата (*S. lycopersicum*) и томата смородинового (*Solanum pimpinellifolium*) (табл. 1), маркерные гены хромосомы 2 томата *aw* (*without*

*anthocyanin*), *d* (*dwarf*), *wv* (*white virescent*) и *aa* (*anthocyanin absent*) [11].

Статистическая оценка по критерию хи-квадрат ( $\chi^2$ ) и расчет частоты рекомбинации (*rf*) методом наибольшего правдоподобия выполнены в соответствии с рекомендациями [13]. Генетическая карта хромосомы 2 томата линии Мо938 была построена с частичным использованием программного обеспечения MapDisto version 1.7 [14]. Оценка кроссинговера проводилась с использованием популяций F<sub>2</sub> с менделевским наследованием маркерных генов и всхожестью семян не менее 90%. Растения каждой популяции F<sub>2</sub> (совокупность семян одного плода) выращивали в течение месяца при освещенности 15–20 кЛк, температуре 24°C и фотопериоде 16/8 ч.

Выделение тотальной ДНК проводили из молодых листьев с помощью цетилтриметиламмоний-N-бромид (Sigma, США) [15]. Молекулярно-биологический анализ растений F<sub>2</sub> выполняли методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1.75 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.2 мМ dNTPs, 15 пМ каждого праймера, 1.5 ед. а. *Taq*-полимеразы “SynTaq” (Синтол, Россия), однократный буфер для ПЦР и 100–150 нг тотальной ДНК. ПЦР проводили в амплификаторе MJ Research PTC-200 DNA Engine (Bio-Rad Laboratories, США) по следующей программе: начальная денатурация 95°C – 5 мин; далее 35 циклов – денатурация 95°C – 30 с, отжиг – 50–56°C (в зависимости от использованных праймеров) – 30 с, элонгация 72°C – 1 мин; завершающая элонгация 72°C – 10 мин. Продукты амплификации окрашивали бромистым этидием и разделяли электрофорезом в 2%-ном или 4%-ном агарозном геле.

Взаимное расположение маркеров в хромосоме 2 определяли с использованием маркерных генов (табл. 1) и маркеров SSR (Simple Sequence Repeats): TGS0159, TGS1603, TEI0920, TGS1403, TGS0031, TES0332, TES0634, TGS0686, TGS0162, TES1149, TGS1672, TGS0525, TEI0643, TEI1009, TGS2926, TGS0361, TGS0961, TES0315, TGS0903, TGS0007, TGS0494, TGS1835, TGS1644, TGS1832, TGS0353, TGS1116, TGS0291, TGS0717, TGS0328, TGS0897 [16], SSR66, SSR349A, SSR356, SSR32, SSR26 [17], SSR83, SSR295, SSR50, SSR287, SSR103, SSR359, SSR125 [18]. Праймеры для маркеров были синтезированы в Центре коллективного пользования “Биотехнология” ФГБНУ ВНИИСБ.

Для окраски хромосом в материнских клетках пыльцы томата использовали ранее опубликованную методику [19]. Подсчет частоты хиазм проводили на микропрепарате с фазовым контрастом Opton (Axiophot, Германия) как описано ранее [20]: открытый бивалент – одна хиазма, закрытый бивалент – две или три хиазмы. Учитывали микроспорциты с неповрежденной клеточной стен-

Таблица 1. Генотипы линий томатов

Линия	Маркер	Хромосома, локус	Откуда получен	
<i>Solanum lycopersicum</i>	Марглоб	<i>Wv</i> – все листья зеленые	2, 41	Россия
		<i>Aw</i> – антоциановая окраска	2, 59	
		<i>D</i> – высокие растения	2, 70	
	Мо938 [11, 12]	<i>wv</i> – верхние листья желтые	2, 41	Молдова
		<i>aw</i> – отсутствие антоциана	2, 59	
		<i>d</i> – растения карликовые	2, 70	
	Мо504 [11, 12]	<i>s</i> – сложное соцветие	2, 30	США
		<i>bk</i> – плоды с заостренным концом	2, 38	
		<i>Wo</i> – все части растения густо опушены	2, 46	
		<i>o</i> – овальные плоды	2, 55	
		<i>aw</i> – отсутствие антоциана	2, 59	
		<i>p</i> – плоды с матовой поверхностью	2, 67	
		<i>d</i> – растения карликовые	2, 70	
	Мо500 [11, 12]	<i>Wo</i> – все части растения густо опушены	2, 46	Молдова
		<i>aw</i> – отсутствие антоциана	2, 59	
		<i>d</i> – растения карликовые	2, 70	
		<i>m-2</i> – мелкие хлоротичные пятна на листьях	6, 77	
		<i>c</i> – картофельный лист	6, 104	
Мо755 [11, 12]	<i>wv</i> – верхние листья желтые	2, 41	США	
	<i>aa</i> – отсутствие антоциана	2, 50		
	<i>d</i> – растения карликовые	2, 70		
<i>Solanum pimpinellifolium</i>	0722	<i>Wv</i> – все листья зеленые	2, 41	Молдова
		<i>Aw</i> – антоциановая окраска	2, 59	
		<i>D</i> – высокие растения	2, 70	

кой и 12 бивалентами в одной плоскости. Бивалент 2 томата на цитологических препаратах определяли по наличию ядрышкового организатора.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Измененный порядок маркерных генов хромосомы 2 у линии культурного томата Мо938*

С целью подтверждения, что полученные в разное время результаты с использованием линий Мо938 и Мо500 не случайны, эксперимент был повторен. В качестве дополнительного контроля выбрали линию томата Мо504, которая также содержит во второй хромосоме маркерные гены *aw* и *d* [11, 12], но была создана независимо от Мо500 и Мо938 (табл. 1). Было получено по три растения F<sub>1</sub>

в каждой комбинации скрещиваний (Марглоб × Мо500) и (Марглоб × Мо504), а также пять гибридов F<sub>1</sub> (Марглоб × Мо938). Фертильность пыльцы у всех гибридов составляла 90–95% и по этому показателю они не различались. Среди потомства F<sub>2</sub> от самоопыления гибридов наследование маркерных генов во всех изученных локусах характеризовалось сегрегацией на доминантные и рецессивные фенотипы в соотношении 3 : 1 (табл. 2).

Оценка показала, что у гибридов комбинаций (Марглоб × Мо504) и (Марглоб × Мо500) гены *aw* и *d* наследуются сцепленно с частотой кроссинговера, соответственно  $14.8 \pm 2.1$  и  $13.8 \pm 1.3\%$  (табл. 2), что в целом близко к ожидаемому 11% по данным генетической карты [11, 12, 21]. В потомстве гибридов (Марглоб × Мо938) все маркерные гены *wv*, *d* и *aw* наследовались сцепленно, хотя ранее *aw*

**Таблица 2.** Частота рекомбинации между маркерными генами у гибридов культурного томата

Вариант	Число растений F <sub>2</sub>	Фенотипические классы F <sub>2</sub>				$\chi^2$ (9 : 3 : 3 : 1)*	Частота рекомбинации (rf), %	
		AwD	Awd	awD	awd		aw-d	генетическая карта
F <sub>1</sub> (Марглоб × Мо504)	894	589	69	58	178	407.13	14.8 ± 2.1	11
F <sub>1</sub> (Марглоб × Мо500)	841	555	58	53	175	426.64	13.8 ± 1.3	
F <sub>1</sub> (Марглоб × Мо938)	6991	4030	1164	1281	516	28.50	45.7 ± 0.7	
F <sub>1</sub> (Марглоб × Мо938) [9]						4.13	44.9 ± 1.7	
F <sub>1</sub> (Марглоб × Мо938)	6991	AwWv	Awwv	awWv	awwv	18.50	aw-wv	18
		3971	1223	1283	514		47.0 ± 0.8	
F <sub>1</sub> (Марглоб × Мо938) [9]						0.08	49.1 ± 2.2	
F <sub>1</sub> (Марглоб × Мо938)	6991	WvD	Wvd	wvD	wvd	971.67	wv-d	29
		4480	774	831	906		26.7 ± 0.4	
F <sub>1</sub> (Марглоб × Мо938) [9]						189.24	24.9 ± 1.0	

\* Критерий  $\chi^2$  (9 : 3 : 3 : 1) при независимом наследовании маркеров определяли по формуле  $(a_1 - 3a_2 - 3a_3 + 9a_4)^2/9n$ , где  $a_1 = AB, a_2 = Ab, a_3 = aB, a_4 = ab$  при вероятности ошибки  $p \leq 0.05$  и  $d.f. = 1$ , критическое значение  $\chi^2 = 3.84$  (то же для табл. 4) [13].

и wv сегрегировали независимо [9]. Частоты рекомбинации между маркерами хромосомы 2 у гибридов этой комбинации, полученных в разное время, не различались. Так, rf между aw и d составляла 44.9–45.7%, что примерно в 3 раза выше, чем у гибридов (Марглоб × Мо504) и (Марглоб × Мо500). Частота рекомбинации на участке wv-aw у гибридов (Марглоб × Мо938) составляла 47.0–49.1% и была более чем в 2.5 раза выше, чем по генетической карте (18%). На участке wv-d rf составляла 24.9–26.7% и была близка к значению генетической карты 29%. В целом у гибридов (Марглоб × Мо938) ген aw оказался равноудаленным от обоих генов wv и d хромосомы 2, которые имели ожидаемое взаимное расположение.

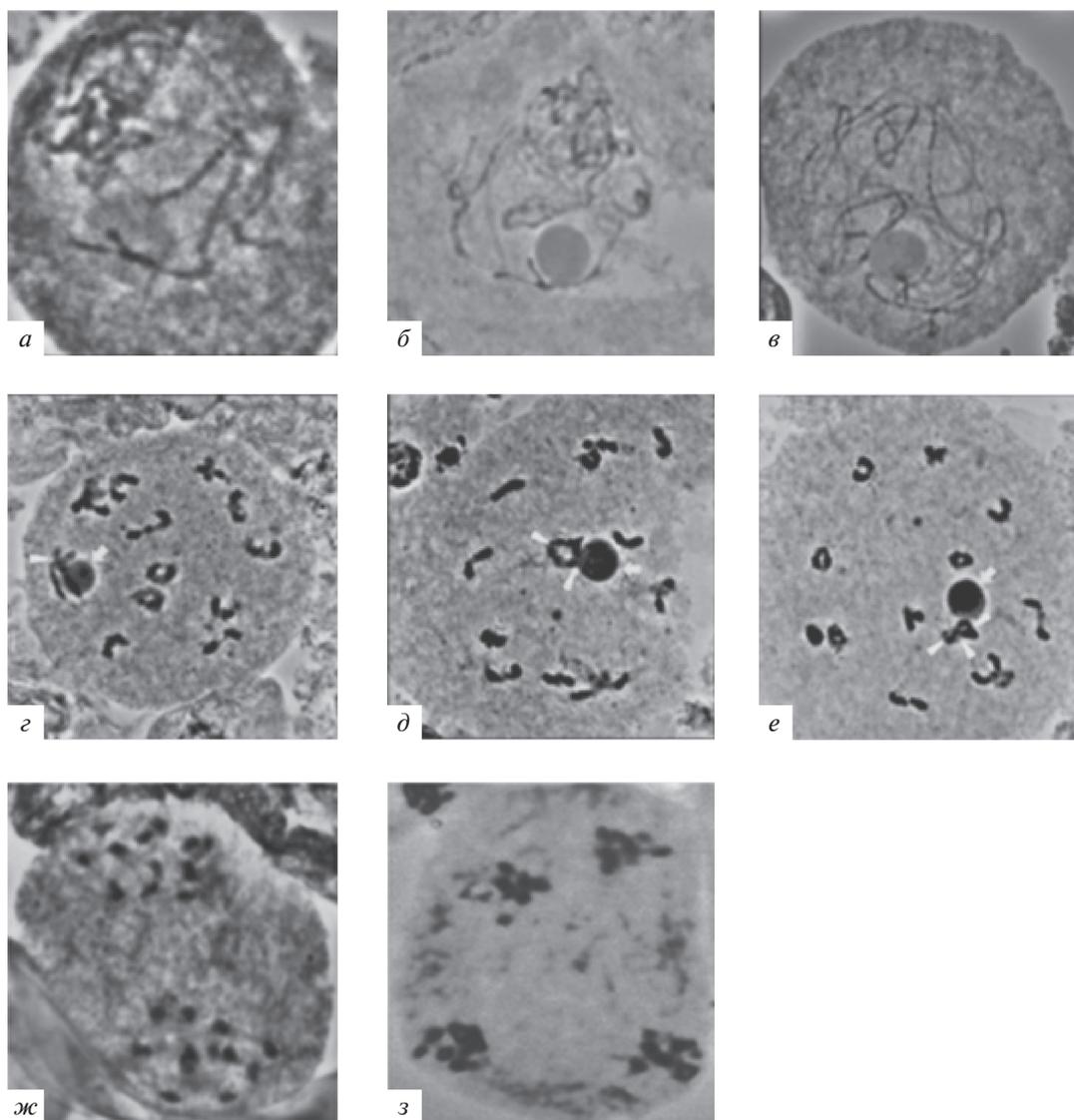
На основе полученных результатов можно выделить несколько основных гипотез аномального расположения маркерного гена “отсутствия антоциана” aw у линии Мо938. Во-первых, ген aw мог быть транслоцирован в другой локус хромосомы 2, достаточно удаленный относительно генов wv и d. Во-вторых, признак “отсутствие антоциана” мог детерминироваться отличным от aw геном хромосомы 2, также расположенным на достаточном удалении от генов wv и d. В-третьих, не исключалась инверсия участка хромосомы с генами aw-d у линии Мо938, сопровождаемая аномально высокой частотой рекомбинации у гибридов, полученных с ее использованием. Это предположение основывалось на экспериментальных данных о том, что гетерозиготность по инверсии в

биваленте 1 у самок мыши повышала число кроссинговеров в инвертированном районе этого бивалента и увеличивала долю бивалентов с двумя и тремя кроссинговерами [22]. В-четвертых, признак “отсутствие антоциана” мог детерминироваться геном, расположенным вне хромосомы 2, но по неизвестным причинам наследующимся сцепленно с генами wv и d. Последнее предположение получило в научной литературе название “квази-сцепление” (quasi-linkage) и было описано у томата [2]. Выдвинутые гипотезы были проверены в нескольких экспериментах.

*Цитологический анализ материнских клеток пыльцы гибридов томата не выявил нарушений в структуре бивалента 2 и в мейозе*

Хромосома 2 томата имеет относительно небольшое по размеру короткое плечо и практически представлена длинным плечом [11, 12, 21]. Следовательно, возможная инверсия в хромосоме 2 линии Мо938 по происхождению могла быть парацентрической и располагаться в длинном плече на значительном расстоянии от центромеры, если судить по сопоставлению цитологической и классической карт хромосом томата [21].

Цитологический анализ материнских клеток пыльцы у гибридов (Марглоб × Мо938) на стадии пахитены не выявил заметных в световой микроскоп петель во всех бивалентах 2, в том числе в



**Рис. 1.** Микроспороциты томата на различных стадиях мейоза. В пахитене: *а* – (Марглоб × Мо938), *б* – линия Мо938, *в* – линия сорта Марглоб; в диакинезе с различным числом хиазм в биваленте 2 гибрида (Марглоб × Мо938): *г* – с одной хиазмой, *д* – с двумя хиазмами, *е* – с тремя хиазмами. Фигурными стрелками показаны ядрышковые организаторы бивалента 2, обычными стрелками указаны хиазмы в биваленте 2; в анафазе у гибридов (Марглоб × Мо938): *ж* – анафаза I, *з* – анафаза II.

сравнении с бивалентами 2 родительских линий Марглоб и Мо938 (рис. 1, *а*, *б*, *в*).

На стадии диакинеза у гибридов (Марглоб × Мо938) не выявлено заметных в световой микроскоп структурных нарушений в биваленте 2 (рис. 1, *г*, *д*, *е*). В то же время общая частота хиазм в биваленте 2 у этих гибридов была ниже, чем у (Марглоб × Мо504), соответственно  $1.57 \pm 0.06$  ( $n = 289$ ) и  $1.79 \pm 0.04$  ( $n = 301$ ).

В материнских клетках пыльцы гибридов (Марглоб × Мо938) на стадии анафазы I наблюдалось нормальное расхождение гомологов всех бивалентов с формированием двух полюсов по 12 хромосом в каждом и отсутствие “мостов” между

ними (рис. 1, *ж*). Аналогично, на стадии анафазы II наблюдалось формирование четырех полюсов и отсутствие “мостов” между ними (рис. 1, *з*).

*Признак “отсутствие антоциана” у линии Мо938 не контролируется геном aw*

Для того чтобы валидировать маркерные гены *wv*, *aw* и *d* хромосомы 2 линии Мо938, был проведен функциональный тест на их соответствие аналогичным аллелям из маркерных линий Мо500, Мо504 и Мо755. Если маркерные линии содержат мутации со сходным фенотипическим проявлением в разных генах, то гибриды первого

Таблица 3. Функциональный тест на аллелизм маркерных генов линии Мо938

Материнская линия (маркеры) [11, 12]		Линия опылителя (маркеры)			
		Мо938 ( <i>aw, d, wv</i> )	Мо500 ( <i>aw, d, Wv</i> )	Мо504 ( <i>aw, d, Wv</i> )	Мо755 ( <i>aa, d, wv</i> )
Мо938	<i>aw</i>	+	–	–	–
	<i>d</i>	+	+	+	+
	<i>wv</i>	+	–	–	+
Мо500	<i>aw</i>	–	+	+	–
	<i>d</i>	+	+	+	+

Примечание. “+” – проявление рецессивной мутации; “–” – отсутствие рецессивной мутации, “дикий тип”.

поколения между ними (дигетерозиготы) будут иметь “дикий тип” из-за доминирования нормальных аллелей каждого из генов. Были получены 10–14 гибридов F<sub>1</sub> каждой комбинации скрещиваний (Мо938 × Мо500), (Мо938 × Мо504), (Мо938 × Мо755), (Мо500 × Мо938), (Мо500 × Мо504) и (Мо500 × Мо755), маркерный фенотип которых представлен в табл. 3.

Как следует из табл. 3, у потомства от самоопыления линий Мо938 и Мо500 проявляются все признаки, детерминируемые соответствующими рецессивными маркерными генами.

Гибриды F<sub>1</sub> всех комбинаций и направлений скрещивания имеют карликовый фенотип, свидетельствующий о наличии у линий Мо938, Мо755, Мо504 и Мо500 рецессивной мутации в гене *d*. Как и ожидалось, только гибриды (Мо938 × Мо755) имели желтые верхушечные листья, что свидетельствует о наличии у линий Мо938 и Мо755 рецессивной мутации в гене *wv* (табл. 3).

Линии Мо500 и Мо504 содержат одинаковые аллели гена *aw*, поскольку все гибриды между ними были без антоциана. Одновременно гибриды F<sub>1</sub> комбинаций (Мо938 × Мо500), (Мо938 × Мо504), (Мо938 × Мо755), (Мо500 × Мо938) и (Мо500 × Мо755) демонстрировали антоциановую окраску. Антоциановый фенотип у гибридов (Мо938 × Мо755) и (Мо500 × Мо755) подтверждает, что у линий Мо938 и Мо500 признак “отсутствие антоциана” не детерминируется геном *aa* из линии Мо755. Наличие антоциановой окраски у гибридов (Мо938 × Мо500), (Мо938 × Мо504) и (Мо500 × Мо938) свидетельствует о детерминации признака “отсутствие антоциана” у линии Мо938 также геном отличным и от *aw* у линий Мо500 и Мо504.

*Детерминирующий признак “отсутствие антоциана” ген линии Мо938 находится вне хромосомы 2*

Для проверки гипотезы о локализации гена “отсутствия антоциана” линии Мо938 в другом локусе хромосомы 2 было изучено его наследова-

ние относительно фенотипических и известных молекулярных маркеров SSR хромосомы 2 томата. Поскольку SSR-маркеры не обнаруживали полиморфизма между линией Мо938 и линией сорта Марглоб, были созданы два межвидовых гибрида путем опыления Мо938 пыльцой дикорастущего вида томатов *S. pimpinellifolium*.

Фертильность пыльцы у межвидовых гибридов F<sub>1</sub> составляла около 40% и по этому показателю они существенно не различались между собой. Среди расщепляющихся гибридов F<sub>2</sub> наследование всех маркерных генов характеризовалось сегрегацией на доминантные и рецессивные фенотипы в соотношении 3 : 1. В целом при анализе 3212 растений частота кроссинговера на участке *wv–d* составила 24.5%, между *wv* или *d* и геном “отсутствия антоциана” – более 48–49% (табл. 4).

Взаимное наследование маркерных генов было близко к полученным ранее результатам для межлинейных гибридов комбинации (Мо938 × Марглоб) [9], с тем исключением, что ген “отсутствия антоциана” в потомстве межвидовых гибридов имел четкое независимое наследование относительно обоих маркерных генов *wv* и *d* (табл. 4).

Методом ПЦР были обнаружены маркеры SSR, выявляющие одновременно полиморфизм между родительскими растениями Мо938 и *S. pimpinellifolium*, в их гибридах F<sub>1</sub>, а также среди потомства F<sub>2</sub>: TGS0007, TGS2926, TGS1403, TGS0159, SSR26 и SSR32.

Для определения характера наследования между генами фенотипических маркеров и маркерами SSR было проведено молекулярное генотипирование 218 индивидуальных растений популяции F<sub>2</sub>. Установлено, что молекулярные маркеры среди F<sub>2</sub> сегрегировали в соотношении 1 : 2 : 1 или 3 : 1 (в случае нуль-аллеля), за исключением SSR26, для которого наблюдалось отклонение сегрегации 0.7 : 2 : 1.3 в пользу аллеля из *S. pimpinellifolium*.

Использованные маркеры SSR образовали два кластера в хромосоме 2 (рис. 2). Маркерные гены *wv* и *d* наследовались тесно с маркерами SSR26 и SSR32, которые являются анкерными для хромо-

Таблица 4. Частота рекомбинации между некоторыми маркерами у межвидовых гибридов томатов

Комбинация	Число растений F <sub>2</sub>	Фенотипические классы F <sub>2</sub>				$\chi^2$ (9 : 3 : 3 : 1)	Частота рекомбинации (rf), %
		XD	Xd	xD	xd		
<i>S. lycopersicum</i> (Mo938) × × <i>S. pimpinellifolium</i>	3212	XD	Xd	xD	xd	2.71	<i>aw-d</i>
		1822	573	598	219		48.0
		XWv	Xwv	xWv	xwv	0.20	<i>aw-wv</i>
		1810	587	609	206		49.0
		WvD	Wvd	wvD	wvd	606.7	<i>wv-d</i>
		2049	348	346	469		24.5
	218	XD	Xd	xD	xd	0.46	<i>aw-d</i>
		111	41	46	20		47.2
		XWv	Xwv	xWv	xwv	0.10	<i>aw-wv</i>
		119	33	50	16		48.5
		WvD	Wvd	wvD	wvd	26.03	<i>wv-d</i>
		136	33	21	28		28.8
		XZ	Xz	xZ	xz	1.71	<i>aw-z</i>
		113	39	54	12		>50
		XS	Xs	xS	xs	0.05	<i>aw-s</i>
		118	34	50	16		49.0
		WvS	Wvs	wvS	wvs	3.10	<i>wv-s</i>
		135	34	33	16		40.8

Примечание. Z – TGS0159 для Mo938, z – TGS0159 для *S. pimpinellifolium*; S – TGS0007 для Mo938, s – TGS0007 для *S. pimpinellifolium*.; X – условное обозначение доминантного гена “наличия антоциана”, x – условное обозначение рецессивного гена “отсутствия антоциана”.

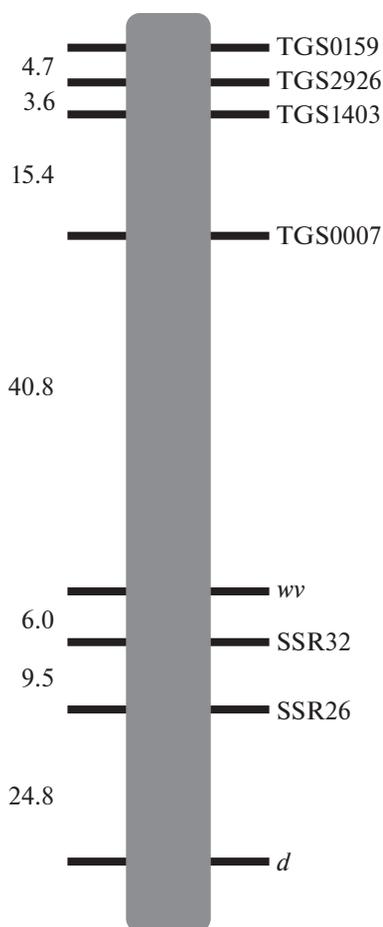
сомы 2 томата и показали свою эффективность при картировании популяций F<sub>2</sub> от скрещивания культурного томата и *S. pimpinellifolium* [17]. Другой кластер состоял из сцепленных маркеров TGS0159, TGS2926, TGS1403 и TGS0007, также специфичных для хромосомы 2 и разработанных при картировании популяции F<sub>2</sub> культурного томата комбинации (Ailsa Craig × Micro-Tom) [16]. Частота кроссинговера между двумя ближайшими маркерами TGS0007 и wv из разных кластеров составляла 40.8%. Ген, детерминирующий признак “отсутствие антоциана” линии Mo938, наследовался относительно всех изученных маркеров хромосомы 2 независимо и с частотами рекомбинации превышающими 47% (табл. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Функциональный тест на аллелизм (табл. 3) и гибридологические исследования (табл. 2) однозначно продемонстрировали, что у имеющих разное происхождение линий культурного томата Mo500 и Mo504 (табл. 1) признак “отсутствие антоциана” контролируется геном *aw*, ожидаемо ло-

кализованным относительно гена *d* в хромосоме 2. При этом ген “отсутствия антоциана” линии Mo938 не является аллелем гена *aw*, как у Mo500 и Mo504, и аллелем *aa*, как у Mo755. Хромосома 2 томата наряду с локусами *Aw:aw* и *Aa:aa* содержит также локус *Are:are*, приводящий в гомозиготном рецессивном состоянии к проявлению у растений признака “отсутствие антоциана” [11, 12]. По данным генетической карты частота рекомбинации между генами *d* и *wv*, с одной стороны, и геном *are*, с другой стороны, ожидается от 9 до 20%, что примерно в 2–5 раз меньше, чем наблюдается в эксперименте при использовании Mo938 (табл. 2). В то же время только на основании результатов функционального теста и характера наследования фенотипических маркеров нельзя исключить версию участия генов хромосомы 2 в формировании признака “отсутствие антоциана” у линии Mo938.

Результаты гибридологических исследований (табл. 2) полностью не исключали гипотезу об инверсии участка хромосомы 2 линии томата Mo938 с геном *d* и геном “отсутствия антоциана”, которым вместо *aw* мог быть *are*. Гетерозиготность по



**Рис. 2.** Расположение маркерных генов и маркеров SSR в хромосоме 2 линии Mo938, основанное на анализе растений F<sub>2</sub> межвидовых гибридов комбинации (Mo938 × *S. pimpinellifolium*). Обозначение маркеров представлено справа, слева указана частота рекомбинации (в %) между соседними маркерами.

инверсии сопровождается возникновением инверсионных петель, в пределах которых может увеличиваться частота кроссинговеров, детектируемых цитологическими методами [22]. В бивалентах протяженные инверсионные петли могут быть заметны в световой микроскоп на стадии пахитены и диакинеза [22, 23]. В то же время если инверсионные петли незначительны по размерам, то они могут быть обнаружены только с использованием электронной микроскопии [24] или предсказаны, например, по “мостам” между расходящимися гомологами на стадии анафазы I [25]. Кроссинговеры в инверсионных петлях любого размера должны приводить к формированию гамет с дицентрическими и ацентрическими хромосомами [25]. Отсутствие у бивалента 2 гибридов (Марглоб × Mo938) видимых в световой микроскоп инверсионных петель в пахитене и в диакинезе (рис. 1) свидетельствовало против наличия значительной по размеру инверсии участка

хромосомы 2 у линии Mo938. Сравнительно высокий уровень фертильной пыльцы у всех гибридов культурного томата свидетельствовал против повышенного количества несбалансированных гамет у гибридов (Марглоб × Mo938), чего неминуемо следовало бы ожидать в случае возникновения кроссинговеров с аномально высокой частотой в инверсионной петле между *d* и геном “отсутствия антоциана” линии Mo938. Наконец, кроссинговеры в инверсионной петле должны были приводить к полному отсутствию среди потомства гибридов (Марглоб × Mo938) рекомбинантов между *d* и геном “отсутствия антоциана”, что противоречит экспериментальным данным, свидетельствующим об обратном (табл. 2). В целом совокупность объективных данных цитологического и генетического анализов опровергает гипотезу об обусловленном инверсией измененном порядке маркерных генов в хромосоме 2 линии томата Mo938.

Несколько сниженная в сравнении с генетической картой (табл. 2) частота рекомбинации между генами *wv* и *d* у гибридов культурного томата (Марглоб × Mo938), возможно, была вызвана общим уменьшением числа хиазм в биваленте 2, в сравнении с гибридами (Марглоб × Mo504).

Уровень фертильной пыльцы у межвидовых гибридов (Mo938 × *S. pimpinellifolium*) был примерно в 2.3–2.4 раза ниже, чем у межлинейных гибридов. Эти различия, однако, не привели к нарушению сегрегации изученных фенотипических маркеров среди потомства межвидовых гибридов. Следовательно, понижение уровня фертильности межвидовых гибридов не сопровождалось негативными взаимодействиями между хромосомами разных видов томатов, несущими маркерные гены. Одновременно характер сегрегации и частоты рекомбинации между геном “отсутствия антоциана” и генами *d* или *wv* однозначно свидетельствовали об их независимом наследовании, в отличие от гибридов культурного томата (Марглоб × Mo938) (табл. 2). Молекулярное генотипирование потомства межвидовых гибридов с помощью маркеров SSR, распределенных вдоль всей хромосомы 2, значительно прояснило ситуацию. Анкерные маркеры SSR32 и SSR26, расположенные на значительном расстоянии от центромеры [17], имели ожидаемое взаимное расположение [18], а характер их сцепления с *wv* и *d* однозначно подтверждал расположение последних в хромосоме 2 (рис. 2). Порядок взаимного расположения ДНК-маркеров TGS в хромосоме 2 отличался от выявленного ранее у межлинейных гибридов культурного томата комбинации (Ailsa Craig × Micro-Tom) [16] главным образом инвертированным расположением TGS0159 и TGS2926 (рис. 2), но в целом позволял уверенно контролировать характер наследования генов вблизи центромеры.

Ген “отсутствия антоциана” линии Мо938 наследовался независимо относительно всех маркеров TGS, включая расположенный на краю кластера TGS0159, что предполагает его отсутствие на этом участке хромосомы 2 (табл. 4). Частота кроссинговера между двумя соседними маркерами из двух кластеров составляла 40.8% и не исключала их независимое наследование, однако одновременно не предполагала нахождения на участке между TGS0007 и *wv* гена “отсутствия антоциана” линии Мо938, поскольку он относительно TGS0007 и *wv* имел частоты рекомбинации, превышающие 48.5% (табл. 4).

Ген *d* расположен в длинном плече хромосомы 2, практически на самом конце противоположного от центромеры участка [11, 12, 21], поэтому независимое наследование относительно него гена “отсутствия антоциана” линии Мо938 не предполагает локализации последнего в части длинного плеча, наиболее удаленного от центромеры (рис. 2, табл. 4).

В целом совокупность полученных результатов свидетельствует, что ген “отсутствия антоциана” линии Мо938 расположен вне хромосомы 2 томата. Аналогичные по фенотипическому проявлению мутации также локализованы в хромосомах 3, 5, 8, 9, 10 и 11 томата [11, 12] и могут быть кандидатами, детерминирующими признак “отсутствия антоциана” у линии Мо938. Однако локализация этого гена практической значимости не представляет, поскольку для гибридологических исследований генетической изменчивости в хромосоме 2 возможно использовать и другие известные линии томата: LA0790, которая по данным Центра генетических ресурсов томата (США) также несет маркерные гены *aw*, *d* и *wv* (<http://tgrc.ucdavis.edu>), либо Мо755 с генами *aa*, *d* и *wv* [11, 12].

Нарушение независимой сегрегации гена “отсутствия антоциана” линии Мо938 относительно маркеров *wv* и *d* хромосомы 2 в потомстве линейных гибридов томата (табл. 2) можно отнести к эффектам “квази-сцепления”, или ложного сцепления. Ранее были получены экспериментальные данные по “квази-сцеплению” генов *aw* и *d* хромосомы 2 с маркерами *m-2* и *c* хромосомы 6, генов *wt* хромосомы 5 и гена *j* хромосомы 11 [2]. Частоты рекомбинации в большинстве случаев составляли  $rf_{aw-m-2} = 25-40\%$  и  $rf_{d-m-2} = 30-45\%$ , хотя изредка наблюдали увеличение до 60% по обоим парам, а для  $rf_{wt-j} = 29-37.9\%$  [2, 26]. Причины “квази-сцепления” генов негомологичных хромосом не ясны, хотя выдвигаются гипотезы, что они являются следствием “сродства” центромер и/или результатом дифференциальной жизнеспособности зигот [2, 27].

Таким образом, линия культурного томата Мо938 несет три маркерных гена: *d*, *wv* и ген “отсутствия антоциана”. Гены *d* и *wv* находятся в

хромосоме 2 с ожидаемой локализацией по генетической карте. Ген “отсутствия антоциана” не является аллелем генов *aw* или *aa* и не принадлежит хромосоме 2.

Работа выполнена при поддержке средств государственного задания № 0574-2015-0005 (государственная регистрация № АААА-А17-117082950008-7).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mézard C., Vignard J., Drouaud J., Mercier R. The road to crossovers: plants have their say // Trends Genet. 2007. V. 23. № 2. P. 91–99. doi 10.1016/j.tig.2006.12.007
2. Жученко А.А., Король А.Б. Рекомбинация в эволюции и селекции. М.: Наука, 1985. С. 117–125.
3. Жученко А.А. Генетика томатов. Кишинев: Штиинца, 1973. 664 с.
4. Shirasawa K., Hirakawa H. DNA marker applications to molecular genetics and genomics in tomato // Breed. Sci. 2013. V. 63. № 1. P. 21–30. doi 10.1270/jsbbs.63.21
5. Rick C.M. Tomato, *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) // Evolution of Crop Plants / Eds Smartt J., Simmonds N.W. London: Longman, 1995. P. 452–457.
6. Foolad M.R. Genome mapping and molecular breeding of tomato // Int. J. Plant Genomics. 2007. V. 2007. Article ID 64358. doi 10.1155/2007/64358
7. Стрельникова С.П. Оценка частоты хиазм у диких видов, мутантных форм и гибридов F1 томата: Дис. ... канд. биол. наук. М.: МСХА, 2001. 123 с.
8. Комахин Р.А., Комахина В.В., Милюкова Н.А. и др. Трансгенные растения томата, экспрессирующие гены *recA* и *NLS-recA-licBM3*, как модель для изучения мейотической рекомбинации // Генетика. 2010. Т. 46. № 12. С. 1635–1644.
9. Комахин Р.А., Комахина В.В., Милюкова Н.А., Жученко А.А. Анализ частоты мейотической рекомбинации у трансгенных гибридов томата, экспрессирующих гены *recA* и *NLS-recA-licBM3* // Генетика. 2012. Т. 48. № 1. С. 30–39.
10. Жученко А.А., Король А.Б., Визир И.Ю. и др. Половые различия по частоте кроссинговера у томата и арабидопсиса // Генетика. 1988. Т. 24. № 9. С. 1593–1601.
11. Бочарникова Н.И., Козлова В.М. Мутантные формы томатов. Кишинев: Штиинца, 1992. 62 с.
12. Бочарникова Н.И. Генетическая коллекция мутантных форм томата и ее использование в селекционно-генетических исследованиях. М.: ВНИИСОК, 2011. 120 с.
13. Орлова Н.Н. Генетический анализ. М.: Изд-во МГУ, 1991. 316 с.
14. Lorieux M. MapDisto: fast and efficient computation of genetic linkage maps // Mol. Breed. 2012. V. 30. № 2. P. 1231–1235. doi 10.1007/s11032-012-9706-y
15. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. P. 4321–4325. doi 10.1093/nar/8.19.4321
16. Shirasawa K., Isobe S., Hirakawa H. et al. SNP discovery and linkage map construction in cultivated tomato // DNA Res. 2010. № 6. P. 381–391. doi 10.1093/dnares/dsq024

17. Frary A., Xu Y., Liu J. et al. Development of a set of PCR-based anchor markers encompassing the tomato genome and evaluation of their usefulness for genetics and breeding experiments // *Theor. Appl. Genet.* 2005. V. 111. № 2. P. 291–312. doi 10.1007/s00122-005-2023-7
18. Liu Y., Zhou T., Ge H. et al. SSR mapping of QTLs conferring cold tolerance in an interspecific cross of tomato // *Int. J. Genomics.* 2016. V. 2016. Article ID 3219276. doi 10.1155/2016/3219276
19. Грату В.Г., Грату М.И. Анализ пахитенных хромосом у трех видов томатов // *Цитология.* 1980. Т. 27. № 8. С. 933–939.
20. Ячевская Г.Л., Иванова С.В., Наумов А.А. Особенности мейоза при отдаленной гибридизации. М.: МСХА, 1990. 80 с.
21. Tanksley S.D., Ganai M.W., Prince J.P. et al. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes // *Genetics.* 1992. V. 132. № 4. P. 1141–1160.
22. Torgasheva A.A., Rubtsov N.B., Borodin P.M. Recombination and synaptic adjustment in oocytes of mice heterozygous for a large paracentric inversion // *Chromosome Res.* 2013. V. 21. № 1. P. 37–48. doi 10.1007/s10577-012-9336-6
23. Koehler K.E., Millie E.A., Cherry J.P. et al. Meiotic exchange and segregation in female mice heterozygous for paracentric inversions // *Genetics.* 2004. V. 166. № 3. P. 1199–1214. doi 10.1534/genetics.166.3.1199
24. Anderson L.K., Covey P.A., Larsen L.R. et al. Structural differences in chromosomes distinguish species in the tomato clade // *Cytogenet. Genome Res.* 2010. V. 129. № 1–3. P. 24–34. doi 10.1159/000313850
25. Gorlov I.P., Borodin P.M. Recombination in single and double heterozygotes for two partially overlapping inversions in chromosome 1 of the house mouse // *Heredity.* V. 75. № 2. P. 113–125. doi 10.1038/hdy.1995.114
26. Folge H.W., Currence T.M. Inheritance of fruit weight and earliness in tomato cross // *Genetics.* 1950. V. 35. № 3. P. 363–380.
27. Peng J., Korol A.B., Fahima T. et al. Molecular genetic maps in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*: genome-wide coverage, massive negative interference, and putative quasi-linkage // *Genome Res.* 2000. V. 10. № 10. P. 1509–1531.

## Genetic Features of the Marker Line Tomato Mo938

R. A. Komakhin<sup>a, \*</sup>, S. R. Strelnikova<sup>a</sup>, and A. A. Zhuchenko<sup>a, †</sup>

<sup>a</sup>All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, 127550 Russia

\*e-mail: recombination@iab.ac.ru

In the (Marglobe × Mo938) cultivated tomato hybrids “lack of anthocyanin” gene shows linked inheritance with *d* (*dwarf*) gene on chromosome 2, but with a recombination frequency approximately 3 times higher than in the genetic map and in other hybrids with the Marglobe line. Cytological analysis of the mother pollen cells of (Marglobe × Mo938) hybrids revealed no abnormalities of meiotic division and segregation of chromosomes, as well as no decrease in fertility. By means of the functional allelism test it was established that unlike Mo500, Mo504 and Mo755 marker tomato lines, in Mo938 the feature “lack of anthocyanin” is not determined by *aw* (without anthocyanin) or *aa* (anthocyanin absent) genes of chromosome 2. Using the F<sub>2</sub> progeny of (Mo938 × *Solanum pimpinellifolium*) interspecies hybrids independent inheritance of “lack of anthocyanin” gene relative to the *wv* (white virescent) and *d* marker genes, as well as to six SSR anchor markers distributed at different sites of chromosome 2, was established. Thus, the Mo938 tomato line carries the markers *d* and *wv* in chromosome 2, as well as the “lack of anthocyanin” gene not belonging to chromosome 2.

**Keywords:** tomato, *Solanum lycopersicum*, *Solanum pimpinellifolium*, hybrids, genetic map, gene, SSR, recombination.