ЦИС-ЭФФЕКТ ГОМОЗИГОТНОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ФОНА НА ЧАСТОТУ КРОССИНГОВЕРА У КУКУРУЗЫ

Михайлов Михаил

Институт генетики, физиологии и защиты растений, Кишинэу, Республика Молдова
e-mail: mihail.mihailov@igfpp.md

Abstract

The *cys*-effect of homozygous background on crossing over in maize. From the inbred maize lines MK01 and Ku123, the isogenic lines containing mutant markers *lg1*, *gl2*, *c1*, *sh1*, *wx1* were obtained. They differ from original forms by pair of mutant markers. The hybrids of isogenic lines with the original forms are heterozygous only within marked region and are almost homozygous in the rest of the genome. Homozygous background leads to increase of mean recombination rate from 5.4% to 10.1% in *c1-sh1*, from 15.0% to 35.6% in *s1-wx1* and from 18.2% to 32.8% in *lg1-gl2*.

Key words: maize, crossing over, recombination rate

Введение

Рекомбинационная изменчивость имеет огромное значение в селекции, но ее возможности существенно снижаются при тесном расположении генов, разделение которых желательно для селекции. Особенно это касается прицентромерных участков хромосом, где подавлен кроссинговер – так называемая проблема недоступной рекомбинационной изменчивости. Поэтому в исследованиях кроссинговера большое внимание уделяется поиску факторов, повышающих частоту рекомбинации [1]. В настоящем исследовании изучалось влияние гомозиготного и гетерозиготного генетического окружения на частоту рекомбинации маркированных сегментов хромосом кукурузы.

Материалы и методы

На генетический фон линий кукурузы Ky123 и MK01 методом многократного беккроссирования были переведены мутантные маркеры 2-й хромосомы *lg1*, *gl2* и 9-й хромосомы *c1*, *sh1*, *wx1*. В результате получены изогенные линии:

M(lg,gl), *K(lg,gl)*, *M(c,sh)*, *K(c,sh)*, *M(sh,wx)*, *K(sh,wx)*.

Начальные буквы М и К означают MK01 и Ky123, в скобках указаны перенесенные мутации, для краткости без номеров. Мутация *lg1* определяет безлигульный лист, *gl2* – глянецовые всходы, *c1* – неокрашенный алейрон, *sh1* – сморщенный эндосперм, *wx1* – восковидный эндосперм.

Частоту рекомбинации на гомозиготном фоне наблюдали в генотипах MK01×*M(lg,gl)*, Ky123×*K(lg,gl)*, MK01×*M(c,sh)*, Ky123×*K(c,sh)*, MK01×*M(sh,wx)*, Ky123×*K(sh,wx)*. Для контроля проверяли частоту рекомбинации на гетерозиготном фоне в генотипах Ky123×*M(lg,gl)*, MK01×*K(lg,gl)*, Ky123×*M(c,sh)*, MK01×*K(c,sh)*, *M(sh,wx)*×Ky123, MK01×*K(sh,wx)*.

Частоту рекомбинации проверяли отдельно в микро- и мегаспорогенезе, то есть в метелках и початках, тестерами служили соответствующие изогенные линии. В каждом варианте испытывали от 7 до 12 растений, средний объем семейства составлял 270 зерен (для признаков *c1*, *sh1*, *wx1*) или 180 проростков (для признаков *lg1*, *gl2*), семейства объема меньше 50 не учитывались.

Результаты и обсуждение

Средние значения частоты рекомбинации (*rf*) во всех вариантах приведены в таблице. Там же для сравнения приведены значения, ожидаемые по генетической карте из [2], при составлении которой использовались экспериментальные данные, полученные, как правило, в анализирующих скрещиваниях с высокой гетерозиготностью. Они примерно соответствуют значениям, полученным в наших экспериментах на гетерозиготном фоне. Однако на гомозиготном фоне *rf* возросла примерно вдвое. Это возрастание проявилось и в микро-, и в мегаспорогенезе, хотя

можно заметить, что в мегаспорогенезе частота рекомбинации менее устойчива. Если в микроспорогенезе *rf* определяется в основном фактором гомо- и гетерозиготности, то в мегаспорогенезе проявляются специфические для генотипа эффекты, которые могут действовать и на повышение, и на понижение.

Отношение *rf* на гомозиготном фоне (среднее между МК01 и Ку123) к *rf* на гетерозиготном фоне (среднее между прямым и обратным гибридом) варьирует от 1,67 до 2,54 в зависимости от сегмента и пола, в женском мейозе относительный эффект гомозиготного фона проявляется сильнее, чем в мужском. Наблюдаются и различия между сегментами: эффект возрастает в ряду *lg1-gl2* < *c1-sh1* < *sh1-wx1*.

Таблица. Частота рекомбинации на гомо- и гетерозиготном фоне

Генетический фон	<i>rf</i> (<i>lg1-gl2</i>), %		<i>rf</i> (<i>c1-sh1</i>), %		<i>rf</i> (<i>sh1-wx1</i>), %	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Гомозиготный						
МК01	27,6±1,4	26,8±1,6	9,8±1,2	10,9±0,9	38,4±0,5	30,2±1,1 ***
Ку123	34,3±0,9	42,4±1,3 **	9,6±0,3	10,1±1,1	36,8±1,3	37,0±1,1
Гетерозиготный						
МК01 х Ку123(изо)	17,2±0,3	16,7±0,7	5,3±0,2	5,2±0,3	16,9±0,5	15,3±0,6
Ку123 х МК01(изо)	19,9±0,9	18,8±0,8	5,8±0,3	5,2±0,3	16,7±0,8	11,2±0,7 **
Среднее отношение гомо/гетеро	1,67	1,95	1,76	2,01	2,34	2,54
Значения, ожидаемые по карте maizeGDB (genetic)						
Табличное расстояние, сМ	17,9		3,9		27,8	
Ожидаемое <i>rf</i> по Холдейну	15,1		3,75		21,4	
Ожидаемое <i>rf</i> по Косамби	17,2		3,9		25,3	

Примечание. Значимость эффекта пола **P<0,01, ***P<0,001

Не исключено, что различия между сегментами связаны с их положением относительно центромеры. Сегмент *lg1-gl2*, в котором отношение гомо/гетеро наименьшее, располагается близко к левому концу хромосомы, и середина его находится на расстоянии 65 сМ от центромеры. Середина сегмента *c1-sh1* находится в 39 сМ от центромеры, а середина сегмента *sh1-wx1* – в 23 сМ. Возможно, на гомозиготном фоне ослабляется действие факторов, которые подавляют кроссинговер в прицентромерных зонах, и рекомбинация повышается в первую очередь в этих зонах, где она обычно подавлена. Это может относиться и к различиям, связанным с полом. В таком случае эффект гомозиготного фона может иметь большое значение для селекции, так как он разрешает проблему недоступной рекомбинационной изменчивости. У кукурузы очень много генов сосредоточено в прицентромерных участках хромосом, где они между собой очень слабо рекомбинируют [3]. Но, возможно, эти гены можно разделять в поздних поколениях инбридинга, где генетическое окружение станет в значительной мере гомозиготным.

Эффекты усиления рассчитаны без учета двойных обменов, а с учетом двойных обменов они должны быть еще выше, особенно для длинных сегментов *lg1-gl2* и *sh1-wx*. Но нам неизвестно, как на гомозиготном фоне проявляется интерференция, и по какому правилу надо учитывать двойные обмены – по Холдейну или по Косамби, поэтому оценим интенсивность кроссинговера без учета двойных обменов.

Длина отрезков *gl2-lg1*, *c1-sh1* и *sh1-wx1* равна 6,36, 1,75 и 11,77 мегабаз (Мб). Тогда интенсивность кроссинговера на первых двух отрезках составит 2,8-3,2 сМ/Мб на гетерозиготном фоне и 4,9-6,0 сМ/Мб на гомозиготном. В последней отрезке, лежащем ближе всего к центромере, интенсивность кроссинговера составила 1,1–1,4 на гетерозиготном фоне (в зависимости от пола) и

2,8–3,2 – на гомозиготном. То есть на гомозиготном фоне различия между сегментами несколько сгладились, а интенсивность обменов в третьем сегменте стала такой, какая характерна для дистальных сегментов на гетерозиготном фоне.

Вероятно, этот же эффект гомозиготного фона наблюдал в свое время Аллард на лимской фасоли [4], где велась дивергентная селекция на изменение *rf*. Селекция была доведена до F₅, и отбор в плюс-направлении привел к повышению частоты рекомбинации в трех маркированных сегментах с 41% до 50%, с 19% до 33% и с 2% до 12%, тогда как отбор в минус-направлении оказался безрезультатным. Этот результат хорошо объясняется эффектом гомо- и гетерозиготности: в следующих поколениях *rf* не может быть меньше, чем в F₁, потому что в F₁ гетерозиготность максимальна, тогда как при инбридинге сокращается гетерозиготное окружение вокруг маркированных сегментов. Сам Аллард причину изменчивости *rf* видел в генных эффектах, и предполагал, что предыдущий искусственный отбор велся на стабилизацию фенотипа, благодаря чему параллельно происходил отбор и на снижение *rf* до минимально возможного уровня. Заметим, однако, что здесь минимальная *rf* наблюдалась не в линиях, а в F₁, и в родительских линиях частота обменов не обязательно должна быть такой же.

Предыдущие исследования, в которых изучалась связь рекомбинации с гомо- и гетерозиготностью, обычно основывались на оценках общей частоты рекомбинации по хиазмам. Каких-либо регулярных закономерностей обнаружено не было, наблюдалось обычно промежуточное проявление в гибридах по сравнению с родительскими линиями (например, [5]). При таком подходе обнаружить цис-эффекты методологически невозможно. Обнаружить их возможно при анализе *rf* в маркированных сегментах, но в этом случае серьезным препятствием является необходимость выведения изогенных линий, которое занимает несколько сезонов. Из исследований в этом направлении можем отметить лишь эксперимент на арабидопсисе [6]. В данной работе наблюдался эффект, подобный нашему - повышалась *rf* в гетерозиготных маркированных сегментах, когда соседние участки переходили в гомозиготное состояние, хотя это повышение было не столь значительным – в 1,1-1,35 раза, а не в 1,8-2,4, как у нас. Судя по представленным данным, частота рекомбинации падает с расширением соседней гетерозиготной зоны и это падение прослеживается до дистанции 35% *rf*. В отличие от нашего опыта, здесь была возможность измерять *rf* и в таких участках, которые в основном гомозиготны, за исключением краевых маркерных локусов. В них частота рекомбинации тоже падала при замене гомозиготного окружения на гетерозиготное, но здесь происходило падение от нормального значения к пониженному, а не от повышенного к нормальному, как для гетерозиготных маркированных сегментов. Под нормальным мы имеем в виду значение, характерное для F₁ и отраженное на картах.

Авторы заключили, что в мозаичных генотипах, где чередуются гомо- и гетерозиготные участки, происходит перераспределение обменов из гомозиготных участков в гетерозиготные, а общая по геному частота обменов не меняется. Механизм этого явления остается неизвестным, достаточно ясно только, что в нем принимает участие интерференция. Кроссинговер у арабидопсиса может проходить по интерферирующему пути (85% обменов) и неинтерферирующему (15%), и перераспределяются только интерферирующие обмены. На неинтерферирующие обмены гетерозиготность влияет иначе: она подавляет такие обмены (снижение в 1,3 – 1,5 раз в данном эксперименте), но не проявляет цис-эффекта, частота обменов зависит от состояния самого маркированного сегмента, но не соседних. Справедливо ли такое объяснение для кукурузы, станет ясно после получения изогенных линий *c1-Sh1-wx1* и *ws3-Lgl-gl2*. Тогда можно будет проверить *rf* в маркированных сегментах, которые внутри отчасти гомозиготны.

Выводы

На изогенных линиях МК01 и Ку123 кукурузы обнаружен цис-эффект гомозиготности на рекомбинацию в соседних маркированных сегментах, приводящий к двукратному повышению ее частоты. Данный эффект можно использовать для повышения выхода редких рекомбинантов, используя для этого поздние поколения инбридинга с повышенной степенью гомозиготности. Особенно это важно для прицентромерных участков хромосом, для которых существует проблема

недоступной рекомбинационной изменчивости.

Исследования проведены в рамках проекта Государственной Программы 20.80009.5107.03 «Эффективное использование генетических ресурсов растений и современных биотехнологических методов для повышения адаптивности сельскохозяйственных культур к климатическим изменениям», финансируемой Национальным Агентством по Исследованиям и Развитию.

Литература

1. STAPLEY, J., FEULNER, P. et al. Variation in recombination frequency and distribution across eukaryotes: patterns and processes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 2017, 372 (1736), 20160455. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0455>
2. *Maize genetics and genomics database*. Maize genetics executive committee <http://www.maizegdb.org/>
3. LAMBING, C., FRANKLIN, C.F., WANG, C.-J. R. Understanding and manipulating meiotic recombination in plants. *Plant Physiology*, 2017, vol. 173, nr. 3, pp. 1530-1542.
4. ALLARD, R.W. Evidence for restriction of recombination in the Lima bean. *Genetics*. 1963, vol. 48, nr. 10, pp. 1389-1395.
5. SIDHU, G.K., FANG, C. et al. Recombination patterns in maize reveal limits to crossover homeostasis. *PNAS*. 2015, vol. 112, nr. 52, pp. 15982-15987.
6. ZIOLKOWSKI, P.A., BERCHOWITZ, L.E. et al. Juxtaposition of heterozygous and homozygous regions causes reciprocal crossover remodelling via interference during *Arabidopsis* meiosis. *eLife*. 2015, vol. 4, e03708 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4407271/>