

УДК 577.321:577.214:57.052

## ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГЕНОВ *SPO11* ЛОКАЛЬНО ИЗМЕНЯЕТ КРОССИНГОВЕР У ТОМАТА

© 2020 г. В. В. Комахина<sup>1</sup>, А. А. Криницына<sup>1, 2</sup>, Н. А. Милюкова<sup>1</sup>, Р. А. Комахин<sup>1</sup>. \*

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

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

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

Поступила в редакцию 14.10.2019 г.

После доработки 26.11.2019 г.

Принята к публикации 05.12.2019 г.

Неслучайное распределение вдоль хромосом мейотических рекомбинационных событий ограничивает разнообразие потенциальных генетических комбинаций среди потомства. Для перераспределения вовлеченных в рекомбинационные события регионов хромосом предложено использовать мейозо-специфичные гены белков Spo11 (генерирующих двухцепочечные разрывы ДНК) из филогенетически различных организмов. Для этого создали трансгенные растения томата, экспрессирующие под контролем конститутивного промотора 35S CaMV нативные гены *SPO11* из дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) или *Arabidopsis thaliana*. Генетическим анализом показали, что экспрессия обоих целевых генов *SPO11* частично нарушает моногенное наследование маркерных аллелей *Wv:wv* в хромосоме 2 и подавляет кроссинговер на участке между генами *wv* и *d*. Обнаружена устойчивая отрицательная корреляция между уровнями экспрессии целевых генов и снижением частоты кроссинговера на анализируемом участке хромосомы. В статье обсуждаются возможные генетические механизмы перераспределения кроссинговеров вдоль хромосомы 2 в результате экспрессии целевых генов *SPO11*.

**Ключевые слова:** томаты, *Solanum*, гибриды, трансгенные растения, гены *SPO11*, рекомбинация, кроссинговер, двухцепочечные разрывы.

**DOI:** 10.31857/S001667582009012X

Мейотическая рекомбинация играет важную роль в эволюции эукариотических организмов и является основным источником генетической изменчивости при комбинативной селекции растений. Возникшая в мейозе у гетерозигот генетическая изменчивость является совокупным результатом взаимодействия нескольких фундаментальных механизмов. Один из них общеизвестен и реализуется в виде независимой перекомбинации гомологичных хромосом при формировании гаплоидных гамет. Еще два механизма основаны на перераспределении одно- и двухцепочечных участков ДНК между гомологами и иницируются в профазе мейоза запрограммированными двухцепочечными разрывами (ДЦР) ДНК, которые по всему геному создают мейозо-специфичные ДНК-топоизомеразы VI, состоящие из субъединицы TороVIA, известной как Spo11 [1], и субъединицы TороVIB [2, 3].

Пути репарации ДЦР расходятся после образования D-петли и приводят к разным рекомбинационным продуктам [1]. Путь double-strand break repair приводит к кроссинговеру, необходимому для формирования хиазм между гомологами и их точной сегрегации в анафазе I [4]. Не все

случаи репарации ДЦР заканчиваются кроссинговером, например у *Arabidopsis thaliana* возникает около 200–300 ДЦР на клетку, но только около 10 кроссоверов наблюдают в мейозе [5]. Для поддержания целостности генома не преобразованные кроссинговером ДЦР репарируются по альтернативному пути synthesis-dependent strand annealing [6] или с использованием сестринской хроматиды в качестве матрицы [7], приводя к некроссоверным рекомбинационным продуктам. Третий механизм формирования изменчивости реализуется путем репарации неспаренных оснований в гетеродуплексной ДНК, возникающих в кроссоверных и некроссоверных рекомбинационных продуктах, и последующими конверсионными событиями [8].

В *A. thaliana* мутации или увеличенные дозы генов белков-модификаторов рекомбинации (FANCM, FIGL1, RECQ4, HEI10) привели к увеличению рекомбинации [9–12]. В наших исследованиях экспрессия бактериального гена *recA* также локально стимулировала частоту кроссинговера в хромосоме 2 томата [13]. Описанные подходы повышают частоты кроссинговера в есте-

ственных регионах генома, но не позволяют перераспределять его на участки невосприимчивые к ДЦР. В этом случае необходимы методы, позволяющие направлять ДЦР в разные участки генома. У *spo11Δ*-мутантов дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) экспрессия химерного гена *GAL4BD-SPO11* индуцировала новые ДЦР в сайте связывания белка Gal4 [14]. Химерные белки Spo11 с различными ДНК-связывающими модулями (транскрипционными факторами, нуклеазой Cas9 и др.), способны стимулировать кроссинговер в регионах генома с низкой естественной активностью [15]. В последнем случае авторы предлагают свою стратегию для повышения генетической изменчивости гамет в селекции растений.

Однако использовать в селекционных работах высшие организмы с нокаутом собственных генов *SPO11* затруднительно. У *A. thaliana* аналогичные мутации приводили к отсутствию полного синапсиса гомологов в профазе I, их случайной сегрегации, формированию значительного уровня нефункциональных гамет, уменьшению на порядок генетической рекомбинации [16]. Генотип *Spo11<sup>-/-</sup>* мыши (*M. musculus*) демонстрировал полное отсутствие ДЦР, асинапсис хромосом и стерильность [17]. Уровень экспрессии рекомбинантной изоформы гена *Spo11β* мыши имел решающее значение для синапсиса хромосом и благополучного завершения мейоза [18]. Эти результаты показывают, что у высших организмов в рамках предложенной стратегии, вероятно, только сверхэкспрессия рекомбинантных генов *SPO11* может стать способом перераспределения обменов между гомологичными хромосомами.

В настоящее время отсутствуют экспериментальные результаты о зависимости частоты кроссинговера и его распределения вдоль хромосом от сверхэкспрессии рекомбинантных генов *SPO11*. Данная работа направлена на оценку влияния сверхэкспрессии филогенетически различных генов *SPO11* на частоту кроссинговера между маркерными генами *wv* и *d* хромосомы 2 томата.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ген *SPO11 S. cerevisiae* был клонирован нами ранее [19]. Ген *SPO11-1 A. thaliana* был любезно предоставлен М. Grelon [16]. Транслируемые области генов *ScSPO11* и *AtSPO11-1* клонировали в плазмиду p35S-*recA* (на основе вектора pBI121) [20] по сайтам *Bam*HI и *Xba*I с получением плазмид p35S-*ScSPO11* и p35S-*AtSPO11-1*, в которых их экспрессия контролировалась конститутивным промотором 35S РНК вируса CaMV. Агробактериальную трансформацию растений культурного томата (*Solanum lycopersicum*) линии Марглоб с доминантными аллелями генов *Wv* и *D* хромосомы 2 проводили согласно опубликованным ранее результатам [20]. Для оценки частоты кроссингове-

ра использовали маркерную линию культурного томата Mo938 со сцепленными с частотой 29% рецессивными аллелями генов *wv* (*white virescent*) и *d* (*dwarf*) в хромосоме 2, а также с рецессивным геном “отсутствие антоциана”, локализованным вне хромосомы 2 [21].

Выделение ДНК, РНК и получение последовательностей кДНК генов выполняли в соответствии с опубликованными ранее результатами [20]. Молекулярный анализ трансформантов и гибридов выполняли с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и праймеров к последовательностям генов *ScSPO11* или *AtSPO11-1* и актина томата (табл. 1). Для исключения контаминации образцов тотальной ДНК растений бактерией *Agrobacterium tumefaciens* использовали ранее разработанные праймеры *virE* (plus) и *virE* (minus) [20]. Количественное содержание мРНК генов *ScSPO11* и *AtSPO11-1* с нормализацией относительно гена актина томатов определяли одновременно путем сочетания реакции обратной транскрипции с последующей ПЦР в реальном времени (“в одной пробирке”). Для этого в реакционную смесь добавляли линейные разрушаемые пробы TaqMan ROX (5(6)-карбокси-X-родамин)/BHQ2 (для актина) и FAM (5(6)-карбоксифлуоресцеин)/BHQ1 (для целевого гена), праймеры (табл. 1), комплементарные участку гена актина (Fwd-act и Rev-act) и участку генов *ScSPO11* (Fwd-scs и Rev-scs) или *AtSPO11-1* (Fwd-ats и Rev-ats), 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. Уровень флуоресценции регистрировали в конце каждого цикла с использованием амплификатора CFX96 Touch Real Time System (Bio-Rad, США). Нормализацию данных ПЦР в реальном времени выполняли по методу 2<sup>-ΔΔCT</sup> [22]. Измерения повторяли 5 раз в трехкратной повторности с использованием молодых листьев размером 3.5 ± 0.5 см.

Для определения нуклеотидной последовательности ДНК томата, прилежащей к правой границе RB (right border) T-ДНК, использовали метод изоляции FSTs (flanking sequence tags) с применением эндонуклеазы рестрикции *Pst*I [23]. Амплификацию осуществляли в два этапа: на первом с “внешними” праймерами *pbi1m* и *pbi4m*, на втором – с *pbi1m* и “внутренним” праймером *pbi3m* (табл. 1). Для непосредственной амплификации из генома томата участка прилежащего к RB T-ДНК использовали *pbi3m* и созданный на основе секвенированной последовательности геномной ДНК праймер *pbi5m*. Для поиска фрагментов плазмидной ДНК в геноме трансгенных растений использовали методику и праймеры (BD1–BD10) к различным участкам вектора pBI121 [24].

**Таблица 1.** Праймеры для молекулярно-биологического анализа трансгенных растений

Ген/этап	Название	5'–3'	Продукт ПЦР, пн
<i>ScSPO11</i>	scs11 “+”	ccatggctttggaggattg	778
	scs11 “–”	atcccttacctgtaatgagcatgg	
	TaqMan-scs	FAMaagcagtcctgacattcacacaaBHQ1	
	Fwd-scs	cgcagatgttttgctcata	159*
	Rev-scs	ccattcaaagggaagtccaa	
<i>AtSPO11-1</i>	ats11 “+”	ggatccatggaggaaaattcgctatttc	1101
	ats11 “–”	tctagaatcaaggagagcttacttcacgac	
	TaqMan-ats	FAMcctgtgcattgtctagtgcactgtgatccaBHQ1	
	Fwd-ats	cctgatggagaagttgcatcta	74*
	Rev-ats	tgcttaggatctcaaagccat	
Актин (U60482)	TaqMan-act	ROXgtcagccacacagttcccatctBHQ2	
	Fwd-act	ttgtgctggactctggagat	65*
	Rev-act	tgaggaggcataacctca	
–	pbi1m	tctcatattcactctcaatcc	–
	pbi4m	ttaattctccgctcatgatc	
	pbi3m	tcgttcccgccttcagt	
	pbi5m	gtggcttattttccaatgct	

\* Специфичность амплификации с использованием пар праймеров проверяли электрофорезом в 1.5%-ном агарозном геле, принимая образование одного ампликона в качестве ее критерия.

Статистическая оценка по критерию хи-квадрат ( $\chi^2$ ) и расчет частоты рекомбинации (*rf*) методом наибольшего правдоподобия выполняли в соответствии с рекомендациями [25]. Для анализа потомства использовали популяции  $F_2$  со всхожестью семян более 90%.

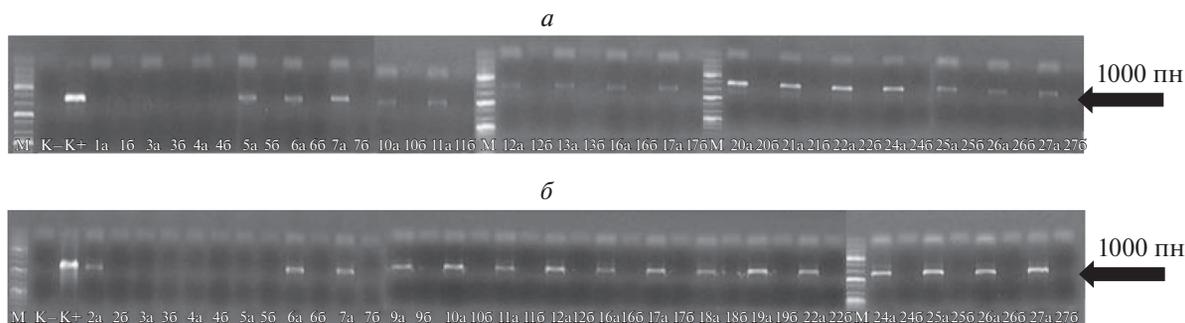
## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Экспрессия и наследование целевых генов ScSPO11 или AtSPO11-1 у гибридов*

Для получения трансгенных растений томата выполнили агробактериальную трансформацию линии Марглоб с использованием плазмид p35S-*ScSPO11* и p35S-*AtSPO11-1* с целевыми генами *ScSPO11* и *AtSPO11-1* под контролем промотора 35S CaMV. В результате независимых трансформационных событий создали две группы устойчивых к антибиотику канамицину регенерантов, из которых с помощью ПЦР и специфичных праймеров отобрали по 19 трансформантов без агробактериальной контаминации и с последовательностью целевых генов. Анализ их тотальной РНК методом обратной транскрипции с последующей ПЦР позволил отобрать растения с экспрессией целевых генов:  $T_0$ -*ScSPO11* и  $T_0$ -*AtSPO11-1* (рис. 1).

В результате опыления пыльцой линии Мо938 получили гибриды  $F_1$  от трансгенных растений № 6, 11 и 16 из группы  $T_0$ -*ScSPO11* и от № 6, 19 и 24 из группы  $T_0$ -*AtSPO11-1*. Все гибриды  $F_1$  имели около 90% фертильной пыльцы и по этому показателю не различались. С помощью ПЦР-анализа ДНК отобрали гибриды с целевыми генами. В потомстве каждого трансформанта присутствовали возникшие в результате сегрегации нетрансгенные гибриды, в дальнейшем использованные в качестве контроля. У всех трансгенных гибридов  $F_1$ -*ScSPO11* и  $F_1$ -*AtSPO11-1* обнаружили последовательности мРНК целевых генов. Для сравнения уровней экспрессии измерили содержание их мРНК относительно мРНК референсного гена актина томата с использованием ПЦР в реальном времени (рис. 2).

У гибридов  $F_1$ -*ScSPO11* экспрессия целевого гена составляла от 0.2 до 3.3 ед. (рис. 2,а). Наиболее низкие значения от 0.2 до 0.9 ед. отмечены у потомства трансформанта № 6, средние значения от 0.9 до 1.3 ед. были у потомства трансформанта № 16, наиболее высокие от 2.3 до 3.3 ед. — у потомства трансформанта № 11. У гибридов  $F_1$ -*AtSPO11-1* экспрессия целевого гена составляла от 3.6 до 15.9 ед. и в целом была выше, чем экспрессия гена *ScSPO11* (рис. 2). Восемь из девяти гибридов экспрессировали *AtSPO11-1* на уровне от 3.6 до 7.4 ед. Гибрид



**Рис. 1.** ПЦР-анализ с использованием кДНК (а) и РНК (б) из растений  $T_0$ -ScSPO11 (а) и  $T_0$ -AtSPO11-1 (б). Цифрами обозначены индивидуальные трансформанты.

№ 19-4 демонстрировал уровень экспрессии в 2–4 раза выше, чем у остальных растений  $F_1$ -AtSPO11-1.

Для исключения инсерции Т-ДНК вблизи маркеров хромосомы 2 в потомстве каждого трансгенного гибрида от 68 до 110 растений популяции  $F_2$  проанализировали с помощью ПЦР и праймеров к последовательностям целевых генов (табл. 1).

В каждой популяции были представлены в соотношении 3 : 1 соответственно трансгенные и нетрансгенные растения (табл. 2). Моногенный характер сегрегации целевых генов предполагал инсерцию Т-ДНК в единственном локусе генома трансгенных гибридов  $F_1$ . Во всех популяциях  $F_2$ , за исключением потомков гибрида № 24-8 из  $F_1$ -AtSPO11-1, целевые гены наследовались независимо от аллелей локуса *D:d* хромосомы 2 (табл. 2), а также маркерных локусов *Wv:wv* и “наличие:отсутствие антоциана” (данные не приводятся). Эти результаты предполагали, что трансгенные гибриды  $F_1$  не содержали инсерции Т-ДНК вблизи маркеров хромосомы 2.

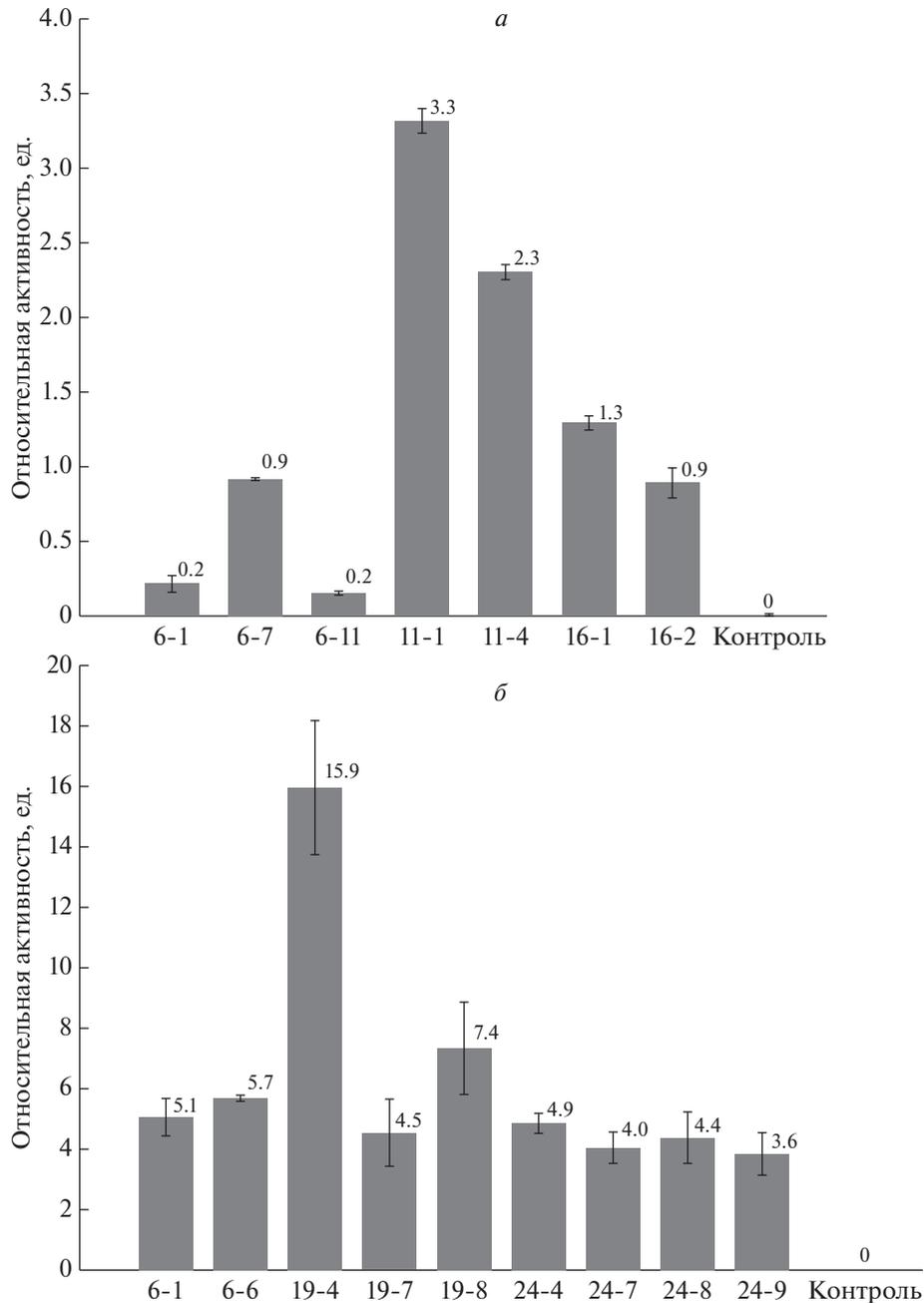
В потомстве гибрида № 24-8 моногенная сегрегация маркеров была отмечена только по признаку “окраска антоцианом”: из 110 растений 77 имели антоциановую окраску и 33 были без нее. При этом целевой ген наследовался совместно ( $\chi^2$  соответствует 8.46) с локусом антоциановой окраски, но с аномально высокой частотой кроссинговера – 65%. Поскольку к моменту проведения экспериментов по определению локуса интеграции Т-ДНК не сохранилась в необходимом количестве ДНК гибрида № 24-8, использовали ДНК двух его трансгенных потомков  $F_2$ . В результате последовательных этапов амплификации с “внешним” *rbi1m* и “внутренним” *rbi3m* праймерами из обоих растений клонировали фрагмент ДНК размером 774 пн (рис. 3).

В результате секвенирования установлено, что между последовательностями праймеров *rbi1m* и *rbi3m* располагается нуклеотидная последовательность, частично соответствующая последовательности

вектора pBI121 (рис. 3). Между сайтом рестрикции *PstI* и принадлежащими Т-ДНК остатками RB располагается последовательность размером 501 пн из генома томата. Для подтверждения существования химерной последовательности в геноме трансгенных потомков гибрида № 24-8 нативную ДНК (без обработки эндонуклеазой *PstI*) от 26 трансгенных растений  $F_2$  амплифицировали с использованием праймеров *rbi3m* и *rbi5m*. В результате получили фрагменты ДНК размером 538 пн, полностью соответствующие участку между *rbi3m* и *rbi5m*. Не было амплификации при использовании в качестве матрицы ДНК других гибридов группы  $F_1$ -AtSPO11-1. С использованием программы BLAST для нуклеотидной последовательности между сайтом рестрикции *PstI* и RB выявили в базе GenBank три идентичные на 98–99% последовательности ДНК в хромосоме 10 культурного томата *S. lycopersicum* (CP023766.1 и HG975522.1) и в хромосоме 10 *Solanum pennellii* (HG975449.1). Не обнаружили дополнительных последовательностей плазмидной ДНК в геноме трансгенных потомков гибрида № 24-8 с использованием праймеров BD1–BD10 к различным участкам вектора pBI121 [24].

#### Наследование маркерных генов в потомстве гибридов, экспрессирующих гены ScSPO11 или AtSPO11-1

В каждой популяции  $F_2$  проверили соответствие сегрегации аллелей в локусах *Wv:wv*, *D:d* и “наличие:отсутствие антоциана” закону Менделя, в соответствии с которым три четверти растений должны были иметь доминантные признаки и одна четверть – рецессивные. Не обнаружили отклонений наследования аллелей трех локусов во всех девяти популяциях от контрольных гибридов  $F_1$ . В потомстве всех трансгенных гибридов не выявили нарушений наследования в локусе “наличие:отсутствие антоциана”. Одновременно в одной и двух из четырех популяций от  $F_1$ -ScSPO11 № 6-1 и 6-11 и в двух из трех популяций от гибри-



**Рис. 2.** Экспрессия генов *ScSPO11-1* (а) и *AtSPO11-1* (б) в листьях гибридов томата по результатам ПЦР в реальном времени (нормализовано относительно экспрессии гена актина). Планки погрешностей соответствуют стандартным ошибкам. Контроль – нетрансгенные гибриды.

да F<sub>1</sub>-AtSPO11-1 № 6-6 обнаружили нарушение сегрегации в локусе *Wv:wv* (табл. 3).

Из табл. 3 следует, что в популяциях № 6-1-1 и 6-11-2 нарушение было обусловлено уменьшением доли рецессивных генотипов *wv/wv* (сегрегация примерно 4–7 : 1), а в популяциях № 6-11-1, 6-6-1 и 6-6-2 – увеличением их доли (сегрегация примерно 2 : 1). В популяции № 6-11-2 одновременно в ло-

кусе *D:d* была также снижена и доля рецессивных генотипов *dd* (сегрегация 4 : 1). Во всех популяциях потомства гибрида № 24-8 из F<sub>1</sub>-AtSPO11-1 была снижена доля доминантных генотипов примерно в 15 раз в локусе *Wv:wv* (сегрегация 0.2 : 1) и примерно в 4 раза в локусе *D:d* (сегрегация 0.7 : 1) хромосомы 2, за исключением одной популяции без нарушений в *D:d*.

Таблица 2. Наследование целевых и маркерных генов среди растений F<sub>2</sub>

Ген	Гибрид F <sub>1</sub>		Растений F <sub>2</sub> , шт.				Ожидаемое расщепление между генами			
			X-S-	X-ss	xxS-	xxss	S : s	χ <sup>2</sup>	X-S- : X-ss : xxS- : xxss	χ <sup>2</sup>
ScSPO11	6	1	36	15	15	6	3 : 1	0.67	9 : 3 : 3 : 1	1.33
		7	41	10	17	5		0.77		1.84
		11	40	17	9	6		1.85		2.91
	11	1	41	9	15	6		0.57		2.19
		4	43	12	12	5		0.07		0.54
	16	1	38	14	15	5		0.07		0.40
		2	35	16	13	8		2.67		3.95
AtSPO11-1	6	1	38	13	14	7	0.30	1.58		
		6	45	14	10	5	0.02	1.39		
	19	4	47	8	10	7	0.67	5.58		
		7	40	11	15	5	0.23	0.69		
		8	38	11	12	7	0.08	2.06		
	24	4	44	10	18	5	1.25	2.26		
		7	41	9	13	5	0.71	1.44		
		8	49	28	28	5	1.47	8.46		
		9	40	13	14	4	0.04	0.09		

Примечание. “S” и “s” – соответственно присутствует или отсутствует последовательность целевого гена. Для всех вариантов, за исключением F<sub>1</sub>-AtSPO11-1 № 24-8, “X” или “x” – соответственно аллели D или d хромосомы 2. Для F<sub>1</sub>-AtSPO11-1 № 24-8 “X” и “x” – соответственно наличие или отсутствие антоциановой окраски. Для вероятности ошибки  $p \leq 0.05$  и  $df = 1$  критическое значение  $\chi^2 = 3.84$ , а для  $df = 3$   $\chi^2 = 7.81$ .

```

tctcatattcactctcaatcmaataatctgcaccggatctggatcgtttcgcat
gattgaacaagatggattgacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggcta
ttcggctatgactgggcacaaacagacaatcggctgctctgatgccgcgctgttcc
ggctgtcagcgcagggcgcccggttctttttgtcaagaccgacctgtccgggtgc
tctgaatgaaactgcaggtggcttatttttccaaatgctcccctgctttatataca
attcatagaccatttcccccataatataatcttgtttccctgcaacttgccacaat
tattttccaacagatgcctcatccaatttcttgcacctttaaagttaagccctc
aacatttcattgggtgtgattctttttccaagccactaaagatacttccaatg
ttcatcattttcccatagataatctctacactccaactttatccataaact
tggggaaatatgaataaacaagtccaaaagtataaaatggaaaataagacaacat
tgatgatgtgagccttctagcataagatatcttccctaataaagcaacagtgat
cctatatgtgatcttttaaccaactgatagcaatccattttcccatttatttg
aggataatggtaaccccggtatcttataggtagtgaacctattaagaatgattg
tatgttatgtatctttgcttgcctcaaacactgatagtttaaactgaaggcgggaa
acga

```

Рис. 3. Нуклеотидная последовательность, амплифицированная из ДНК потомков гибрида № 24-8 (обработанной эндонуклеазой рестрикции PstI). Последовательность вектора представлена обычным шрифтом. В ней темно-серым цветом обозначены праймер pbi1m (сверху) и последовательность, комплементарная праймеру pbi3m (снизу), подчеркиванием выделен остаток последовательности RB, полужирным шрифтом – сайт рестрикции PstI. Курсивом выделена последовательность из генома томата (между PstI и RB), в которой светло-серым цветом показана последовательность праймера pbi5m.

**Таблица 3.** Нарушение сегрегации маркеров в некоторых популяциях F<sub>2</sub>

Ген	Гибрид F <sub>1</sub>		№ популяции F <sub>2</sub>	Фенотипические классы F <sub>2</sub>				χ <sup>2</sup> (3 : 1)	
				WvD	Wvd	wvD	wvd	Wv:wv	D:d
<i>ScSPO11</i>	6	1	1	58	7	2	8	5.44	1.00
		11	1	48	7	12	17	4.06	0.57
			2	167	28	25	19	6.10	4.08
<i>AtSPO11-1</i>	6	6	1	147	21	39	43	8.11	0.05
			2	118	15	25	40	6.47	0.81
	24	8	1	8	3	39	20	131.22	2.30
			2	9	4	39	82	304.73	109.70
			3	11	9	38	90	327.50	119.50
			4	43	11	31	80	157.25	80.00
			5	4	4	19	42	147.95	63.89
			6	7	2	18	28	100.85	25.61

Примечание. Для вероятности ошибки  $p \leq 0.05$  и  $df = 1$  критическое значение  $\chi^2 = 3.84$ .

*Частота кроссинговера между маркерными генами wv и d хромосомы 2 у гибридов, экспрессирующих гены ScSPO11 или AtSPO11-1*

Для изучения частоты кроссинговера использовали популяции F<sub>2</sub> с моногенной сегрегацией во всех маркерных локусах (табл. 4).

Из табл. 4 следует, что у индивидуальных контрольных гибридов частота кроссинговера между генами wv и d составляла от 25.4 до 27% и в целом не отличалась от наших опубликованных ранее результатов для комбинации скрещивания (Марглоб × Мо938) [21, 26]. У индивидуальных трансгенных гибридов F<sub>1</sub>-ScSPO11 и F<sub>1</sub>-AtSPO11-1 частота кроссинговера была в более широком диапазоне – от 17.9 до 28.8% и в среднем составляла соответственно 21.8 и 22.0%, что достоверно ниже, чем у контроля: 26.7%.

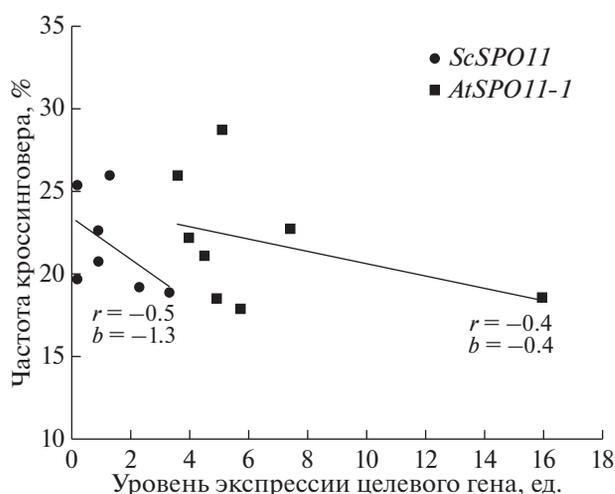
С увеличением уровня экспрессии целевых генов частота кроссинговера уменьшается (рис. 4). В обоих случаях наблюдали среднюю отрицательную корреляцию ( $r = -0.4-0.5$ ), однако коэффициент регрессии в случае гена из дрожжей (-1.3) был примерно в 3 раза выше, чем при использовании растительного гена (-0.4).

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Ранее у гибридов культурного томата с экспрессией бактериального гена *recA* инсерции Т-ДНК не влияли на характер наследования среди потомства маркерных локусов хромосомы 2 и локуса “наличие:отсутствие антоциана” [13]. Однако в геномах эукариот рядом расположенные инсер-

ции ДНК могут нарушать сегрегацию маркеров [27, 28]. Независимое наследование генов *ScSPO11* и *AtSPO11-1* относительно маркерных локусов в потомстве всех трансгенных гибридов томата, за исключением № 24-8 из F<sub>1</sub>-AtSPO11-1 (табл. 2), позволило исключить неспецифическое влияние локализации Т-ДНК на наследование маркеров и процесс кроссинговера между ними.

По-видимому, в результате генетической трансформации линии Марглоб трансформант № 24 из группы T<sub>0</sub>-AtSPO11-1 приобрел не менее



**Рис. 4.** Зависимость частоты кроссинговера между генами wv и d хромосомы 2 от уровня экспрессии генов *ScSPO11* и *AtSPO11-1* у гибридов томата. Показаны коэффициенты корреляции (r) и регрессии (b).

**Таблица 4.** Частота рекомбинации между маркерными генами *wv* и *d* хромосомы 2 у гибридов F<sub>1</sub>

Ген	Гибрид F <sub>1</sub>		Фенотипические классы F <sub>2</sub>				$\chi^2$ (3 : 1)		rf, %
			WvD	Wvd	wvD	wvd	Wv:wv	D:d	
<i>ScSPO11</i>	6	1	220	40	30	40	2.53	0.11	25.4
		7	290	38	43	67	0	0.25	20.8
		11	154	20	27	46	2.73	0.39	19.7
	11	1	263	28	32	50	1.81	3.33	18.9
		4	241	28	31	52	0.38	0.97	19.2
	16	1	232	36	45	48	0.11	0.58	26.0
		2	304	52	40	67	0.88	0.12	22.7
Итого			1704	242	248	370	1.10	1.75	21.8 ± 1.1*
<i>AtSPO11-1</i>	6	1	199	36	49	47	2.83	0	28.8
		6	55	4	8	11	0.02	1.38	17.9
	19	4	226	27	29	54	0.02	0.14	18.6
		7	270	37	43	68	0.54	0	21.1
		8	385	56	67	93	0.84	0.01	22.8
	24	4	39	8	3	12	0.02	1.74	18.5
		7	248	37	37	56	0.03	0.03	22.2
		9	245	41	42	48	0.23	0.35	26.0
	Итого			1667	246	278	389	1.00	0.21
Контроль	11	3	340	59	60	64	0.46	0.61	27.0
	16	8	278	51	44	50	1.74	0.28	27.0
	6	2	199	29	44	44	1.37	0.61	26.4
	19	2	147	26	27	30	0.01	0.05	27.5
	24	2	232	34	43	46	0	1.15	25.4
	Итого			1196	199	218	234	0.27	2.39

Примечание. Для вероятности ошибки  $p \leq 0.05$  и  $df = 1$  критическое значение  $\chi^2 = 3.84$ .

\* Значения, существенно отличающиеся от контроля.

двух инсерций Т-ДНК: одну в область генов *Wv* и *D* хромосомы 2, другую – в хромосому 10. Созданный на его основе гибрид № 24-8 также содержал эти две инсерции, но передавал потомству только последнюю из них. Инсерция Т-ДНК вблизи генов *Wv* и *D* хромосомы 2, вероятно, в новом генетическом окружении оказалась вредной для потомства и приводила к исключению сцепленных с ней доминантных аллелей. В 3 раза более выраженная элиминация *Wv*, чем *D*, предполагает локализацию Т-ДНК ближе к *Wv* и дальше от *D*. Кроссинговер между Т-ДНК и *Wv* и *D* частично компенсирует обусловленный сцеплением негативный отбор и обеспечивает появление среди потомства пропорциональной доли доминантных генотипов (табл. 3). Сходный процесс элиминации сцепленных генов хромосомы 2 отмечен нами в потомстве межвидовых гибридов комби-

нации (*S. lycopersicum* × *Solanum cheesmaniae*) и был ассоциирован с негативными эпистатическими взаимодействиями между геномами разных видов томатов [26]. Однако в последнем случае негативному отбору подвергалась рецессивная пара маркеров *wv* и *d* хромосомы 2.

Ген “отсутствие антоциана” линии томата Мо938 находится вне хромосомы 2, но среди потомства комбинации (Марглоб × Мо938) наследуется совместно с геном *d* хромосомы 2 из-за эффекта “квази-сцепления” [21]. В потомстве гибрида № 24-8 локализованный в хромосоме 10 ген *AtSPO11-1* наследуется сцепленно с детерминирующим признаком “отсутствие антоциана” геном (табл. 2), но также с частотой кроссинговера значительно выше уровня независимого наследования. По данным “Центра генетических ресурсов томата” (<http://tgrc.ucdavis.edu>) хромосома 10 томата содер-

жит только один ген *ag* (*anthocyanin gainer*), определяющий отсутствие антоциана. Фенотипическое проявление *ag* допускает наличие антоциана на семядолях и нижней стороне листьев, в то время как у линии Мо938 антоциан отсутствует полностью во всех органах и при любых условиях выращивания. Следовательно, сцепленное наследование с аномально высокой частотой кроссинговера также не исключает в комбинации (Марглоб × Мо938) эффект “квази-сцепления” между геном “отсутствие антоциана” и локусами хромосомы 10.

У мутантов *mei-W68<sup>l</sup>* (*spo11*) дрозофилы (*Drosophila melanogaster*) экспрессия гетерологичных генов *SPO11* из *A. thaliana* или риса (*Oryza sativa*) увеличивала количество мейотических ДЦР, хотя и оказалась недостаточной для нормального завершения мейоза [29]. Эти результаты предполагают, что в клетках гибридов томата, конститутивно экспрессирующих гены *ScSPO11* и *AtSPO11-1*, рекомбинантные белки Spo11 также могли принимать участие в формировании ДЦР. Вследствие этого проявились два взаимосвязанных эффекта на одном участке хромосомы 2 томата: у большинства гибридов снизилась частота кроссинговера между генами *wv* и *d* (табл. 4) и обнаружилось нарушение наследования аллелей локуса *Wv:wv* у части их потомства (табл. 3).

Среди потомства межвидовых гибридов (*S. lycopersicum* × *S. cheesmaniae*) нарушение сегрегации одновременно в локусах *Wv:wv* и *D:d* выразалось в пропорциональном уменьшении среди потомства сцепленных рецессивных аллелей *wv* и *d* хромосомы 2, т.е. в элиминации целых хромосом [26]. На этом фоне нарушения сегрегации только в локусе *Wv:wv* хромосомы 2 среди потомства линейных гибридов F<sub>1</sub>-ScSPO11 и F<sub>1</sub>-AtSPO11-1, как в сторону увеличения доли рецессивных генотипов, так и в сторону ее уменьшения (табл. 3), заметно отличаются от обнаруженных ранее эффектов. Высокая фертильность пыльцы у F<sub>1</sub>-ScSPO11 и F<sub>1</sub>-AtSPO11-1, моногенное наследование сцепленного локуса *D:d* хромосомы 2 исключали негативный отбор целых хромосом.

У гетерозигот изменение соотношения аллелей в продуктах мейоза и нарушение менделевского наследования среди потомства может быть следствием предпочтительного формирования ДЦР в одном из аллелей локуса, репарация которого с использованием гомолога сопровождается конверсионными событиями [8]. В последнем случае у гибридов F<sub>1</sub> (A/J × DBA/2J) мыши в горячей точке рекомбинации A3 наблюдали формирование ДЦР преимущественно в хромосоме DBA/2J в сравнении с гомологом A/J. В результате сопряженных с кроссинговером конверсионных событий происходило увеличение передачи в гаметы аллеля хромосомы A/J. Следовательно, нарушение сегрегации в локусе *Wv:wv* среди потомства

трансгенных гибридов томата могло стать результатом генной конверсии доминантного аллеля в рецессивный и наоборот (табл. 3) вследствие предпочтительного формирования ДЦР в одном из аллелей гибридов томата, экспрессирующих гены *ScSPO11* или *AtSPO11-1*. При этом причины избирательности и направления конверсии неясны и могут быть связаны с гетерозиготностью генетических детерминант, по которым изогенность линий Марглоб и Мо938 не проверялась.

Известно, что у *spo11Δ*-мутантов дрожжей экспрессия химерного гена *GAL4BD-SPO11* (на основе гена *SPO11* дрожжей) стимулировала в 3–4 раза мейотический кроссинговер [30] и на порядок повышала генную конверсию [14]. Кроссинговер повышает разнообразие среди потомства путем создания новых комбинаций аллелей, но не влияет на их частоту в популяциях [31]. С последним мнением следует согласиться при отсутствии массовых кроссинговеров и конверсионных событий внутри нуклеотидной последовательности маркерного аллеля. В данных исследованиях отклонения сегрегации маркерного локуса *Wv:wv* могли быть следствием рекомбинационных событий внутри аллелей. При формировании ДЦР гетерологичные белки Spo11 могли иметь преимущество перед эндогенными за счет того, что их гены контролировались сильным конститутивным промотором, активным в большинстве тканей на разных этапах развития растений. Поскольку наблюдаемые эффекты в наследовании маркеров не имели обязательного проявления у всех гибридов (как и в случае подавления кроссинговера), то можно предполагать конкуренцию или взаимодействие гетерологичных и эндогенных белковых факторов, что ранее описано при экспрессии химерных генов *SPO11* у дрожжей [15].

Снижение частоты кроссинговера на участке хромосомы 2, между локусами *Wv:wv* и *D:d*, позволяет предполагать репарацию ДЦР в локусе *Wv:wv* с использованием кроссинговера. Последнее обстоятельство объясняется тем, что у томата не менее 70–80% кроссинговеров реализуются по интерферирующему пути Pathway 1 [32], и возникающие в локусе *Wv:wv* кроссинговеры интерферируют соседние, расположенные между *Wv:wv* и *D:d*. Это предположение подтверждается для всех трансгенных гибридов, в потомстве которых обнаружено массовое нарушение сегрегации *Wv:wv* (табл. 3 и 4). Таким образом, в отличие от экспрессии гена *recA*, которая стимулировала существующие кроссинговеры у томата [13], экспрессия генов *ScSPO11* и *AtSPO11-1* приводила к их перераспределению вдоль хромосомы 2.

В растениях томата уровень экспрессии эукариотических генов *ScSPO11* и *AtSPO11-1* оказался на 1–2 порядка выше, чем ранее экспрессия бактериального гена *recA* *Escherichia coli* [26]. Примерно в

5 раз более низкий уровень мРНК гена дрожжей приводил к сопоставимому снижению кроссинговера, как и более высокий уровень мРНК гена арабидопсиса (рис. 2 и 4). У группы F<sub>1</sub>-AtSPO11-1 более низкий коэффициент регрессии кроссинговера является следствием высокого уровня экспрессии у гибрида № 19-4, превышающего в 2–4 раза значения остальных гибридов этой группы. Но даже без учета образца № 19-4 коэффициент регрессии у данной группы остается в 2 раза ниже, чем у F<sub>1</sub>-ScSPO11. Следовательно, влияние экспрессии дрожжевого гена в подавлении кроссинговера у томата более весомо, чем гена арабидопсиса. По данным программы Blast белковые продукты генов *ScSPO11* и *AtSPO11-1* соответственно на 24 и 61% идентичны аминокислотной последовательности предполагаемого Spo11 томата (XM0103259702). Не исключено, что механизм влияния гетерологичной экспрессии может быть связан также с доминантно-негативным эффектом взаимодействия гетерологичных Spo11 с эндогенными белковыми факторами томата.

Работы по созданию трансгенных растений выполнены за счет средств гранта РФФИ № 11-04-00873-а, определение локуса интеграции Т-ДНК произведено с использованием средств государственного задания № 0574-2019-0001 (государственная регистрация № АААА-А18-118051890110-1).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Keeney S. Spo11 and the formation of DNA double-strand breaks in meiosis // *Genome Dynamics and Stability*. 2008. V. 2. P. 81–123. [https://doi.org/10.1007/7050\\_2007\\_026](https://doi.org/10.1007/7050_2007_026)
2. Vrielynck N., Chambon A., Vezon D. et al. A DNA topoisomerase VI-like complex initiates meiotic recombination // *Science*. 2016. V. 351. P. 939–943. <https://doi.org/10.1126/science.aad5196>
3. Robert T., Nore A., Brun C. et al. The TopoVIB-Like protein family is required for meiotic DNA double-strand break formation // *Science*. 2016. V. 351. P. 943–949. <https://doi.org/10.1126/science.aad5309>
4. De Boer E., Jasin M., Keeney S. Analysis of recombinants in female mouse meiosis // *Mammalian Oocyte Regulation. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. 2013. V. 957. P. 19–45. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-191-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-191-2_2)
5. Choi K., Zhao X., Kelly K.A. et al. Arabidopsis meiotic crossover hot spots overlap with H2A.Z nucleosomes at gene promoters // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. P. 1327–1336. <https://doi.org/10.1038/ng.2766>
6. Lam I., Keeney S. Mechanism and regulation of meiotic recombination initiation // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014. V. 7(1):a016634. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016634>
7. Goldfarb T., Lichten M. Frequent and efficient use of the sister chromatid for DNA double-strand break repair during budding yeast meiosis // *PLoS Biol.* 2010. V. 8(10):e1000520. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000520>
8. Cole F., Keeney S., Jasin M. Preaching about the converted: how meiotic gene conversion influences genomic diversity // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2012. V. 1267. P. 95–102. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06595.x>
9. Crismani W., Girard C., Froger N. et al. FANCM limits meiotic crossovers // *Science*. 2012. V. 336. P. 1588–1590. <https://doi.org/10.1126/science.1220381>
10. Girard C., Chelysheva L., Choinard S. et al. AAA-AT-Pase FIDGETIN-LIKE 1 and helicase FANCM antagonize meiotic crossovers by distinct mechanisms // *PLoS Genet.* 2015. V. 11(7): e1005369. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005369>
11. Seguela-Arnaud M., Crismani W., Larcheveque C. et al. Multiple mechanisms limit meiotic crossovers: TOP3alpha and two BLM homologs antagonize crossovers in parallel to FANCM // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. P. 4713–4718. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423107112>
12. Ziolkowski P.A., Underwood C.J., Lambing C. et al. Natural variation and dosage of the HEI10 meiotic E3 ligase control Arabidopsis crossover recombination // *Genes Dev.* 2017. V. 31. P. 306–317. <https://doi.org/10.1101/gad.295501.116>
13. Комахин П.А., Комахина В.В., Милюкова Н.А., Жуценко 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.
14. Peciña A., Smith K., Mézard C. et al. Targeted stimulation of meiotic recombination // *Cell*. 2002. V. 111(2). P. 173–184. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01002-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01002-4)
15. Sarno R., Vicq Y., Uematsu N. et al. Programming sites of meiotic crossovers using Spo11 fusion proteins // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45(19):e164. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx739>
16. Grelon M., Vezon D., Gendrot G., Pelletier G. AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants // *The EMBO J.* 2001. V. 20. P. 589–600. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.3.589>
17. Baudat F., Manova K., Yuen J.P. et al. Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11 // *Mol. Cell.* 2000. V. 6. P. 989–998. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00098-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00098-8)
18. Kauppi L., Barchi M., Lange J. et al. Numerical constraints and feedback control of double-strand breaks in mouse meiosis // *Genes Dev.* 2013. V. 27. P. 873–886. <https://doi.org/10.1101/gad.213652.113>

19. Комахин Р.А., Комахина В.В. Компартиментализация Spo11p в вегетативных клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Мол. биология. 2008. Т. 42. № 3. С. 494–500.
20. Комахин Р.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.
21. Комахин Р.А., Стрельникова С.Р., Жученко А.А. Генетические особенности маркерной линии культурного томата Мо938 // Генетика. 2019. Т. 55. № 1. С. 60–69.  
<https://doi.org/10.1134/S0016675819010089>
22. Muller P.Y., Janovjak H., Miserez A.R., Dobbie Z. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR // Biotechniques. 2002. V. 32. P. 1372–1374, 1376, 1378–1379.
23. Pogorelko G.V., Fursova O.V. A highly efficient miPCR method for isolating FSTs from transgenic *Arabidopsis thaliana* plants // J. Genet. 2008. V. 87. P. 133–140.  
<https://doi.org/10.1007/s12041-008-0020-8>
24. Пермякова Н.В., Дейнеко Е.В. Фрагменты векторной ДНК, интегрирующиеся в геном трансгенных растений моркови при агробактериальной трансформации // Вестник Томского гос. ун-та. Биология. 2015. Т. 32. С. 145–161.
25. Орлова Н.Н. Генетический анализ. М.: Изд-во МГУ, 1991. 316 с.
26. Комахин Р.А., Милукова Н.А., Стрельникова С.Р. и др. Наследование маркерных генов в потомстве межвидовых гибридов томатов, экспрессирующих ген *recA Escherichia coli* // Генетика. 2019. Т. 55. № 4. С. 406–417.  
<https://doi.org/10.1134/S0016675819040064>
27. Hammarlund M., Davis M.W., Nguyen H. et al. Heterozygous insertions alter crossover distribution but allow crossover interference in *Caenorhabditis elegans* // Genetics. 2005. V. 171. P. 1047–1056.  
<https://doi.org/10.1534/genetics.105.044834>
28. Юнусов З.Р., Соловьев А.А., Михайленко С.Н. и др. Влияние трансгенов на мейотическую рекомбинацию у высших эукариот, на примере растений томата // С.-х. биология. 2009. Т. 44. С. 52–59.
29. Yoshinori S., Tokai T., Agawa Y. et al. The double-stranded break-forming activity of plant SPO11s and a novel rice SPO11 revealed by a Drosophila bioassay // BMC Mol. Biology. 2012. 13: 1.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2199-13-1>
30. Murakami H., Nicolas A. Locally, meiotic double-strand breaks targeted by Gal4BD-Spo11 occurs at discrete sites with a sequence preference // Mol Cell Biol. 2009. V. 29. P. 3500–3516.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.00088-09>
31. Jeffreys A., Neumann R. Reciprocal crossover asymmetry and meiotic drive in a human recombination hot spot // Nat. Genet. 2002. V. 31. P. 267–271.  
<https://doi.org/10.1038/ng910>
32. Anderson L.K., Lohmiller L.D., Tang X. et al. Combined fluorescent and electron microscopic imaging unveils the specific properties of two classes of meiotic crossovers // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. P. 13415–13420.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1406846111>

## Expression of Recombinant Genes *SPO11* Locally Alters the Tomato Crossing Over

V. V. Komakhina<sup>a</sup>, A. A. Krinitsina<sup>a, b</sup>, N. A. Milyukova<sup>a</sup>, and R. A. Komakhin<sup>a, \*</sup>

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

<sup>b</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

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

A nonrandom distribution of meiotic recombinant events along the chromosomes limits the recombination landscape in the progeny. The genes encoding meiosis-specific Spo11 proteins (generating double-strand DNA breaks) of phylogenetically different organisms were proposed to redistribute the regions involved in recombination events. For this purpose, the transgenic tomato plants expressing under the control of 35S CaMV constitutive promoter the native genes *SPO11* of the budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) or *Arabidopsis thaliana* were constructed. Genetic analysis showed that expression of both target genes partially altered a monogenic inheritance of the *Wv:wv* alleles of a chromosome 2, and concurrently suppressed crossing over at the adjacent region between the *wv* and *d* genes. A stable negative correlation between the expression levels of target genes and a decrease in the crossing over rate in the analyzed chromosome region was observed. The paper discusses possible genetic mechanisms underlying the redistribution of crossovers along chromosome 2 caused by expression of the target genes coding for the Spo11 proteins.

**Keywords:** tomato, *Solanum*, hybrids, transgenic plants, *SPO11* genes, recombination, crossing over, double-strand breaks (DSBs).