

НАСЛЕДОВАНИЕ МАРКЕРНЫХ ГЕНОВ В ПОТОМСТВЕ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ТОМАТОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *recA* *Escherichia coli*

© 2019 г. Р. А. Комахин^{1, *}, Н. А. Милюкова², С. Р. Стрельникова¹,
А. А. Криницына^{1, 3}, В. В. Комахина¹, [А. А. Жученко]¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550 Россия

²Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, 127550 Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра высших растений, Москва, 119234 Россия

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

Поступила в редакцию 12.04.2018 г.

После доработки 11.10.2018 г.

Принята к публикации 30.10.2018 г.

У межвидовых гибридов снижение частоты генетических обменов между хромосомами из разных видов и негативные взаимодействия между функционально несовместимыми локусами ограничивают генетическую изменчивость среди потомства. Ранее в потомстве линейных гибридов культурного томата *Solanum lycopersicum* с экспрессией гена *recA* *Escherichia coli* была повышена доля кроссоверных генотипов. В настоящей работе для изучения влияния экспрессии гена *recA* на частоту возникновения кроссоверов в потомстве межвидовых гибридов были получены трансгенные гибриды между *S. lycopersicum* и некоторыми дикорастущими видами томатов. У межвидовых гибридов обнаружены негативные взаимодействия между локусами культурного томата и видов *S. cheesmaniae*, *S. pimpinellifolium* и *S. habrochaites*, в последнем случае приводящие к полулетальному некрозу. Экспрессия гена *recA* у межвидовых гибридов с *S. cheesmaniae* частично компенсирует среди потомства F₂ дефицит рецессивных генотипов в локусе *Wv:wv* хромосомы 2. В целом кроссоверных генотипов в потомстве F₂ было больше у межвидовых трансгенных гибридов, чем у нетрансгенных гибридов аналогичной комбинации скрещивания, однако меньше, чем у линейных гибридов *S. lycopersicum*.

Ключевые слова: томаты, *Solanum*, межвидовые гибриды, трансгенные растения, *recA*, рекомбинация, кроссинговер.

DOI: 10.1134/S0016675819040064

Доместикация и селекция культурного томата *Solanum lycopersicum* исчерпали большую часть его биологического разнообразия, полученного от предковой формы *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* [1]. Девять дикорастущих видов томатов скрещиваются с культурным томатом и могут быть донорами нового аллельного разнообразия [2]. У значительного числа межвидовых гибридов культурного и дикорастущих видов томатов не обнаружено существенных нарушений синапсиса гомеологов и их сегрегации в мейозе [3]. Однако отмечено подавление кроссинговера, необходимого для формирования в потомстве рекомбинантов с кроссоверными хромосомами [3–6], и негативные взаимодействия Добжанского–Мюллера (“Dobzhansky–Muller” incompatibilities) между функционально несовместимыми локусами из разных видов, ограничивающие фертильность и приводящие к отклонениям в наследовании маркерных аллелей среди потомства [3, 7]. Несмотря на это, кроссинговер между гомеологами является единственным эффективным и регулярным

механизмом интрогрессии отдельных локусов из генома дикорастущих видов в хромосомы культурного томата.

Для запуска мейотического кроссинговера клетки по всему геному создают двухцепочечные разрывы (ДЦР) ДНК, при репарации которых 3'-концы одноцепочечной ДНК используются ДНК-зависимыми рекомбиназами Rad51 и Dmc1 для поиска гомологичной двухцепочечной ДНК [8]. У стерильных нокаут-мутантов *rad51-1* арабидопсиса хромосомы не достигают полного синапсиса во время профазы I и фрагментированы уже на стадии диакинеза, свидетельствуя об участии Rad51 в репарации ДЦР с использованием сестринской хроматиды в качестве матрицы [9]. Нокаут-мутация гена *DMC1* у арабидопсиса нарушает формирование бивалентов в мейозе, но не приводит к фрагментации хромосом, предполагая участие Dmc1 в репарации ДЦР с использованием гомологичной хромосомы в качестве матрицы [10]. Считают, что белок Dmc1 обеспечивает межго-

мологичную репарацию ДЦР путем задержки их межсестринской репарации [11], и в этом процессе белок Rad51 выполняет поддерживающую роль без использования своей каталитической рекомбиназной активности [12]. Эти результаты предполагают, что частота и распределение кроссинговеров могут зависеть от наличия и соотношения в клетке различных белков с рекомбиназной активностью.

Экспрессия гена бактериальной рекомбиназы *recA Escherichia coli* в растениях табака *Nicotiana tabacum* в 3 раза повышала в соматических клетках количество ДЦР, восстановленных по механизму гомологичной рекомбинации, и более чем в 2 раза увеличивала число сестринских хроматидных обменов [13, 14]. В наших исследованиях у линейных гибридов культурного томата экспрессия гена *recA E. coli* в 1.5 раза повышала частоту мейотического кроссинговера между маркерными генами *wv* и *d* хромосомы 2 [15–17].

Известен альтернативный путь индукции мейотического кроссинговера за счет подавления системы миссмэтч-репарации (ММР) ДНК. У межвидовых гибридов дрожжей мутация гена миссмэтч-репарации *Msh2* приводит к повышению жизнеспособности спор [18], а у растений арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) — к повышению мейотического кроссинговера между фенотипическими маркерами хромосомы 5 с 6.31 до 8.81% [19]. К сожалению, из-за различий в основном числе хромосом у *Arabidopsis* и его родственных видов затруднительно оценить, как влияет супрессия гена *MSH2* на кроссинговер между гомеологами. Частичное подавление экспрессии генов ММР у интрогрессивной линии культурного томата позволило умеренно (до 1.3 раза) повысить рекомбинацию между восьмыми хромосомами *S. lycopersicum* и *S. lycopersicoides* [20].

Цель данного исследования состояла в оценке влияния экспрессии гена *recA E. coli* у межвидовых гибридов культурного томата на частоту возникновения кроссоверов в их потомстве.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали растения культурного томата (*S. lycopersicum*), экспрессирующие ген *recA E. coli* и содержащие сцепленные маркерные гены *wv* (*white virescent*) и *d* (*dwarf*) хромосомы 2, а также ген “отсутствие антоциана”, локализованный вне хромосомы 2 [16, 17, 21]. Для получения межвидовых гибридов в качестве опылителей использовали растения дикорастущих томатов *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, *Solanum cheesmaniae*, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum habrochaites* и *S. habrochaites* var. *glabratum* (табл. 1). Гибриды F₁ создавали и выращивали при естественном освещении в теплице в г. Москва (Россия). Статисти-

ческая оценка по критерию хи-квадрат (χ^2) и расчет частоты рекомбинации (rf) методом наибольшего правдоподобия выполнены в соответствии с рекомендациями [22]. Для анализа потомства использовали популяции растений F₂ (совокупность семян одного плода) со всхожестью семян не менее 90%, которые выращивали в течение месяца при освещенности 15–20 клк, температуре 24°C и фотопериоде 16/8 ч.

Выделение ДНК и РНК, получение полноразмерных последовательностей кДНК и молекулярно-биологический анализ наследования гена *recA* выполняли в соответствии с опубликованными ранее результатами [16, 17]. Количественное содержание мРНК гена *recA* с нормализацией относительно гена актина (U60482) томатов определяли при помощи полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Для каждого гена получение кДНК и ПЦР-РВ проводили последовательно в одной реакционной смеси. Для этого в 2.5× реакционную смесь для ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green I (Синтол, Россия) добавляли праймеры, комплементарные участку гена актина (Fwd-act 5'-ttg tgc tgg act ctg gag at-3' и Rev-act 5'-tgg gag ggc ata acc ttc a-3') или участку гена *recA* (EcRecA+ 5'-gtt cca tgg atg tgg aaa cc-3' и EcRecA– 5'-ata tcg acg ccc agt tta cg-3'), суммарную РНК в качестве матрицы и ревертазу MMLV-RT (Синтол, Россия). Температурный профиль реакции: 45°C – 900 с; 95°C – 300 с; 50 циклов: 95°C – 15 с, 60°C – 40 с. Специфичность амплификации с использованием пар праймеров проверяли электрофорезом в 1.5%-ном агарозном геле, принимая образование одного ампликона в качестве ее критерия. Уровень флуоресценции регистрировали в конце каждого цикла с использованием амплификатора CFX96 Touch Real Time System (Bio-Rad, USA). Нормализацию результатов ПЦР-РВ выполняли с использованием программы qgene-96 [23]. Измерения повторяли 5 раз в 3-кратной повторности с использованием молодых листьев растений размером 3.5 ± 0.5 см.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Создание межвидовых трансгенных гибридов томатов, экспрессирующих ген recA E. coli

Ранее нами были созданы трансгенные гибриды культурного томата комбинации (Mo938 × Марглоб), экспрессирующие ген *recA E. coli* под контролем вирусного промотора CaMV35S с инсерцией Т-ДНК в одном локусе генома, который наследуется независимо от маркерных генов *wv* и *d* хромосомы 2 и гена “отсутствие антоциана” [16, 17, 21]. Среди поколения F₃ от самоопыления гибридов отобрали независимые по происхождению гомозиготные в отношении гена *recA*, маркерных рецессивных генов *wv*, *d* и “отсутствие

Таблица 1. Генотипы линий томатов

Линия		Генотип	Хромосома, локус	Страна происхождения
<i>S. lycopersicum</i>	RecA	wv – верхние листья желтые d – растения карликовые, без антоциановой окраски Экспрессия гена <i>recA E. coli</i>	2, 41 2, 70	Россия
	—	wv – верхние листья желтые d – растения карликовые Без антоциановой окраски	2, 41 2, 70	
	Марглоб	Wv – все листья зеленые D – высокие растения Антоциановая окраска	2, 41 2, 70	
	Мо938 [18]	wv – верхние листья желтые d – растения карликовые Без антоциановой окраски	2, 41 2, 70	Молдова
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	—	Wv – все листья зеленые D – высокие растения Антоциановая окраска	2, 41 2, 70	Молдова
<i>Solanum pimpinellifolium</i>	0722			
<i>Solanum habrochaites</i> var. <i>glabratum</i>	15914			
<i>Solanum habrochaites</i>	CGN 15878			Голландия
<i>Solanum cheesmaniae</i>	CGN 15820	Wv – все листья зеленые D – высокие растения Антоциановая окраска Красные плоды	2, 41 2, 70	

антоциана” растения № 6/1 и 17/6. Для контроля выбрали нетрансгенные растения из популяции 6/1 с аналогичными рецессивными маркерами. Опылением трансгенных и нетрансгенных растений культурного томата пыльцой томатов *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, *S. cheesmaniae*, *S. pimpinellifolium*, *S. habrochaites* и *S. habrochaites* var. *glabratum* получили межвидовые гибриды с ожидаемым маркерным фенотипом дикорастущего вида-опылителя. В отличие от остальных комбинаций скрещиваний, у гибридов с *S. habrochaites* var. *glabratum* через 3–4 нед. после прорастания обнаружили замедление роста и постепенное усыхание листьев и стеблей, а гибридные семена с *S. habrochaites* прорастали и некротизировались в плодах.

Для одновременного сравнительного анализа также создали межлинейные гибриды культурного томата комбинации (Мо938 × Марглоб), содержащие в гетерозиготном состоянии те же маркерные гены, что и межвидовые гибриды.

Молекулярно-биологический анализ ДНК гибридов, созданных на основе трансгенных растений культурного томата, подтвердил наличие в их геноме последовательности гена *recA* и присут-

ствие в клетках его полноразмерной мРНК ожидаемого размера около 1000 пн (данные не представлены). Для сравнения уровней экспрессии изучили содержание мРНК гена *recA* относительно мРНК референсного гена актина томата с использованием ПЦР в реальном времени (рис. 1).

Экспрессия гена *recA* не превышала 0.10 от уровня экспрессии гена актина (рис. 1). В родительских растениях экспрессия целевого гена была выше, чем в гибридах, вероятно, из-за их гомозиготности по отношению к гену *recA*. Среди гибридов с *S. pimpinellifolium* на основе растения культурного томата № 6/1 отмечены наиболее низкие значения экспрессии, сравнительно более высокие у гибридов на основе растения № 17/6.

В целом у межвидовых гибридов фертильность пыльцы составляла от 34 до 74% и была достоверно ниже, чем у линейных гибридов культурного томата (93%) и у исходных родительских форм (92–98%). Межвидовые гибриды с *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* и с *S. cheesmaniae* демонстрировали от 69 до 74% фертильной пыльцы и не различались. Уровень фертильной пыльцы у трансгенных гибридов с *S. pimpinellifolium* составлял $53 \pm 4\%$ и был достоверно выше, чем у их контрольных ана-

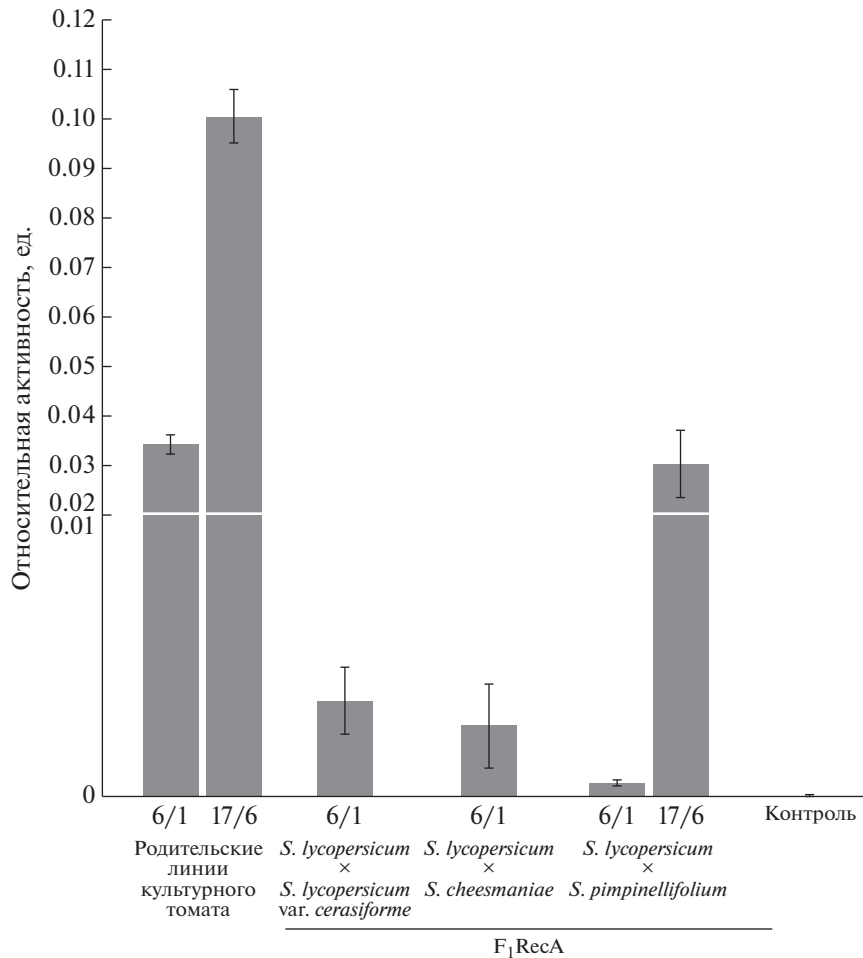


Рис. 1. Уровни экспрессии гена *recA* в листьях растений томатов по результатам ПЦР в реальном времени (нормализовано относительно экспрессии гена актина томата). Представлены средние значения для четырех гибридов (*S. lycopersicum* × *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*), пяти гибридов (*S. lycopersicum* × *S. cheesmaniae*) и четырех гибридов (*S. lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*), полученных на основе линии культурного томата № 6/1. Значения для гибридов (*S. lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*) на основе линии № 17/6 рассчитаны на основе шести гибридов. Контроль — нетрансгенные гибриды (*S. lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*). Планки погрешностей соответствуют стандартным ошибкам.

логов — $34 \pm 4\%$. У гибридов этой комбинации скрещиваний фертильность была достоверно ниже, чем у остальных межвидовых гибридов.

Наследование аллелей маркерных локусов и гена *recA* в потомстве гибридов

В потомстве пяти линейных гибридов культурного томата (Мо938 × Марглоб) все 17 проанализированных популяций F_2 демонстрировали менделевскую сегрегацию аллелей в трех маркерных локусах — *Wv:wv*, *D:d* и “наличие:отсутствие антоциана”. Доли рецессивных гомозиготных генотипов по всем проанализированным локусам среди потомства были близки к теоретически ожидаемому 0.25 и составили от 0.24 до 0.26 (табл. 2). Аналогичную картину наблюдали в потомстве всех гибридов с *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (табл. 2).

В восьми из тридцати одной популяции F_2 от трансгенных гибридов с *S. cheesmaniae* отмечено нарушение наследования аллелей в локусах *Wv:wv* и *D:d* (рис. 2, табл. 2). В частности, в сравнении с ожидаемым было меньше рецессивных генотипов (*wwvv* — 0.21 и *dd* — 0.22), которых, несмотря на это, было достоверно больше, чем в потомстве контрольных гибридов (*wwvv* — 0.12, *dd* — 0.16). В потомстве контрольных гибридов только в четырех из семнадцати популяций F_2 наблюдали менделевское наследование всех маркеров.

Несмотря на то, что семена F_2 получили со всех гибридов с *S. pimpinellifolium*, пригодным для анализа оказалось потомство только четырех трансгенных и контрольных гибридов, поскольку в остальном преобладали немногочисленные популяции с низким содержанием семян. В тридцати четырех из сорока трех популяций от трансгенных

Таблица 2. Доли рецессивных генотипов в потомстве различных гибридов томатов

Гибрид F ₁			Доля рецессивных генотипов			Число растений F ₂
			wwwv	dd	“отсутствие антоциана”	
<i>S. lycopersicum</i> × × <i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	RecA	1	0.24 ± 0.03	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01	519
		2	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.26 ± 0.02	664
		3	0.24 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.22 ± 0.02	426
		4	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.24 ± 0.02	670
		Среднее	0.23	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01	2279
	Контроль	1	0.24 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.25 ± 0.01	594
		2	0.28 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.26 ± 0.03	366
		3	0.25 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.28 ± 0.02	581
		Среднее	0.26 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.26 ± 0.01	1541
<i>S. lycopersicum</i> × × <i>S. cheesmaniae</i>	RecA	1	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.26 ± 0.01	640
		2	0.20 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.30 ± 0.01	719
		3	0.18 ± 0.04	0.20 ± 0.02	0.31 ± 0.02	700
		4	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.24 ± 0.02	688
		5	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.26 ± 0.03	434
		Среднее	0.21 ± 0.01*	0.22 ± 0.01*	0.27 ± 0.01	3181
	Контроль	1	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.25 ± 0.02	467
		2	0.10 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.33 ± 0.01	510
		3	0.09 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.25 ± 0.01	820
		4	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.27 ± 0.01	357
		Среднее	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.28 ± 0.02	2154
<i>S. lycopersicum</i> × × <i>S. pimpinellifolium</i>	RecA	1	0.25 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.22 ± 0.02	939
		2**	0.23 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.13 ± 0.01	998
		3**	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.06	0.13 ± 0.01	892
		4**	0.24 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.15 ± 0.01	833
		Среднее	0.24 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.16 ± 0.02*	3660
	Контроль	1	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.01	1053
		2	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.23 ± 0.01	1004
		3	0.24 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.25 ± 0.02	612
		4	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.24 ± 0.01	817
		Среднее	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.24 ± 0.01	3486
<i>S. lycopersicum</i> × × <i>S. lycopersicum</i>	—	1	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.01	523
		2	0.22 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.01	423
		3	0.28 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.01	316
		4	0.25 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.30 ± 0.01	230
		5	0.25 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.01	355
		Среднее	0.25 ± 0.01	0.24	0.26 ± 0.01	1847

* Здесь и далее значения у трансгенных гибридов, существенно отличающиеся от их контроля при $p \leq 0.05$.

** Здесь и в табл. 4 гибриды получены на основе трансгенной линии культурного томата № 17/6, оставшийся трансгенный гибрид на основе линии № 6/1.

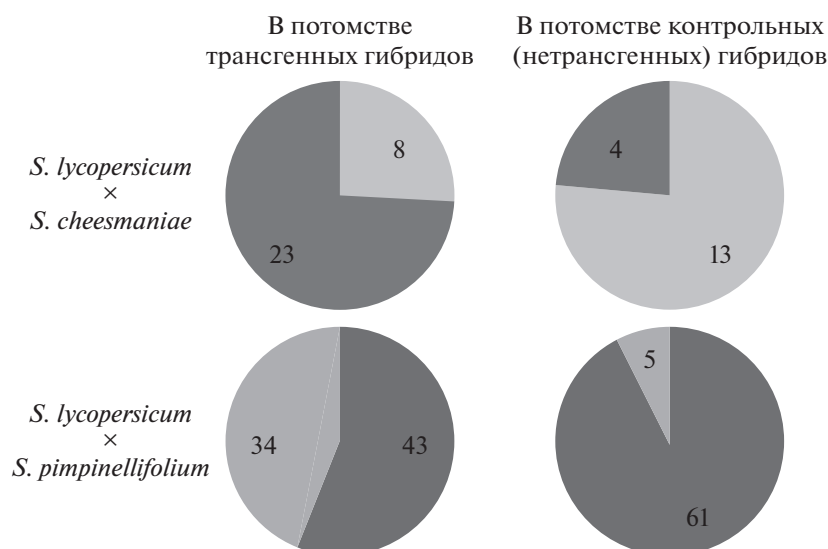


Рис. 2. Количество популяций F_2 в потомстве гибридов *S. cheesmaniae* и *S. pimpinellifolium* с менделевским наследованием маркерных генов во всех трех локусах (темно-серый фон) и с отклонением сегрегации хотя бы в одном локусе (светло-серый фон). Цифрами указано количество проанализированных популяций.

гибридов было нарушено наследование маркерных аллелей, прежде всего за счет достоверного уменьшения доли рецессивных гомозигот “отсутствие антоциана” (рис. 2, табл. 2). Практически двукратное снижение этих долей наблюдалось только у гибридов на основе растения культурного томата № 17/6. В потомстве гибридов с трансгенным растением № 6/1 и в потомстве контрольных гибридов доли всех рецессивных гомозиготных генотипов не различались и не отличались от аналогичных долей среди потомства линейных гибридов томата.

Для выявления взаимосвязи между характером сегрегации в локусе *Wv:wv* среди потомства гибридов с *S. cheesmaniae* и их трансгенным статусом сравнили наследование гена *recA* внутри совокупности растений F_2 с рецессивным фенотипом *wv/wv* от всех трех комбинаций межвидовых гибридов (табл. 3).

Установлено, что в потомстве гибридов с *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* и с *S. pimpinellifolium*, как

и ранее в потомстве линейных гибридов томата [17], ген *recA* наследуется моногенно, поскольку три четверти растений были трансгенными и одна четверть нетрансгенной (табл. 3). В потомстве гибридов с *S. cheesmaniae* среди рецессивных генотипов *wv/wv* из популяций с моногенной сегрегацией в локусе *Wv:wv* доли трансгенных и нетрансгенных генотипов оказались равны. В популяциях с пониженным содержанием рецессивных генотипов *wv/wv* доля трансгенных растений оказалось в 2 раза выше, чем нетрансгенных.

Аналогично изучили наследование гена *recA* в потомстве трех трансгенных гибридов с *S. pimpinellifolium*, созданных на основе линии культурного томата № 17/6, в потомстве которых обнаружили уменьшение частоты передачи аллеля “отсутствие антоциана”. В целом оказалось, что из 182 потомков только 104 были трансгенными, что примерно на четверть ниже ожидаемого уровня.

Таблица 3. Наследование гена *recA* *E. coli* среди растений F_2 с рецессивным фенотипом *wv/wv*

Гибрид F_1	Сегрегация <i>Wv:wv</i> (3 : 1)	Число растений фенотипа <i>wv/wv</i>			χ^2 (3 : 1)
		<i>recA</i> (+)	<i>recA</i> (–)	всего	
<i>S. lycopersicum</i> × <i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	Да	51	17	68	0
<i>S. lycopersicum</i> × <i>S. cheesmaniae</i>	Да	37	37	74	24.66
	Нет	16	9	25	1.61
<i>S. lycopersicum</i> (линия 6/1) × <i>S. pimpinellifolium</i>	Да	37	17	54	1.21

Примечание. *recA* (+) — трансгенные или *recA* (–) нетрансгенные растения. Для $p \leq 0.05$ и $d.f. = 1$ критическое значение $\chi^2 = 3.84$.

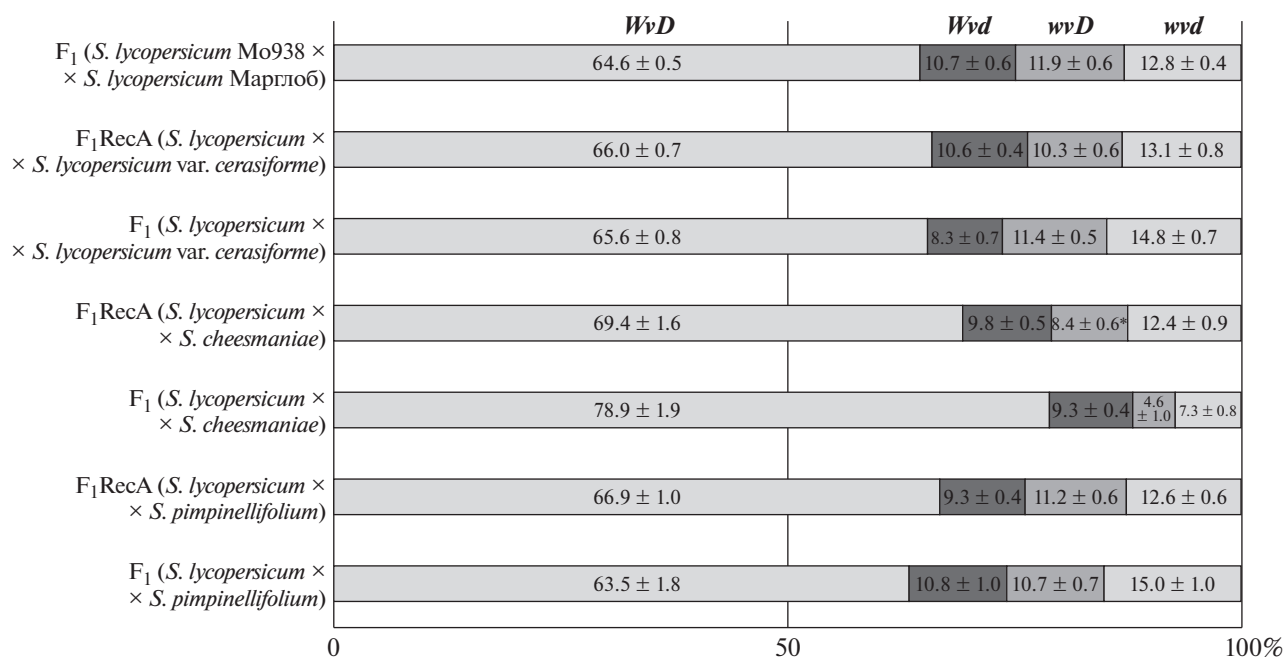


Рис. 3. Фенотипическая структура популяций F₂ на участке *wv-d* хромосомы 2 в потомстве различных гибридов томатов. *WvD* и *wvd* — нерекомбинантные, а *Wvd* и *wvD* — рекомбинантные фенотипические классы. Трансгенные гибриды обозначены как RecA.

Фенотипическая структура популяций в потомстве гибридов

Анализ наследования отдельных маркерных аллелей не дает представления о кроссоверном разнообразии среди потомства гибридов. Поэтому был определен процент кроссоверных фенотипов *Wvd* и *wvD* на участке *wv-d* хромосомы 2 среди всего потомства F₂, независимо от характера сегрегации маркерных аллелей в каждой популяции (рис. 3).

В потомстве межвидовых трансгенных и контрольных гибридов с *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* и с *S. pimpinellifolium* и линейных гибридов культурного томата в совокупности кроссоверных генотипов было от 20 до 23% и различий между вариантами скрещиваний не было. В потомстве трансгенных гибридов с *S. cheesmaniae* в совокупности рекомбинантных генотипов было достоверно меньше (18.2%), чем у потомства линейных гибридов (22.6%), но все же больше, чем у их контрольных межвидовых аналогов (13.8%). В последнем случае сокращения в 1.7–1.8 раза затронули не только кроссоверный *wvD*, но и некроссоверный класс *wvd*.

Частоты кроссинговера между генами *wv* и *d* хромосомы 2

С целью минимизации влияния нарушений сегрегации маркеров среди F₂ от межвидовых гибридов на оценку частот кроссинговера для анализа использовали только популяции с менделев-

ским наследованием маркерных аллелей в локусах *Wv:wv* и *D:d* хромосомы 2 (табл. 4).

У трансгенных гибридов с *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* и с *S. cheesmaniae* частота кроссинговера между генами *wv* и *d* составляла соответственно 24.6 и 22.1% и была выше, чем у их контрольных гибридов: соответственно 22.3 и 21.0%, однако эти различия не были статистически значимыми. У трансгенных и контрольных гибридов с *S. pimpinellifolium* частоты кроссинговера не различались и составляли соответственно 25.7 и 23.0%.

У межвидовых контрольных гибридов частоты кроссинговера были ниже, чем у линейных гибридов культурного томата, — 26.7%. Однако у гибридов с *S. pimpinellifolium* эти различия оказались незначимыми. Трансгенные гибриды с *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* и с *S. cheesmaniae* также демонстрировали более низкие значения частот кроссинговера, чем гибриды культурного томата, однако только во втором случае различия были достоверны.

В целом наблюдали тенденцию, в соответствии с которой частота кроссинговера у трансгенных гибридов была выше, чем у контрольных гибридов аналогичной комбинации скрещивания, однако все же ниже, чем у линейных гибридов культурного томата.

Таблица 4. Частота рекомбинации между генами *wv* и *d* хромосомы 2 у гибридов томатов

Гибрид F ₁			Фенотипические классы F ₂				χ^2 (3 : 1)		rf, %
			<i>WvD</i>	<i>Wvd</i>	<i>wvD</i>	<i>wvd</i>	<i>Wv:wv</i>	<i>D:d</i>	
<i>S. lycopersicum</i> × × <i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	RecA	1	340	51	55	73	0.03	0.34	23.5
		2	453	66	66	79	3.54	3.54	24.0
		3	277	48	38	63	0.40	0.25	22.8
		4	438	75	80	77	0.88	1.91	28.0
		Всего	1508	240	239	292	3.51	3.34	24.6 ± 1.2
	Контроль	1	394	57	63	80	0.27	1.19	23.5
		2	234	29	45	58	1.93	0.30	22.4
		3	326	36	55	74	0.42	1.77	21.0
		Всего	954	122	163	212	0.55	3.04	22.3 ± 0.7
<i>S. lycopersicum</i> × × <i>S. cheesmaniae</i>	RecA	1	355	46	48	75	0.65	1.02	20.6
		2	299	51	41	62	1.24	0	23.5
		3	209	25	30	44	0.16	1.11	20.6
		4	452	72	64	100	0.50	0	22.5
		5	298	43	41	52	2.95	2.24	23.3
		Всего	1613	237	224	333	4.44	2.23	22.1 ± 0.6
	Контроль	1	207	27	21	32	6.53	3.02	—
		2	68	11	6	12	2.15	0.09	21.0
		Всего	68	11	6	12	8.68	2.72	21.0
<i>S. lycopersicum</i> × × <i>S. pimpinellifolium</i>	RecA	1	543	90	89	125	0.03	0.07	23.9
		2**	573	66	89	109	0.81	7.48	—
		3**	560	77	87	100	2.33	5.44	—
		4**	428	71	78	76	0.69	2.16	27.5
		Всего	971	161	167	201	0.17	0.60	25.7 ± 1.8
	Контроль	1	649	115	103	130	1.41	0.09	25.1
		2	563	122	121	139	3.18	3.45	24.1
		3	413	52	65	82	0.32	3.12	22.5
		4	484	70	72	133	1.64	1.24	20.1
		Всего	2109	359	361	484	0.45	0.35	23.0 ± 1.1
<i>S. lycopersicum</i> × × <i>S. lycopersicum</i>	—	1	340	59	60	64	0.46	0.61	27.0
		2	278	51	44	50	1.74	0.28	27.0
		3	199	29	44	44	1.37	0.61	26.4
		4	147	26	27	30	0.01	0.05	27.5
		5	232	34	43	46	0	1.5	25.4
		Всего	1196	199	218	234	0.27	2.39	26.7 ± 0.4

Примечание. Для $p \leq 0.05$ и $d.f. = 1$ критическое значение $\chi^2 = 3.84$.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе в качестве опылителей растений *S. lycopersicum* использовали дикорастущие виды, позволяющие получать с культурным томатом жизнеспособные, фертильные и самосовместимые межвидовые гибриды [24]. По степени убывания родства наиболее близким к культурному виду признана разновидность *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, затем виды *S. cheesmaniae* или *S. pimpinellifolium* и, наконец, *S. habrochaites* [6, 25]. При этом в зависимости от филогенетических критериев, *S. pimpinellifolium* и *S. cheesmaniae* могут по-разному располагаться относительно культурного томата. Используемые в данных экспериментах образцы *S. pimpinellifolium* в филогенетическом отношении, по-видимому, дальше от культурного томата, чем *S. cheesmaniae*, гибриды с которыми были более фертильны и плодovиты.

Полулетальный фенотип межвидовых гибридов с *S. habrochaites* var. *glabratum* и *S. habrochaites* являлся примером постзиготического репродуктивного барьера гибридной несовместимости локусов из разных видов томатов [7]. Сходство симптомов некроза у гибридов с *S. habrochaites* var. *glabratum* и у гибридов арабидопсиса [26] предполагает, что в формировании полулетального фенотипа в типичных для выращивания условиях принимает участие аутоиммунная ответная реакция типа хозяин–патоген. Ранее А.А. Жученко (старший) были получены жизнеспособные гибриды между линиями культурного томата Мо938, Марглоб и *S. habrochaites* var. *glabratum* (в г. Кишинев, Молдова, неопубл. результаты). Вероятно, в данных исследованиях полулетальный фенотип мог быть следствием присутствия в теплице микроорганизмов, провоцирующих у гибридов реакцию аутоиммунного некроза [26].

Менделевский характер сегрегации всех маркеров являлся индикатором отсутствия сильных негативных явлений во время мейоза, формирования пыльцы, опыления, оплодотворения и формирования семян у линейных гибридов и гибридов с наиболее близкородственной разновидностью *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (табл. 2). Снижение частот передачи гена *recA*, а также аллеля *wv* потомству гибридов с *S. cheesmaniae* и аллеля “отсутствие антоциана” потомству гибридов с *S. pimpinellifolium* сигнализировало о негативных взаимодействиях между аллелями из разных видов томатов, которые не имели заметного морфологического проявления у самих гибридов (табл. 2, 3). В отличие от гибридов с *S. cheesmaniae*, у которых наиболее существенные отклонения сегрегации были среди контрольного потомства, уменьшение примерно на треть частоты передачи аллеля “отсутствие антоциана” наблюдалось только среди потомства трансгенных гибридов с *S. pimpinellifolium*, созданных на основе растения культур-

ного томата № 17/6 (табл. 2). В последнем случае, с учетом одновременной элиминации среди F_2 около четверти трансгенных генотипов, можно предполагать, что к нарушению сегрегации маркера приводила инсерция Т-ДНК в участке генома, функционально значимом для наследования некоторых генов в потомстве гибридов с *S. pimpinellifolium*.

Ранее в потомстве гибридов (*S. lycopersicum* × *S. cheesmaniae*) отмечено нарушение наследования более 50% ДНК-маркеров, специфичных для каждого вида, причем самые существенные искажения сегрегации были во второй и в третьей хромосомах [4]. В наших исследованиях примерно в 75% популяций F_2 контрольных гибридов с *S. cheesmaniae* нарушения наследования были связаны с недостаточной передачей потомству главным образом рецессивных аллелей *wv* и *d* хромосомы 2 (рис. 2, табл. 2). Более выраженная элиминация *wv*, чем *d*, предполагает участие в негативных взаимодействиях участка хромосомы 2, расположенного ближе к *wv* и дальше от *d*. Нельзя исключать предположения, что сам аллель *wv* является участником негативных взаимодействий. Кроссинговер между *wv* и *d* частично компенсирует обусловленный сцеплением негативный отбор аллеля *d*. Экспрессия гена *recA* стабилизировала наследование *wv* и *d*, поскольку у 75% популяций F_2 трансгенных гибридов наблюдалась их менделевская сегрегация (рис. 2). Это предположение подтверждается тем, что в остальных восьми из тридцати одной популяции нарушения преимущественно были обусловлены уменьшением передачи потомству только аллеля *wv*. Неполное восстановление сегрегации *Wv:wv* в потомстве трансгенных гибридов может быть связано с уменьшением частоты передачи потомству самого гена *recA* (табл. 3). Эти же результаты свидетельствуют о значимости гена *recA* для выживаемости рецессивных генотипов *wv/wv*, поскольку среди них прежде всего подвергались элиминации нетрансгенные. В данном случае механизм влияния *recA*, по-видимому, не связан с изменением параметров кроссинговера, поскольку у трансгенных и контрольных гибридов его частоты сопоставимы (табл. 4). Однако конкурентоспособное превосходство одних генотипов над другими на этапах опыления и оплодотворения может приводить к отклонениям в передаче аллелей в расщепляющихся популяциях томатов [7].

Мутация *wv* у томатов проявляется в виде ярко-желтых молодых листьев, которые с возрастом становятся зелеными, давая основание предполагать наличие компенсирующих механизмов на более поздних этапах развития листьев, однако генетическая основа формирования мутантного фенотипа не известна. Схожий фенотип был описан у мутантов арабидопсиса с инсерцией Т-ДНК в

гомологе *recA* — ядерном гене *cpRecA*, белковый продукт которого локализован в хлоропластах и необходим для поддержания целостности и стабильности генома незрелых пластид [27]. Возможно, мутации *cprecA* и *wv* затрагивают один и тот же метаболический путь, необходимый в растениях для согласованной работы ядерных и цитоплазматических генов в незрелых пластидах. У двудольных при прорастании вегетативной клетки пыльцы незрелые пластиды, как правило, разрушаются и их ДНК используется для обеспечения процессов роста и оплодотворения [28]. У межвидовых гибридов с *S. cheesmaniae* на фоне антагонизма некоторых родительских локусов мутация *wv* может снижать конкурентоспособность содержащей ее пыльцы, что подтверждается дефицитом среди потомства фенотипических классов *wvD* и *wvd* (рис. 3). Экспрессия гена *recA* частично компенсирует негативное воздействие *wv* на пыльцу, вероятно, путем проникновения белка RecA из цитоплазмы клеток в пластиды и стабилизации их генома. Не исключено, что сходный эффект мог обуславливать более высокий уровень фертильной пыльцы у трансгенных гибридов с *S. pimpinellifolium*, хотя он не затронул их плодovitость и семенную продуктивность.

Более низкая частота кроссинговера между генами *wv* и *d* у межвидовых контрольных гибридов, по сравнению с гибридами культурного томата (табл. 4), подтверждает, что обменов между хромосомами разных видов меньше, чем между хромосомами одного вида. В наших исследованиях не обнаружено явной зависимости частоты кроссинговера от филогенетических отношений видов томатов, что, вероятно, связано с использованием для оценки кроссинговера только части потомства гибридов с *S. cheesmaniae* и с *S. pimpinellifolium*. В отличие от ранее полученных результатов у гибридов культурного томата [17], у межвидовых трансгенных гибридов частота кроссинговера не была значимо выше, чем в соответствующем контроле. Ограничителем кроссинговера между гомеологичными последовательностями является система ММР, устраняющая при репарации ДЦР ошибочно спаренные основания в ДНК [19, 29]. У межвидовых гибридов томатов из-за повышенного уровня полиморфизма ДНК между гомеологичными хромосомами стоит ожидать более активное противодействие ММР кроссинговеру, чем у линейных гибридов. Следствием этого может быть то, что белка RecA уже может быть недостаточно для достоверного увеличения частоты кроссинговера. Сочетание эффективных методов подавления ММР и высокоуровневой экспрессии гена *recA* или его более эффективных аналогов позволит добиться наибольшего увеличения кроссинговера между гомеологами. Однако стоит учесть, что разрушение гена *MSH2* у *A. thaliana* од-

новременно приводит к нестабильности генома и накоплению мутаций у потомства [30].

В целом не отмечено значимого изменения кроссинговера между генами *wv* и *d* хромосомы 2 в зависимости от уровня экспрессии гена *recA* у межвидовых гибридов. Это однозначно подтверждают значения *rf* у гибридов комбинации *S. lycopersicum* × *S. pimpinellifolium* (табл. 4), достоверно различающихся по уровню экспрессии трансгена (рис. 1). Возможно, это обусловлено тем, что уровень экспрессии целевого гена в листьях растений не обязательно свидетельствовал о его пропорциональной экспрессии в генеративных клетках растений в момент формирования гамет, несмотря на использование сильного и конститутивного промотора CaMV35S. Однако даже невысокой экспрессии *recA* оказалось достаточно для изменения характера сегрегации аллелей в локусах *Wv:wv* и *D:d* гибридов с *S. cheesmaniae*.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rick C.M. Tomato, *Lycopersicon esculentum* (Solana-ceae) // Evolution of Crop Plants. 2nd ed. / Eds Simmonds J., Smarttand N.W. L.: Longman, 1995. P. 452–457.
2. Chetelat R.T., Meglic V., Cisneros P. A genetic map of tomato based on BC1 *Lycopersicon esculentum* × *Solanum lycopersicoides* reveals overall synteny but suppressed recombination between these homeologous genomes // Genetics. 2000. V. 154. № 2. P. 857–867.
3. Chetelat R.T., Ji Y. Cytogenetics and evolution // Genetic Improvement of Solanaceous Crops / Eds Razdan M.K., Mattoo A.K. Enfield: Science Publ., 2007. V. 1. P. 77–112.
4. Paterson A.H., Damon S., Hewitt J.D. et al. Mendelian factors underlying quantitative traitisn tomato: Comparison across species, generations, and environments // Genetics. 1991. V. 127. P. 181–197.
5. Canady M.A., Ji Y., Chetelat R.T. Homeologous recombination in *Solanum lycopersicoides* introgression lines of cultivated tomato // Genetics. 2006. V. 174. P. 1775–1788. doi 10.1534/genetics.106.065144
6. Bedinger P.A., Chetelat R.T., McClure B. et al. Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation // Sex Plant Reprod. 2011. V. 24. № 3. P. 171–187. doi 10.1007/s00497-010-0155-7
7. Moyle L.C., Nakazato T. Complex epistasis for Dobzhansky–Muller hybrid incompatibility in solanum // Genetics. 2009. V. 181. № 1. P. 347–351. doi 10.1534/genetics.108.095679
8. Shinohara A., Shinohara M. Roles of RecA homologues Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination // Cytogenet. Genome Res. 2004. V. 107. № 3–4. P. 201–207. doi 10.1159/000080598

9. Li W., Chen C., Markmann-Mulisch U. et al. The *Arabidopsis* *AtRAD51* gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 29. P. 10596–10601. doi 10.1073/pnas.0404110101
10. Couteau F., Belzile F., Horlow C. et al. Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a *dmc1* mutant of *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 1999. V. 11. № 9. P. 1623–1634. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.9.1623>.
11. Kurzbauer M.T., Uanschou C., Chen D., Schlögelhofer P. The recombinases DMC1 and RAD51 are functionally and spatially separated during meiosis in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2012. V. 24. № 5. P. 2058–2070. doi 10.1105/tpc.112.098459
12. Da Ines O., Degroote F., Goubely C. et al. Meiotic recombination in *Arabidopsis* is catalysed by DMC1, with RAD51 playing a supporting role // *PLoS Genet*. 2013. № 9. doi 10.1371/journal.pgen.1003787
13. Reiss B., Klemm M., Kosak H., Schell J. RecA protein stimulates homologous recombination in plants // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. № 7. P. 3094–3098.
14. Reiss B., Schubert I., Kopchen K. et al. RecA stimulates sister chromatid exchange and the fidelity of double-strand break repair, but not gene targeting, in plants transformed by *Agrobacterium* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. № 7. P. 3358–3363. doi 10.1073/pnas.050582797
15. Комахин П.А., Комахина В.В., Жученко А.А. Создание генетических конструкций, содержащих бактериальный ген *recA* *E. coli*, для индукции рекомбинации в растениях // *С.-х. биол.* 2007. № 3. С. 25–32.
16. Комахин П.А., Комахина В.В., Милукова 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.
17. Комахин П.А., Комахина В.В., Милукова 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.
18. Hunter N., Chambers S.R., Louis E.J., Borts R.H. The mismatch repair system contributes to meiotic sterility in an interspecific yeast hybrid // *EMBO J*. 1996. V. 15. № 7. P. 1726–1733.
19. Emmanuel E., Yehuda E., Melamed-Bessudo C. et al. The role of AtMSH2 in homologous recombination in *Arabidopsis thaliana* // *EMBO Rep*. 2006. V. 7. № 1. P. 100–105. doi 10.1038/sj.embor.7400577
20. Tam S.M., Hays J.B., Chetelat R.T. Effects of suppressing the DNA mismatch repair system on homeologous recombination in tomato // *Theor. Appl. Genet*. 2011. V. 123. № 8. P. 1445–1458. doi 10.1007/s00122-011-1679-4
21. Комахин П.А., Стрельникова С.Р., Жученко А.А. Генетические особенности маркерной линии культурного томата Мо938 // *Генетика*. 2019. Т. 55. № 1, С. 60–69. doi 10.1134/S1022795419010083
22. Орлова Н.Н. Генетический анализ. М.: Изд-во МГУ, 1991. 316 с.
23. Muller P.Y., Janovjak H., Miserez A.R., Dobbie Z. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR // *Biotechniques*. 2002. № 32. P. 1372–1374, 1376, 1378–1379.
24. Mutschler M., Liedl B. Interspecific crossing barriers in *Lycopersicon* and their relationship to self-incompatibility // *Genetic Control of Self-Incompatibility and Reproductive Development in Flowering Plants* / Ed. Williams E. Netherlands: Kluwer Acad., 1994. P. 164–188.
25. Moyle L.C. Ecological and evolutionary genomics in the wild tomatoes (*Solanum* sect. *Lycopersicon*) // *Evolution*. 2008. V. 62. P. 2995–3013. doi 10.1111/j.1558-5646.2008.00487.x
26. Bomblies K., Lempe J., Epple P. et al. Autoimmune response as a mechanism for a Dobzhansky-Muller-type incompatibility syndrome in plants // *PLoS Biol*. 2007. V. 5. e236. doi 10.1371/journal.pbio.0050236
27. Rowan B.A., Oldenburg D.J., Bendich A.J. RecA maintains the integrity of chloroplast DNA molecules in *Arabidopsis* // *J. Exptl Bot*. 2010. V. 61. № 5. P. 2575–2588. doi 10.1093/jxb/erq088
28. Tang L.Y., Sakamoto W. Tissue-specific organelle DNA degradation mediated by DPD1 exonuclease // *Plant Signal Behav*. 2011. V. 6. № 9. P. 1391–1393. doi 10.4161/psb.6.9.16595
29. Chambers S.R., Hunter N., Louis E.J., Borts R.H. The mismatch repair system reduces meiotic homeologous recombination and stimulates recombination-dependent chromosome loss // *Mol. Cell Biol*. 1996. V. 16. № 11. P. 6110–6120.
30. Hoffman P.D., Leonard J.M., Lindberg G.E. et al. Rapid accumulation of mutations during seed-to-seed propagation of mismatch-repair-defective *Arabidopsis* // *Genes Dev*. 2004. V. 18. № 21. P. 2676–2685.

Inheritance of Marker Genes among Progeny of Interspecific Tomato Hybrids Expressing the *recA* *Escherichia coli* Gene

R. A. Komakhin^{a,*}, N. A. Milyukova^b, S. R. Strelnikova^a,
A. A. Krinitsina^{a,c}, V. V. Komakhina^a, and A. A. Zhuchenko^{a,†}

^aAll-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, 127550 Russia

^bRussian State Agrarian University – Timiryazev MTAA, Moscow, 127550 Russia

^cDepartment of Higher Plants, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

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

In interspecific hybrids, a decrease of genetic exchanges between chromosomes from different species and negative interactions between functionally incompatible loci limits genetic variation among the progeny. Earlier, in intraspecific hybrids of the cultivated tomato *Solanum lycopersicum* with the expression of the *recA* *Escherichia coli* gene, the share of crossover genotypes was increased. In this research, transgenic hybrids between *S. lycopersicum* and some wild tomato species were obtained in order to study the effect of *recA* gene expression on the frequency of crossovers in the progeny of interspecies hybrids. Interspecific hybrids showed negative interactions between the loci of the cultivated tomato and the species *S. cheesmaniae*, *S. pimpinellifolium* and *S. habrochaites*, in the latter case leading to semi-lethal necrosis. The *recA* gene expression in interspecific hybrids with *S. cheesmaniae* partially compensates among the F₂ progeny the deficit of recessive genotypes at the *Wv:vv* locus of chromosome 2. In general, the crossover genotypes in the F₂ progeny were higher in transgenic interspecific hybrids than in control non-transgenic hybrids of the same combination of crossing, but lower than in intraspecific *S. lycopersicum* hybrids.

Keywords: tomato, *Solanum*, interspecies hybrids, transgenic plant, *recA* gene, recombination, crossing over.