

*На правах рукописи*

**СИМАНОВСКИЙ Сергей Анатольевич**

**МЕЙОТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ РЖИ *Secale cereale* L.: АНАЛИЗ ПРОЯВЛЕНИЯ  
И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ МЕЙОЗА**

03.02.07 - Генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва  
2016

Работа выполнена в лаборатории цитогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

**Научный руководитель:**

**БОГДАНОВ Юрий Фёдорович**

доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории цитогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

**Официальные оппоненты:**

**ХРУСТАЛЁВА Людмила Ивановна**

доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Центра молекулярной биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева, г. Москва

**РОДИОНОВ Александр Викентьевич**

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биосистематики и цитологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук, г. Санкт-Петербург

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института [www.vigg.ru](http://www.vigg.ru), тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Синельщикова Т.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Мейоз – универсальный клеточный механизм, обеспечивающий редукцию числа хромосом до гаплоидного набора и рекомбинацию генов у всех эукариот, размножающихся половым путём. У растений мейоз происходит в конце жизненного цикла спорофита ( $2n$ ) и служит для образования микро- и макроспор, из которых затем развиваются мужские и женские гаметофиты – пыльцевые зёрна и зародышевые мешки ( $n$ ). Каждый этап мейоза находится под генетическим контролем. Его изучение основано на исследовании мейотических мутаций, которые приводят к специфическим нарушениям этапов деления. У наиболее изученных в этом плане организмов – дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и дрозофилы *Drosophila melanogaster* известно более 300 специфических мутаций, нарушающих течение мейоза. У растений число уже открытых генов мейоза на порядок меньше. Большая часть мейотических генов экспрессируется в профазе I мейоза и прямо или косвенно влияет на сложные процессы синапсиса и рекомбинации гомологичных хромосом. Важным направлением в исследовании генов мейоза является анализ их действия на формирование и функционирование синаптонемных комплексов (СК). СК – мейоз-специфичная структура, которая существует только в профазе I мейоза. Эта двунитевая белковая структура соединяет гомологичные хромосомы на время их рекомбинации в профазе I, обеспечивает обратимый синапсис гомологичных хромосом и служит ультраструктурным компартментом для локализации медиаторов и промежуточных структур рекомбинации (Богданов, Коломиец, 2007).

**Актуальность темы исследования.** Работа посвящена фундаментальной проблеме – изучению генетического контроля мейоза. Наше исследование мы проводили на Петергофской коллекции мейотических мутантов ржи, созданной С.П. Соснихиной и коллегами на кафедре генетики СПбГУ. Эта коллекция является одной из немногих генетических коллекций, в которых поддерживаются мутации по специфическим генам мейоза. На фоне общей консервативности мейоза, некоторые его элементарные события отличаются у различных видов. В связи с этим важным аспектом фундаментальных исследований мейоза является детальное изучение его особенностей у разных организмов. Наше исследование является частью цикла работ, посвящённых такому изучению ржи. Изучение мейотических мутаций ржи потенциально имеет и практическую значимость. Россия делит первое место с Германией и Польшей по размеру площадей, занятых этой важной сельскохозяйственной культурой (<http://www.fao.org>). Зарубежными исследователями показано, что мейотические мутации можно использовать в селекционном процессе злаков, в частности, для управления процессами рекомбинации (Dirks *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015).

**Степень разработанности темы исследования.** Среди растений генетический контроль мейоза, на данный момент, лучше всего изучен у кукурузы, арабидопсиса и риса. Всего у этих трёх видов растений известно около 100 мейотических мутаций, часть из которых произошла в гомологичных генах. Изучение мутаций ведётся методами электронной микроскопии, FISH, иммуноцитохимии, двугибридного

анализа белков, а также широкого спектра молекулярно-генетических подходов. Большинство мейотических генов кукурузы, арабидопсиса и риса клонированы, для них известны последовательности ДНК и белковые продукты. В то же время мейотические мутации ржи хорошо изучены лишь классическими цитологическими методами (свето-микроскопический и электронно-микроскопический анализ стадий мейоза), но остаются недостаточно изученными на молекулярном уровне. Благодаря сотрудничеству исследователей Петергофской коллекции в Петербурге с зарубежными коллегами, молекулярные исследования мейотических мутаций ржи начались в XXI веке (Mikhailova *et al.*, 2001; Jenkins *et al.*, 2005; Mikhailova *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2008; Ловцюс *и др.*, 2009; Михайлова *и др.*, 2010). В нашей работе мы, сотрудничая с этими исследователями из Петербурга, продолжили эту линию изучения мейотических мутаций ржи.

**Цель нашей работы:** анализ проявления мейотических мутаций ржи *Secale cereale* L. и использование их для изучения механизмов мейоза.

Нами были поставлены следующие **задачи исследования.**

1. Изучить наследование и цитологическое проявление новой мейотической мутации *sy11* ржи.
2. Для выяснения причины имеющихся противоречий в описании цитологического фенотипа асинаптических мутантов *sy9* провести его ревизию на стадиях профазы I и метафазы I мейоза.
3. Для изучения особенностей структурной организации осей мейотических хромосом у мутантов *sy1* и *sy19* провести сравнительный иммунофлуоресцентный анализ распределения белков синаптонемных комплексов ASY1 и ZYP1 в мейоцитах этих мутантов и растений ржи дикого типа.
4. Для изучения заключительных этапов временного существования синаптонемных комплексов в профазе I мейоза провести сравнительный цитологический анализ стадии диплотены у растений дикого типа и мейотических мутантов *sy1*, *sy9*, *sy11* и *sy19*.

**Научная новизна работы.** В работе получены оригинальные данные о цитологическом проявлении мейотических мутаций ржи. Впервые исследована мейотическая мутация *sy11*. Установлено, что мутация *sy11* наследуется моногенно и рецессивно и вызывает гетерологичный синапсис хромосом в профазе I мейоза. Проведена ревизия цитологического фенотипа асинаптических мутантов *sy9*. Впервые в мейоцитах мутантов *sy9* обнаружены фрагменты синаптонемных комплексов. Факт наличия коротких спаренных участков хромосом является важным уточнением проявления мутации *sy9* на клеточном уровне. Впервые проведён анализ совместного распределения белков ASY1 и ZYP1 в мейоцитах мутантов *sy1* и *sy19*. Установлено, что в профазе I мейоза у мутантов *sy1* и *sy19* не нарушена загрузка этих белков на оси мейотических хромосом. Сочетание разных методов микроскопии позволило сделать оригинальные заключения о строении и динамике формирования осей мейотических хромосом и выявить различия между мейотическими мутантами на заключительных этапах существования этих осей.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В работе были получены оригинальные данные о проявлении мутации *sy11* и усовершенствованы знания о проявлении мутаций *sy1*, *sy9* и *sy19*. Результаты нашей работы дополняют картину генетического контроля мейоза у ржи. Кроме того, мы получили оригинальные данные о процессах демонтажа синаптонемных комплексов на стадии диплотены. Преобразования СК на этой стадии, на сегодняшний день, остаются недостаточно изученными, наши результаты вносят вклад в их понимание.

**Методология и методы исследования.** Мейотические мутации ржи и других растений приводят к стерильности, поэтому они поддерживаются в гетерозиготном состоянии (Sosnikhina *et al.*, 2005; Соснихина *и др.*, 1994). Работу с каждой мейотической мутацией мы начинали с анализа её наследования в изучаемых потомствах. Фенотипы растений (дикий тип или аномальный мейоз) определяли с помощью цитологического анализа метафазы I. Для растений дикого типа характерно присутствие 7 бивалентов хромосом на этой стадии, в то время как мейотические мутанты характеризуются наличием варьирующего числа унивалентных хромосом. Для выявления мутантов *sy9* также было проведено молекулярное генотипирование растений с использованием SSR-маркера *Xgwm132*, который имеет тесное сцепление с геном *Sy9* (Малышев *и др.*, 2009). Рецессивные гомозиготы по изучаемым мейотическим генам (все исследованные нами мутации наследовались моногенно и рецессивно) отбирались для подробного анализа методами световой и электронной микроскопии и иммуноцитохимии.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Мейотическая мутация *sy11* ржи наследуется моногенно и рецессивно. Она обуславливает нарушение гомологичности спаривания хромосом в профазе I, т.е. является мутацией гетерологичного синапсиса.
2. В мейоцитах сильных асинаптических мутантов *sy9* в профазе I мейоза происходят редкие, но регулярные, события спаривания хромосом, которые обеспечивают образование единичных хиазм.
3. В мейоцитах мутантов *sy1* и *sy19* не нарушена загрузка белков ASY1 и ZYP1, и, таким образом, нарушения синапсиса у мутантов *sy1* и *sy19* не связаны с дефектами загрузки этих структурных белков на оси мейотических хромосом.
4. При естественной деградации синаптонемных комплексов ржи на стадии диплотены в ходе нормального мейоза происходит образование петель латеральных элементов синаптонемных комплексов. Установлено, что в состав этих петель входит белок ASY1. Далее происходит расслоение этих петель на две белковые нити и последующая спирализация деградирующих нитей. Аналогичные преобразования происходят в мейоцитах мутантов *sy9* и *sy11*. В мейоцитах мутантов *sy1* и *sy19* в ходе диплотены такие преобразования не происходят, имеет место простая фрагментация осей мейотических хромосом.

**Апробация результатов работы и публикации.** По результатам исследования опубликовано 9 печатных работ, в том числе 2 статьи в журнале «Генетика», который входит в список изданий, рекомендованных ВАК для опубликования основных

научных результатов диссертации. Результаты работы были представлены на международных конференциях «Хромосома» (Новосибирск, 2009, 2015), на XVII и XIX международных молодежных научных конференциях «Ломоносов» (Москва, 2010, 2012), на конференции «Биологическое разнообразие: Генофонды и генетическое разнообразие» (Москва, 2011), на XVII Всероссийском симпозиуме «Структура и функции клеточного ядра» (Санкт-Петербург, 2014) а также на ежегодных отчётных сессиях аспирантов ИОГен РАН в 2011-2013 годах. Апробация работы состоялась 7 июня 2016 г. на межлабораторном семинаре ИОГен РАН.

**Структура и объём диссертации.** Диссертационная работа изложена на 123 страницах машинописного текста и включает разделы “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы”, “Результаты и обсуждение”, “Заключение”, “Выводы”, “Список сокращений” и “Список литературы”. Диссертация содержит 26 рисунков и 24 таблицы. Библиографический указатель содержит 167 источников (34 на русском языке, 131 на английском языке и 2 интернет-ресурса).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Растительный материал.** В исследовании были использованы потомства коллекционных растений ржи *Secale cereale* L., которые расщеплялись по мейотическим мутациям *sy11*, *sy9*, *sy1* и *sy19*. Работу с мутациями вели либо в инбредных линиях, либо в гибридных потомствах от скрещивания индивидуальных растений-носителей мейотических мутаций с маркерными линиями без мейотических мутаций. Семенной материал был предоставлен С.П. Соснихиной из Петергофской генетической коллекции мейотических мутаций ржи, созданной ею и коллегами на кафедре генетики Санкт-Петербургского государственного университета (Sosnikhina *et al.*, 2005; Соснихина *и др.*, 2005; Соснихина *и др.*, 1994). Нами были изучены все потомства от самоопыления следующих растений.

1. № 130/2 (+/*sy11*) – гетерозиготное по мутации *sy11* растение пятого поколения от инбридинга (I<sub>5</sub>) из линии Mc11.

2. № 321/21 (+/*sy9*) – растение из картирующей популяции F<sub>2</sub> от скрещивания индивидуального гетерозиготного по мутации *sy9* растения с растением из автофертильной линией L6.

3. № 6s/7/7 (+/*sy1*) – гетерозиготное по мутации *sy1* и гомозиготное по гену яровости *Sp1*.

4. №№ 227/8 (+/*sy19*), 227/9 (+/*sy19*) и 227/14 (+/+) – растения F<sub>2</sub> от скрещивания озимой линии-носителя мутации *sy19* с яровой линией Яр10.

Также, в качестве контроля (дикий тип), были использованы растения яровой ржи сорта Селенга из коллекции кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, семена предоставлены А.А. Соловьёвым. Растения выращивались на опытном поле Московского НИИСХ (Немчиновка), в теплицах РГАУ-МСХА и ИОГен РАН.

**Свето-микроскопические исследования** стадий мейоза в материнских клетках пыльцы проводили на ацетокарминовых давленных препаратах, приготовленных классическим способом (Паушева, 1988; Пухальский *и др.*, 2007).

**Электронно-микроскопические исследования.** Материнские клетки пыльцы спредировали (распластывали) с помощью гипотонического шока на поверхности раствора сахарозы по методу Гиллиса в модификации лаборатории цитогенетики ИОГен РАН (Gillies, 1981; Fedotova *et al.*, 1989; Симановский *и др.*, 2014). Препараты фиксировали раствором параформальдегида (4%). Контрастирование (окрашивание) проводили раствором азотнокислого серебра. Хорошо распластанные клетки на стадии профазы I исследовали на электронном микроскопе JEM-100B.

**Иммунофлуоресцентные исследования.** Препараты готовили на предметных стёклах, покрытых слоем полилизина. Для выявления структурных белков ASY1 (ассоциирован с латеральными элементами СК) и ZYP1 (белок поперечных филаментов СК) препараты инкубировали с соответствующим набором первичных и вторичных антител и исследовали на флуоресцентном микроскопе Axio Imager D1 (Carl Zeiss), оснащённом камерой AxioCam HRm. Хроматин окрашивали DAPI.

*Первичные антитела:* кроличьи антитела против белка ASY1 *Arabidopsis thaliana* (разведение 1:250), крысиные антитела против белка ZYP1 *A. thaliana* (1:150).

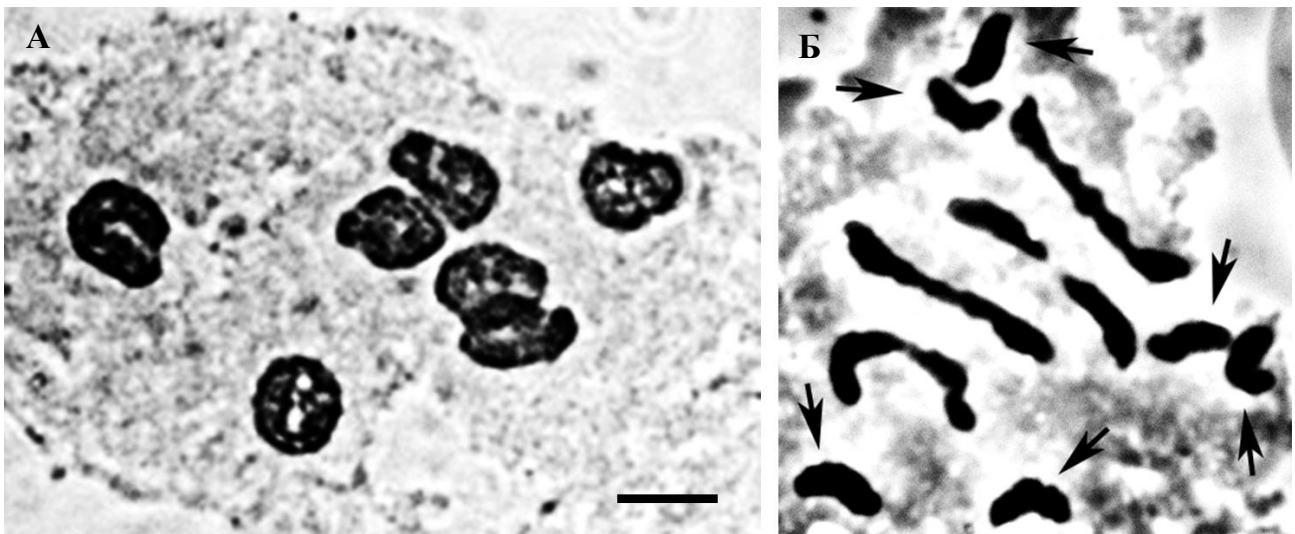
*Вторичные антитела:* козы антитела против IgG кролика, конъюгированные с Cy3 (1:300), либо с FITC (1:500); козы антитела против IgG крысы, конъюгированные с Alexa 546 (1:500), куриные антитела против IgG крысы, конъюгированные с FITC (1:400).

Первичные антитела предоставлены Л.А. Чельшевой (INRA – AgroParisTech, Centre de Versailles – Grignon, Франция), вторичные антитела – коммерческие (“Jackson”, “Santa Cruz Biotechnology”). Иммуноокрашивание проводили по методу Armstrong *et al.* (2002) с небольшими модификациями.

**Молекулярно-генетический анализ.** ДНК выделяли из молодых листьев с использованием СТАВ-метода (Bernatzky, Tanksley, 1986). В работе с растениями из семьи, расщепляющейся по мутации *sy9* был использован SSR-маркер *Xgwm132-2R*, локализованный в прицентромерной области длинного плеча хромосомы 2R (Khlestkina *et al.*, 2004) и тесно сцепленный с мейотическим геном *Sy9* (Мальшев *и др.*, 2009). Последовательность праймеров была взята из базы данных GrainGenes (<http://wheat.pw.usda.gov/GG3/>). Праймеры синтезировали в компании “Синтол”. ПЦР проводили на амплификаторе Bio-Rad Tetrad 2 при следующих режимах : 5 мин 94°C; 34 цикла 30 сек 94°C, 30 сек 58 °C, 30 сек 72°C; 10 мин 72°C. Электрофорез продуктов амплификации проводили в 2,5% агарозном геле, содержащем 0,5М TBE. Изображения получали с помощью цифровой фотокамеры Gel Doc XR (Bio-Rad).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

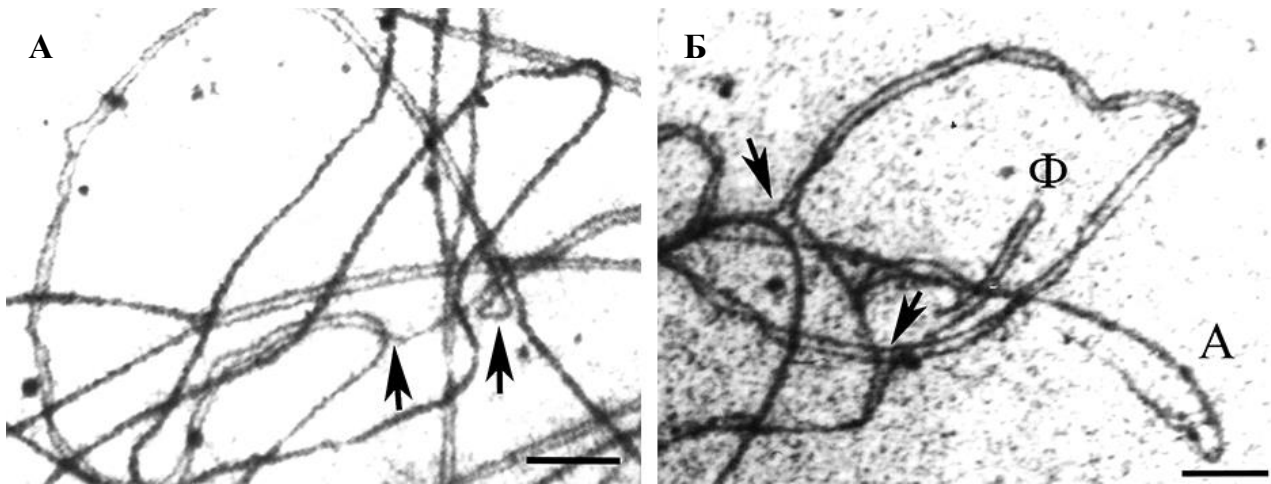
**Изучение наследования и проявления мейотической мутации *sy11*.** Работа проводилась в трёх последовательных поколениях от самоопыления ( $I_6 - I_8$ ) в линии ржи *Mc11*, в которой мутация *sy11* была впервые обнаружена. Суммарно нами изучено 109 растений из потомств гетерозигот, из них 84 были с нормальным мейозом (дикий тип) и 25 с нарушенным мейозом (мутанты *sy11*). Соотношение соответствовало менделевскому 3:1 ( $\chi^2_{3:1} = 0.25$ ,  $P = 0.617$ ). Также, были изучены потомства от самоопыления полустерильных мутантных растений. Все растения в таких потомствах имели мутантный цитологический фенотип. Таким образом, мутация *sy11* наследовалась рецессивно и моногенно.



**Рисунок 1.** Диакинез у растений ржи дикого типа (А) и метафаза I у мейотических мутантов *sy11* (Б): А – 7 закрытых бивалентов, Б – 4 открытых бивалента и 6 унивалентов. Масштабный отрезок – 5 мкм.

Очевидный цитологический дефект, вызываемый мутацией *sy11* – наличие унивалентов в метафазе I (рис. 1). Количество унивалентов в различных мейоцитах варьировало от 0 до 10, среднее их число составило  $2,2 \pm 0,06$  на мейоцит ( $n = 980$ ). Хиазмообразование у мутантов *sy11* оказалось снижено в 1,5 раза по сравнению с диким типом. В результате электронно-микроскопического анализа профазы I у мутантов *sy11* наряду с гомологичным был выявлен негомологичный синапсис. Он проявлялся в смене партнёров спаривания (“переключения”) и синапсисе осевых элементов хромосом на себя (“складки”) (рис. 2).





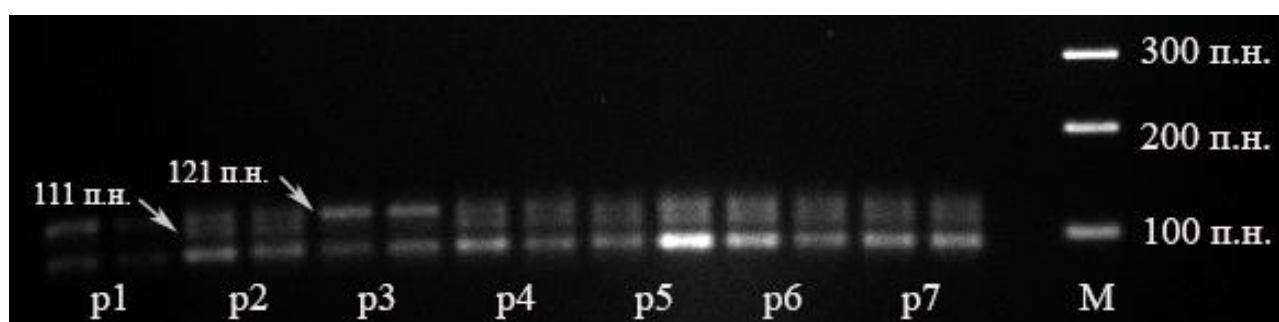
**Рисунок 2.** Гетерологичный синапсис в распластанных ядрах мейоцитов мутантов *sy11*: **А** – два “переключения” партнёров спаривания в зиготене, **Б** – сложная аномальная ассоциации латеральных элементов СК в пахитене. Отмечены “переключения” (стрелки), “складка” (Ф) и обширная зона асинапсиса (А). Масштабные отрезки – 1 мкм.

**Таблица 1.** Динамика событий негомологичного синапсиса в профазе I у мейотических мутантов *sy11*

	Средняя зиготена	Поздняя зиготена, ранняя и средняя пахитена	Поздняя пахитена и ранняя диплотена
Изучено клеток, шт.	14	19	7
Нарушений в среднем на клетку, шт.	0.5	3.4	1.9
Двухсторонний t-критерий	$t_{1-2} = 5.54 > t_{0.05} = 2.07$		
		$t_{2-3} = 2.44 > t_{0.05} = 2.07$	
	$t_{1-3} = 3.09 > t_{0.05} = 2.30$		

Для оценки динамики нарушений по стадиям мы сформировали три выборки клеток: (1) средняя зиготена; (2) поздняя зиготена, ранняя и средняя пахитена; (3) поздняя пахитена и ранняя диплотена (**табл. 1**). Различия оказались достоверны для всех трёх пар сравнения на 95% уровне значимости. Цитологически данный результат можно интерпретировать следующим образом. Проявление мутации наблюдается уже на стадии средней зиготены, когда видны единичные нарушения в строении СК, которые только начинают формироваться. По мере увеличения общей длины СК, число нарушений увеличивается. Во время длительной стадии пахитены постепенно снижается среднее число дефектов на клетку, за счёт коррекции синапсиса, и к стадиям поздней пахитены – ранней диплотены снижение становится достоверным.

**Ревизия цитологического фенотипа мейотических мутантов *sy9*.** Для сильных асинаптических мутантов *sy9* существовала проблема несоответствия цитологических картин в профазе I и метафазе I. В метафазе I у этих мутантов в 2/3 мейоцитов наблюдаются только униваленты. Однако в 1/3 клеток стабильно наблюдаются биваленты, число которых варьирует. Можно предположить, что у растений, имеющих биваленты в метафазе I, в профазе I должны присутствовать хотя бы короткие участки СК. Однако даже коротких фрагментов СК у мутантов *sy9* в предыдущих исследованиях не было обнаружено, и цитологический фенотип мутации был классифицирован как полностью асинаптический (Соснихина и др., 1998). Нашей задачей стало согласование картин мейоза в профазе I и метафазе I у мутантов *sy9*.



**Рисунок 3.** Фрагмент электрофореграммы продуктов амплификации SSR-маркера *Xgwm132* на растениях из потомства растения №321/21 (+/*sy9*). Растения №1 и №3 – рецессивные гомозиготы (*sy9/sy9*). Остальные пять растений – гетерозиготы (+/*sy9*).

**Таблица 2.** Анализ расщепления по мутации *sy9* в потомствах F<sub>3</sub> и F<sub>4</sub>

Поколение	Общее количество растений	Количество гомозигот +/+	Количество гетерозигот +/ <i>sy9</i>	Количество гомозигот <i>sy9/sy9</i>	$\chi^2_{1:2:1}$	P
F <sub>3</sub>	15	0	12	3	-	-
F <sub>4</sub>	30	5	15	10	1.67	0.434
$\Sigma$	45	5	27	13	4.64	0.098

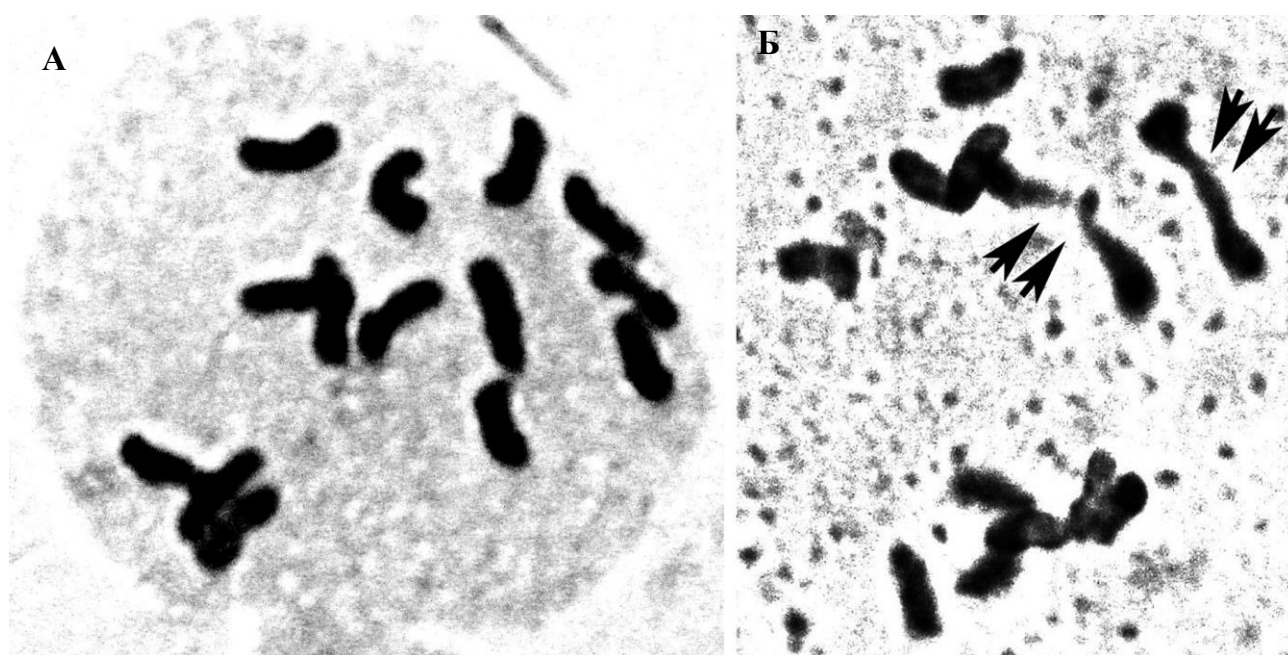
$$\chi^2_{0,05} = 5,99 \text{ (d.f. = 2)}$$

Наше исследование мы проводили на растениях F<sub>3</sub> и F<sub>4</sub> от скрещивания гетерозиготного по мутации *sy9* растения с растением из маркерной линии (без мейотических мутаций). Ранее С.В. Малышевым и соавторами (2009) ген *Sy9* был картирован в прицентромержной области длинного плеча хромосомы 2R и было установлено абсолютное сцепление гена *Sy9* с двумя SSR-локусами. Для нашего анализа мы провели генотипирование растений с использованием SSR-маркера *Xgwm132* (рис. 3 и табл. 2). Аллель SSR-локуса длиной 111 п.н. сцеплен с аллелем

дикого типа гена *Sy9*, длиной 121 п.н. – с мутантным аллелем *sy9* (Малышев и др., 2009).

С помощью маркера *Xgwm132* удалось идентифицировать гомозиготы по аллелю дикого типа, гомозиготы по мутантному аллелю и гетерозиготы. Соотношение генотипов не отличалось от ожидаемого 1:2:1 (табл. 2). Выявленные рецессивные гомозиготы *sy9/sy9* были подвергнуты нами подробному цитологическому анализу.

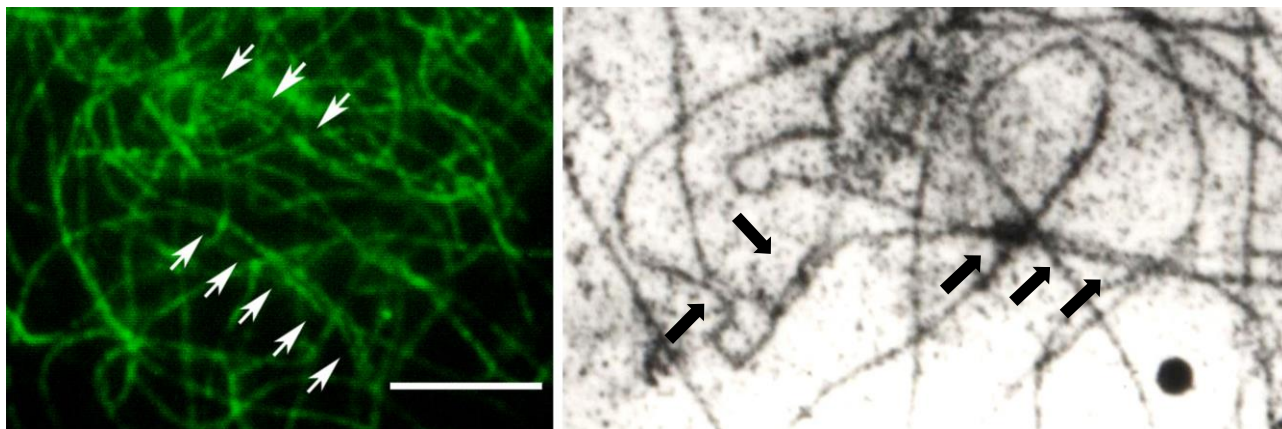
В метафазе I у мутантов *sy9* большинство мейоцитов не содержало бивалентов (рис. 4). Среднее число унивалентов составило  $13,1 \pm 0,19$  на клетку ( $n = 272$ ). Единичные биваленты встречались только в 30% клеток. Уровень хиазмообразования у мутантов оказался снижен примерно в 30 раз по сравнению с нормой.



**Рисунок 4.** Метафаза I у рецессивных гомозигот *sy9/sy9*: А – 14 унивалентов, Б – 2 открытых бивалента (показаны двойными стрелками) и 10 унивалентов.

Ревизию цитологической картины профазы I у мутантов *sy9* мы начали с иммунофлуоресцентного анализа распределения белка ASY1. Первая обнаруженная нами особенность мутантов *sy9* – незавершённая загрузка этого белка на оси мейотических хромосом. Наблюдалось диффузное распределение сигнала, пунктирная загрузка ASY1 на хромосомные оси, фрагментация осей в 50,6% мейоцитов ( $n = 85$ ). В остальных мейоцитах удалось проследить сформированные оси. Такие мейоциты были взяты для дальнейшего изучения профазы I. Асинаптический фенотип мутации начинал проявляться со стадии, аналогичной зиготене при нормальном мейозе. В отличие от растений дикого типа, у которых на этой стадии начинается спаривание хромосом во множественных сайтах, у мутантов *sy9* такой инициации спаривания не наблюдалось. На стадии, аналогичной пахитене, в мейоцитах мутантов присутствовали неспаренные осевые элементы хромосом. При подробном изучении стадий, аналогичных зиготене-пахитене, в мейоцитах мутантов

*sy9* мы обнаружили короткие спаренные участки хромосом (рис. 5, А). Среднее число таких участков составило  $2,1 \pm 0,27$  ( $n = 14$ ) на мейоцит. При электронно-микроскопическом анализе тех же стадий нами были выявлены короткие фрагменты СК (рис. 5, Б), их среднее число составило  $0,8 \pm 0,37$  на клетку ( $n = 5$ ).

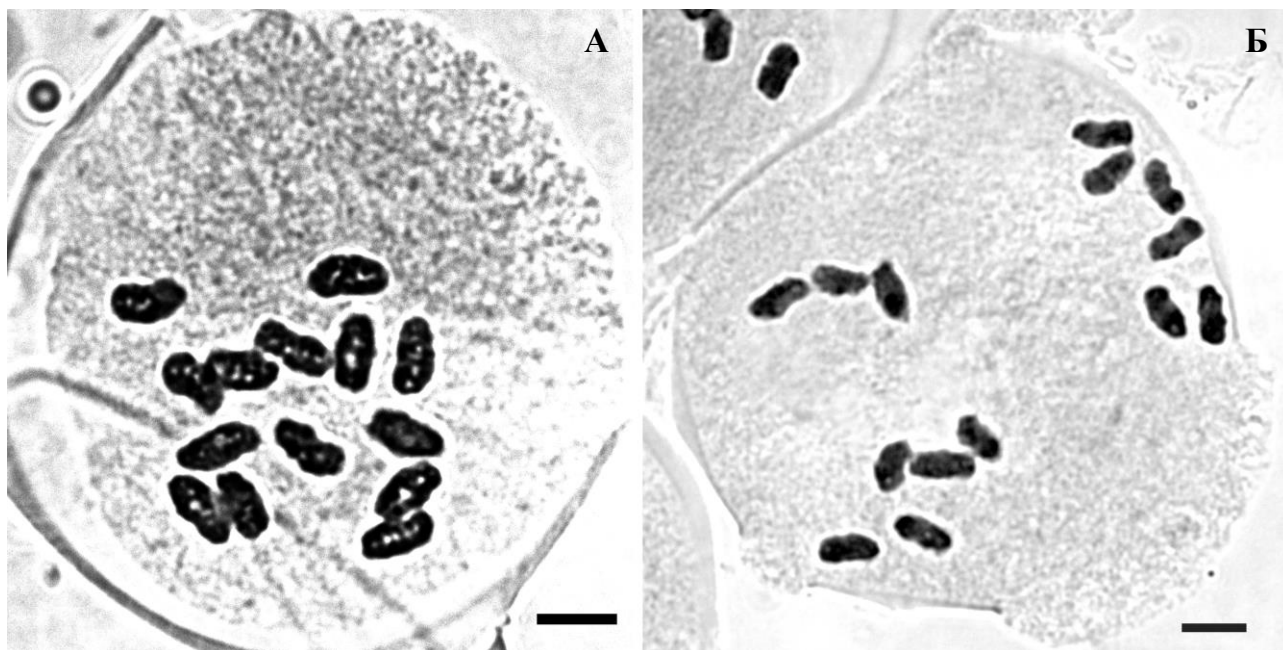


**Рисунок 5.** Фрагменты распластанных ядер мейоцитов асинаптических мутантов *sy9* на стадии, аналогичной зиготене – пахитене при нормальном мейозе: **А** - иммунофлуоресцентное выявление белка ASY1 (стрелками показаны спаренные участки хромосом), **Б** – электронно-микроскопической фотография (стрелками показаны короткие фрагменты СК).

Количество обнаруженных фрагментов СК в профазе I соответствует среднему числу хиазм на мейоцит в метафазе I ( $0,4 \pm 0,06$ ,  $n = 272$ ). Таким образом, мы установили, что цитологические картины мейоза в профазе I соответствует тому, что ожидалось на основе предшествующих наблюдений в метафазе I у мутантов *sy9*. На стадии, аналогичной зиготене-пахитене, в мейоцитах мутантов присутствуют единичные короткие фрагменты СК. На их основе могут происходить события рекомбинации и хиазмообразования, приводящие к появлению редких бивалентов в метафазе I.

**Иммунофлуоресцентный анализ распределения белков ASY1 и ZYP1 в мейоцитах мутантов *sy1* и *sy19*.** В предыдущих исследованиях было установлено, что мутация *sy1* вызывает полный асинапсис хромосом: формирование СК полностью подавлено (Sosnikhina *et al.*, 2005; Соснихина *и др.*, 1992). Мутация *sy19* приводит к гетерологичному синапсису хромосом, который выражается в смене партнёров спаривания, синапсису хромосом “на себя” и сопровождается обширными зонами асинапсиса (Соснихина *и др.*, 2001). Мы предположили, что дефекты синапсиса у этих мутантов могут быть связаны с нарушением загрузки структурных белков синоптономных комплексов на оси мейотических хромосом. Для проверки этого предположения мы провели сравнительный иммунофлуоресцентный анализ распределения белков ASY1 (ассоциирован с латеральными элементами СК) и ZYP1 (белок поперечных филаментов СК) в мейоцитах этих мутантов.

Наследование мутаций в изученных потомствах не отличалось от моногенного и рецессивного. Цитологический анализ метафазы I показал, что у мутантов *sy1* хиазмобразование почти отсутствует ( $13,98 \pm 0,016$  унивалентов на мейоцит,  $n = 125$ ), у мутантов *sy19* оно оказалось снижено примерно в 50 раз по сравнению с нормой ( $13,49 \pm 0,254$  унивалентов на мейоцит,  $n = 76$ ) (рис. 6).

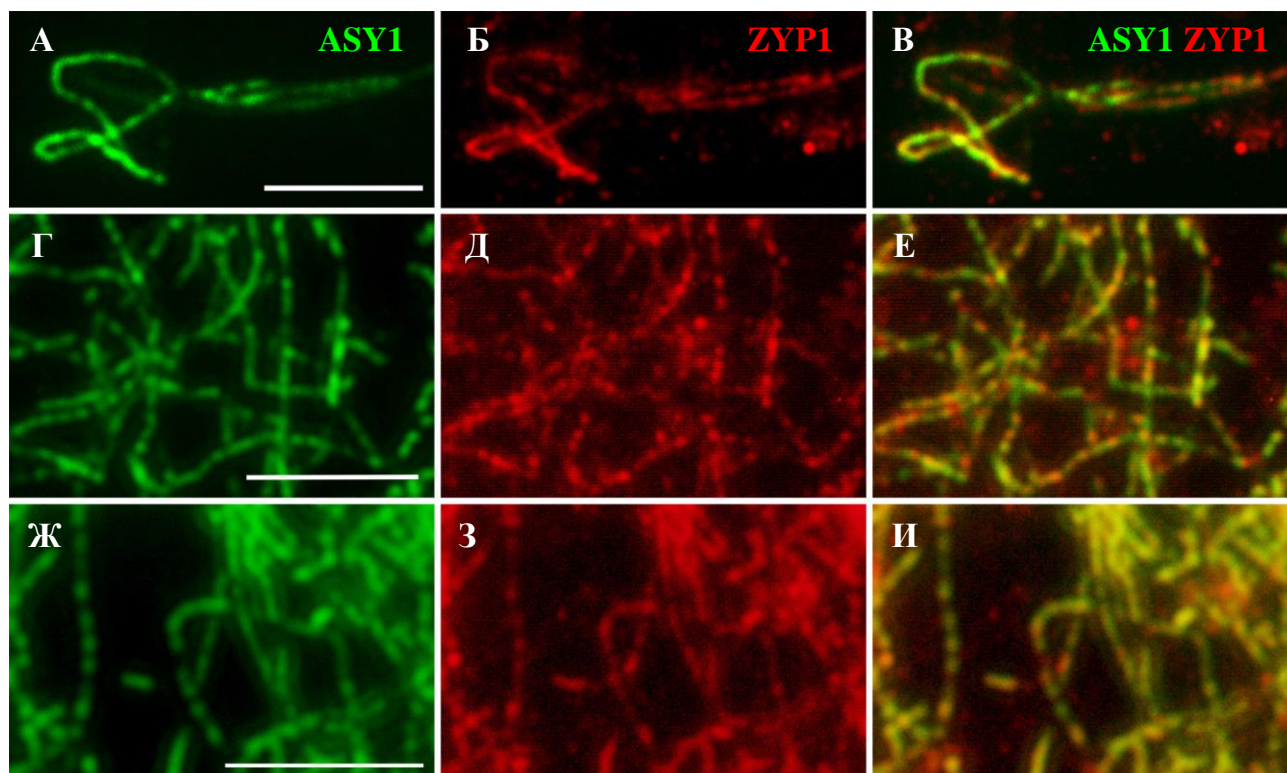


**Рисунок 6.** Метафаза I у мейотических мутантов *sy1* (А) и *sy19* (Б). В двух клетках наблюдается 14 унивалентов. Масштабные отрезки – 5 мкм.

Иммунофлуоресцентный анализ (рис. 7) показал, что строение осей профазных хромосом не отличается у растений ржи дикого типа и обоих мутантов. Мы не обнаружили отличий в распределении белков ASY1 и ZYP1 у мутантов по сравнению с диким типом: оба белка присутствуют на осях хромосом в количествах сравнимых с растениями дикого типа. Наше предположение не подтвердилось, дефекты синапсиса у мутантов *sy1* и *sy19* не связаны с загрузкой в хромосомы белков ASY1 и ZYP1 в профазе I.

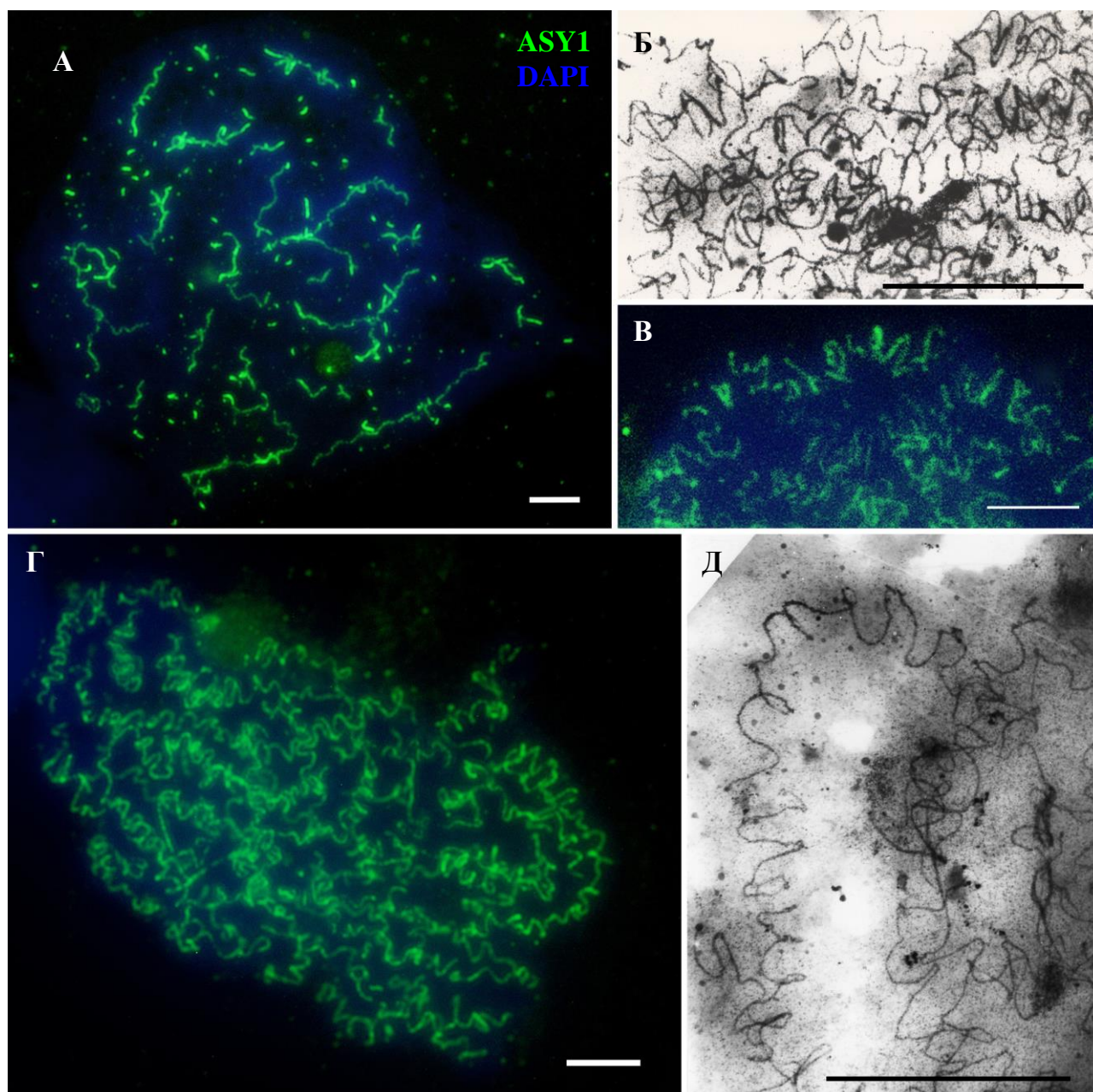
Ранее Е.И. Михайловой и соавторами (2010) на основе анализа растений дикого типа и мутантов *sy10* была предложена модель загрузки белков ASY1 и ZYP1 на оси мейотических хромосом у ржи. Согласно этой модели загрузка ZYP1 происходит ещё до начала синапсиса, что является уникальной особенностью мейоза ржи. Кроме того, наличие ZYP1 не является достаточным условием для формирования СК, для объединения линейных треков ZYP1 в структуру центрального элемента необходим дополнительный, пока неизвестный, фактор. В нашей работе мы получили идентичные данные по распределению белков ASY1 и ZYP1 при нормальном мейозе и обогатили модель данными по распределению этих белков у мутантов *sy1* и *sy19*, для которых совместное выявление ASY1 и ZYP1 было проведено впервые. Таким образом, наша работа является первым подтверждением модели Е.И. Михайловой и соавторов.





**Рисунок 7.** Распределение белков ASY1 (зелёный) и ZYP1 (красный) в распластанных ядрах мейоцитов растений ржи дикого типа (А - В) и мейотических мутантов *sy1* (Г - Е) и *sy19* (Ж - И). Масштабные отрезки – 5 мкм.

**Сравнительный цитологический анализ стадии диплотены у растений дикого типа и мейотических мутантов *sy1*, *sy9*, *sy11* и *sy19*.** Выделение исследования стадии диплотены в отдельный раздел было сделано по следующим соображениям. Во-первых, о процессах сборки СК, его структуре и функционировании известно уже достаточно много, исследование этих вопросов активно продолжается во многих лабораториях по всему миру. В противовес этому, о процессах разборки СК и его поведении на завершающих стадиях профазы I известно сравнительно мало. Между тем, знание того каким образом происходит разборка СК поможет получить дополнительную информацию о его структуре и приблизиться к более полному пониманию вопросов динамики и функционирования СК. Во-вторых, в ходе предыдущих исследований СК ржи в лаборатории цитогенетики ИОГен было показано, что рожь является одним из немногих объектов, у которых доступна для анализа картина деградирующих СК на завершающих стадиях профазы I. Благодаря модификации метода окрашивания препаратов ранее были получены оригинальные данные о трансформации ультраструктурных компонентов СК на стадии диплотены (Fedotova *et al.*, 1989). В нашей работе мы продолжили детальное изучение стадии диплотены у ржи дикого типа и у мейотических мутантов *sy11*, *sy9*, *sy1* и *sy19*.



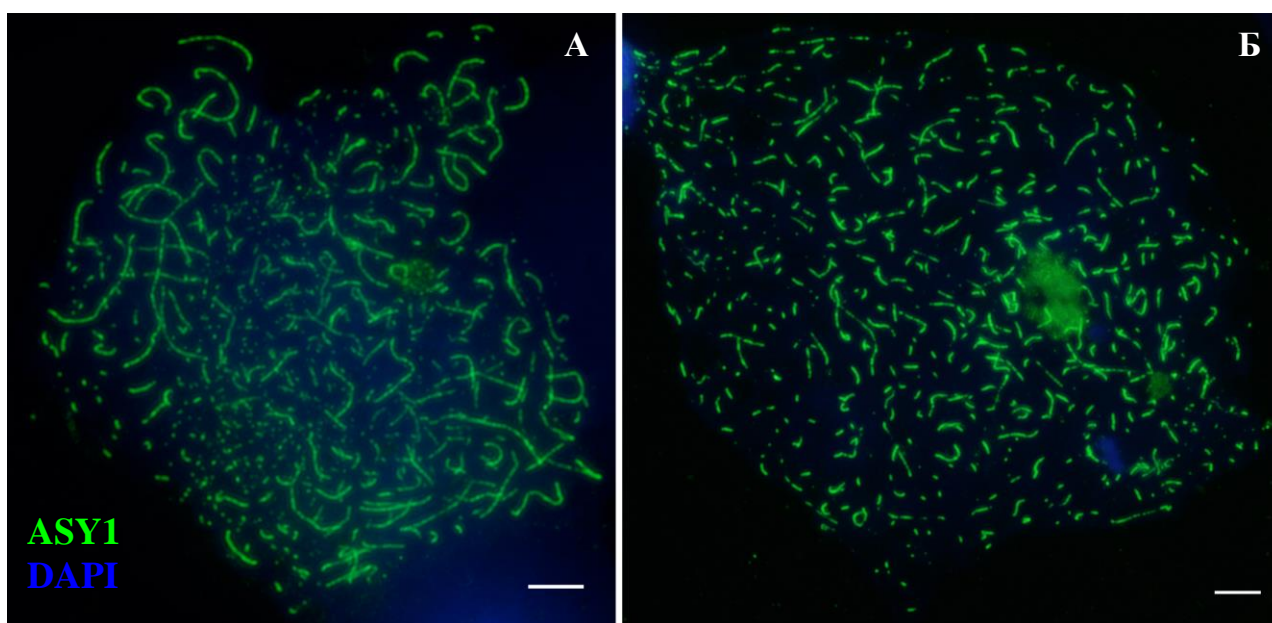
**Рисунок 8.** Спирализация компонентов деградирующих синаптонемных комплексов у растений ржи дикого типа (А - В) и спирализация неспаренных осевых элементов хромосом у асинаптических мутантов *sy9* (Г, Д) в распластанных ядрах мейоцитов на стадии диплотены: А, В, Г – иммунофлуоресцентное выявление белка ASY1 (хроматин окрашен DAPI); Б, Д – фрагменты электронно-микроскопических фотографий. Масштабные отрезки – 5 мкм.

В ходе предыдущих исследований Ю.С. Федотовой и соавторами (Fedotova *et al.*, 1989; Коломиец *и др.*, 2001) была предложена модель событий при деградации СК. Согласно модели, при отталкивании латеральных элементов СК в ходе диплотены появляются белковые спирали – остатки латеральных элементов. Это заключение было сделано на основе электронной микроскопии монохромно окрашенных СК и требовало доказательств. Такое доказательство было получено нами в результате анализа распределения белка ASY1 методом иммунофлуоресценции. ASY1 служит маркером латеральных элементов СК. Мы



зарегистрировали полностью идентичные картины поведения хромосом, выявленных методами иммуноцитохимии и электронной микроскопии, что надёжно доказывает происхождение спирализованных структур из латеральных элементов СК и их белковую природу (**рис. 8, А - В**).

У мутантов *sy11* поведение деградирующих СК не отличалось от случая дикого типа. Происходило выпетливание латеральных элементов из структуры СК и постепенная спирализация и деградация этих спиральных структур.



**Рисунок 9.** Фрагментация осевых элементов хромосом в распластанных ядрах мейоцитов у мейотических мутантов *sy1* (А) и *sy19* (Б) на стадии диплотены. Масштабные отрезки – 5 мкм.

У мутантов *sy9* наблюдалась ярко выраженная спирализация деградирующих неспаренных осевых элементов хромосом, которая обнаруживалась как при электронно-микроскопическом, так и при иммунофлуоресцентном исследовании (**рис. 8, Г, Д**). У мутантов *sy1* и *sy19* не выявлялась спирализация компонентов деградирующих белковых осей хромосом, происходила постепенная фрагментация осей до полного их исчезновения из кариоплазмы (**рис. 9**). Различное поведение деградирующих осей мейотических хромосом у мутантов по сравнению с нормой – более выраженная спирализация у мутантов *sy9* и её отсутствие у мутантов *sy1* и *sy19* – может свидетельствовать о различных структурных особенностях осей профазных хромосом у этих мутантов.



## ОБСУЖДЕНИЕ

Наше исследование стало продолжением цикла работ, посвящённых изучению мейотических мутантов ржи из Петергофской генетической коллекции (Sosnikhina *et al.*, 2005; Соснихина *и др.*, 2005). Благодаря использованию методов световой и электронной микроскопии, а также применению иммунофлуоресцентного подхода для выявления мейоз-специфических белков, мы получили оригинальные данные о проявлении мейотических мутаций *sy1*, *sy9*, *sy11* и *sy19*.

Мейотическую мутацию *sy11* мы классифицировали как мутацию гетерологичного синапсиса. Результатом нарушений гомологичности синапсиса у этих мутантов является снижение уровня хиазообразования (в 1,5 раза по сравнению с нормой), широкий спектр аномалий в первом и втором делениях мейоза и, как следствие, пониженная фертильность (в 5 раз по сравнению с нормой). Мутация *sy11* является восьмой по времени описания мутацией ржи с гетерологичным синапсисом хромосом, при этом она является самой слабой (по силе проявления нарушений) из них. Мутации гетерологичного синапсиса широко изучаются в зарубежных лабораториях, однако первичный дефект таких мутаций на сегодняшний день удалось установить не для всех случаев. Известно, что мутация *phs1* кукурузы нарушает загрузку ранних ферментов рекомбинации на хромосомные оси, следствием чего является нарушение гомологии спаривания хромосом. Гетерологичный синапсис хромосом был обнаружен у мутантов *rad51* и *dmc1* арабидопсиса и кукурузы. Одним из факторов, обеспечивающих гомологичное узнавание хромосом, является запуск процессов рекомбинации. Однако, в целом, знания о механизмах узнавания гомологичными хромосомами друг друга остаются неполными. Практическая значимость изучения таких мутаций заключается в потенциальной возможности их включения в селекционные программы с целью расширения разнообразия исходного материала с помощью рекомбинации между негомологичными сегментами хромосом. В свете этого, изученная нами мутация *sy11* представляет интерес. Она характеризуется регулярным, но невысоким уровнем негомологичного синапсиса, что оставляет возможность для завязывания семян, т.е. является полустерильной.

С целью приблизиться к пониманию первичных дефектов, вызываемых другой мутацией гетерологичного синапсиса *sy19* и асинаптической мутацией *sy1*, мы использовали иммунофлуоресцентный анализ для выявления структурных белков синаптонемных комплексов ASY1 и ZYP1, антитела к которым нам были доступны. Проанализировав данные литературы, мы предположили, что у мутантов *sy1* и *sy19* может быть нарушена загрузка этих белков в ядра мейоцитов и/или их распределение на хромосомных осях. Известно, что отсутствие белка ASY1 приводит к асинапсису хромосом у арабидопсиса и риса (Caryl *et al.*, 2000; Nonomura *et al.*, 2004), в то время как нарушения в загрузке белка ZYP1 приводит к гетерологичному синапсису хромосом у арабидопсиса (Higgins *et al.*, 2005). Однако мы не зарегистрировали различий в загрузке и распределении ни ASY1, ни ZYP1 у мутантов *sy1* и *sy19* ржи по сравнению с диким типом. Мы заключили, что цитологические дефекты, вызываемые этими мутациями, не связаны с повреждением белков ASY1 и ZYP1.

Очевидно, что цитологические фенотипы мутантов *sy1* и *sy19* определяются другими факторами, которые пока остаются неизвестными.

Загрузка белка ASY1 в ядра мейоцитов нарушена у другой изученной в нашей работе формы ржи – у асинаптических мутантов *sy9*. В половине исследованных мейоцитов этих мутантов наблюдался дефицит ASY1 на хромосомных осях. Наш результат соответствует данным, полученным Е.И. Михайловой и соавторами, изучавшими проявление мутации *sy9* на другом генетическом фоне (Михайлова *и др.*, 2010; Ловцюс *и др.*, 2009). Таким образом, дефицит ASY1 на хромосомных осях – наиболее ранний из известных на данный момент дефектов, вызываемых мутацией *sy9*. Однако сила проявления мутации варьирует в разных клетках. В половине изученных нами мейоцитов мы обнаруживали сформированные хромосомные оси. В таких мейоцитах мы зарегистрировали регулярные единичные события спаривания и синапсиса хромосом (хотя большинство осевых элементов хромосом оставались асинаптированными). Факт обнаружения нами коротких фрагментов СК в мейоцитах мутантов *sy9* является оригинальным результатом. Он согласует цитологические картины мейоза у этих мутантов: редкие, но регулярные фрагменты синаптонемных комплексов в профазе I и единичные хиазмы в 30% мейоцитов в метафазе I.

Другим важным результатом работы стало совершенствование наших знаний о преобразовании осей мейотических хромосом ржи на стадии диплотены. Во-первых, мы установили, что выявленные в предыдущих исследованиях спирализованные структуры являются продуктами деградации латеральных элементов синаптонемных комплексов и имеют белковую природу. Во-вторых, сравнительный анализ стадии диплотены у мейотических мутантов позволил выявить принципиальные различия. У растений дикого типа и мутантов *sy9* и *sy11* происходит спирализация компонентов осей мейотических хромосом, в то время как у мутантов *sy1* и *sy19* такой спирализации не происходит и наблюдается фрагментация осей. Мы заключили, что спирализация компонентов латеральных элементов является естественным (дикий тип) событием для стадии диплотены у ржи. С одной стороны, такое преобразование соответствует смене способа компактизации хроматина между стадиями пахитены и метафазы I, при которой биваленты укорачиваются, и хроматин в них оказывается уложенным по спирали (Stack, Anderson, 2001). С другой стороны, спирализация структурных компонентов СК говорит об особенностях его ультраструктуры. Наши наблюдения подтверждают модель организации синаптонемного комплекса, при которой в состав латерального элемента входят две спирально-закрученные белковые нити, которые соответствуют двум сестринским хроматидам в составе профазной мейотической хромосомы (Богданов, Коломиец, 2007).

Для мутантов *sy9* характерна более выраженная спирализация хромосомных осей в диплотене. Это может быть следствием нарушения укладки спирально-закрученных белковых нитей в составе осевых элементов хромосом. Факт того, что осевые элементы хромосом у мутантов *sy9* испытывают недостаток белка ASY1, укрепляют нас в этом мнении. Белок ASY1 содержит в своём составе домен HORMA, который отвечает за структурирование хроматина и взаимодействие с другими

белками у дрожжей, животных и растений (Rosenberg, Corbett, 2015; Muniyappa *et al.*, 2014). Отсутствие спирализации белковых осей у мутантов *sy1* и *sy19* также может говорить о другом их составе. Оси профазных мейотических хромосом имеют сложную структуру, в их состав входит несколько структурных и регуляторных белков. Полный спектр таких белков на сегодняшний день не известен даже у модельных объектов. Возможно, что нехватка одного из таких компонентов и определяет цитологические фенотипы мутантов *sy1* и *sy19*.

### ВЫВОДЫ

1. Впервые установлено, что мейотическая мутация *sy11* вызывает гетерологичный синапсис хромосом. Цитологический фенотип мутации – аномалия синапсиса хромосом в профазе I мейоза: “переключения” партнёров спаривания и “складки” латеральных элементов синаптонемных комплексов “на себя”. Максимум таких нарушений наблюдается в поздней зиготене – средней пахитене. Мутация наследуется моногенно и рецессивно.

2. Впервые выявлено, что в профазе I у сильных асинаптических мутантов *sy9*, имеющих единичные хиазмы в 30% клеток на стадии метафазы I, присутствуют короткие фрагменты синаптонемных комплексов.

3. В мейоцитах мутантов *sy1* и *sy19* ржи наблюдаются нормальная загрузка белков ASY1 и ZYP1 на оси мейотических хромосом, как и в растениях дикого типа, и причина асинапсиса хромосом в профазе I у этих мутантов не может быть связана с этими белками.

4. Спирализованные структуры, которые наблюдаются в кариоплазме мейоцитов ржи на стадии диплотены и предварительно квалифицированные как остатки синаптонемных комплексов, иммуноокрашиваются антителами против белка ASY1 и, таким образом, являются белковыми продуктами деградации латеральных элементов синаптонемных комплексов.

5. Имеют место качественные различия в процессах естественной деградации осей мейотических хромосом на стадии диплотены мейоза у различных мутантов ржи. У растений дикого типа и у мутантов *sy9* и *sy11* наблюдается спирализация белковых нитей-компонентов деградирующих хромосомных осей. У мутантов *sy1* и *sy19* такая спирализация не выявляется, вместо этого происходит фрагментация неспаренных осей мейотических хромосом.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. **Голубцов, С.В. (Симановский, С.А.)** Полустерильный мейотический мутант *sy11* ржи *Secale cereale* L. с гетерологичным синапсисом хромосом / **С. В. Голубцов (С. А. Симановский)**, С. П. Соснихина, И. В. Иорданская, А. В. Войлоков, Е. И. Михайлова, О. Л. Коломиец, Ю. Ф. Богданов // Генетика – 2010. – Т. 46. – № 6. – С. 774-781.
2. **Симановский, С. А.** Спирализованные структуры латеральных элементов синаптонемных комплексов на стадии диплотены мейоза у ржи содержат белок ASY1 / **С. А. Симановский**, С. Н. Матвеевский, И. В. Иорданская, В. Е. Спангенберг, О. Л. Коломиец, Ю. Ф. Богданов // Генетика – 2014. – Т. 50. – № 10. – С. 1249-1253.

### Тезисы докладов и материалы конференций:

1. **Голубцов, С. В. (Симановский, С. А.)** Мейотический мутант *synaptic11* ржи *Secale cereale* L. / **С. В. Голубцов (С. А. Симановский)**, И. В. Иорданская // Материалы международной конференции “Хромосома 2009”, 31 августа – 6 сентября 2009 г. – Новосибирск, 2009.
2. **Голубцов, С. В. (Симановский, С. А.)** Мейотический мутант *sy11* ржи *Secale cereale* L. с гетерологичным синапсисом хромосом / **С. В. Голубцов (С. А. Симановский)** // Материалы международного молодёжного научного форума “Ломоносов-2010”. – М.: Макс Пресс, 2010.
3. Соснихина, С. П. Использование генетической коллекции мейотических мутантов ржи *Secale cereale* L. для изучения молекулярных механизмов мейоза / С. П. Соснихина, Е. И. Михайлова, А. В. Ловцюс, А. В. Войлоков, А. В. Лыхолай, **С.В. Голубцов (С. А. Симановский)**, И. В. Иорданская, Ю. Ф. Богданов // Биологическое разнообразие: Генофонды и генетическое разнообразие. Сборник материалов. М.: ИОГен, 2011. – 267 с.
4. Михайлова, Е. И. Молекулярно-цитогенетический анализ ключевых событий мейоза у ржи *Secale cereale* L. / Е. И. Михайлова, С. П. Соснихина, А. В. Толкачёва, **С. А. Симановский**, Ю. Ф. Богданов // Биологическое разнообразие: Генофонды и генетическое разнообразие. Сборник материалов. М.: ИОГен, 2011.
5. **Симановский, С. А.** Мейотический мутант *sy9* ржи *Secale cereale* L.: короткие фрагменты синаптонемных комплексов обеспечивают образование единичных хиазм / **С. А. Симановский** // Ломоносов-2012: XIX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных. Секция «Биология», 9-13 апреля 2012 г., Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет. Тезисы докладов. – М.: МАКС Пресс, 2012. – 304 с.
6. **Симановский, С. А.** Спирализованные белковые структуры в кариоплазме материнских клеток пыльцы ржи *Secale cereale* L. после деградации синаптонемных комплексов на стадии диплотены мейоза / **С. А. Симановский**, С. Н. Матвеевский, И. В. Иорданская, В. Е. Спангенберг, О. Л. Коломиец, Ю. Ф. Богданов // Тезисы докладов и сообщений, представленных на XVII Всероссийский симпозиум

«Структура и функции клеточного ядра». Цитология – 2014. – Т. 56. – № 9. – С. 639-693.

7. **Симановский, С. А.** Особенности загрузки белков ASY1 и ZYP1 в структуру мейотических хромосом ржи дикого типа и мейотических мутантов *sy1* и *sy19* / **С. А. Симановский**, И. В. Иорданская, О. Л. Коломиец, Ю. Ф. Богданов // Материалы международной конференции “Хромосома 2015”, 24-28 августа 2015 г. – Новосибирск, 2015.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность Ю.Ф. Богданову за научное руководство и бесценный опыт совместной работы. Благодарю зав. лаб. цитогенетики ИОГен РАН О.Л. Коломиец за разноплановую помощь на всех этапах работы и неиссякаемую поддержку.

Благодарю И.В. Иорданскую (Московский НИИСХ “Немичновка”) за квалифицированное обучение классическому цитогенетическому анализу и полевой работе с растениями. Благодарю С.Н. Матвеевского, В.Е. Спангенберга, И.С. Мажейку, М.М. Ацаеву, А.Г. Корноухову, А.А. Кашинцову, Т.М. Гришаеву, С.Я. Дадашева, Т.В. Сизову, В.Л. Чубыкина, (коллектив лаборатории цитогенетики ИОГен РАН) за помощь в освоении и содействие в применении экспериментальных методов работы с мейотическими хромосомами и активное обсуждение полученных результатов. Благодарю Л.А. Челышеву (INRA – AgroParisTech, Centre de Versailles – Grignon, Франция) за предоставленные антитела к белкам ASY1 и ZYP1 арабидопсиса. Благодарю А.А. Синюшина (МГУ им. М.В. Ломоносова), М.Г. Дивашука и Г.И. Карлова (РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева) за помощь в проведении молекулярно-генетического анализа растений. Благодарю Е.Д. Бадаеву и А.С. Рубан (ИОГен РАН) за консультирование в вопросах цитогенетики растений. Благодарю коллектив кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева во главе с зав. каф. А.А. Соловьёвым за разнообразную помощь и профессиональное общение.

Наконец, выражаю глубокую благодарность С.П. Соснихиной, А.В. Войлокову, Е.И Михайловой, А.В. Ловцюс (СПбГУ и Санкт-Петербургский филиал ИОГен РАН) за предоставленный семенной материал и плодотворное сотрудничество в изучении генетического контроля мейоза у ржи.