

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

На правах рукописи

Симановский Сергей Анатольевич

**Мейотические мутации ржи *Secale cereale* L.: анализ проявления и
использование для изучения механизмов мейоза**

03.02.07 – Генетика

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Богданов Юрий Фёдорович**

Москва

2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Генетический контроль мейоза: общие представления	9
1.2. Мейотические мутации растений	11
1.2.1. Дифференциация мейоцитов	11
1.2.2. Вступление в мейоз	11
1.2.3. Когезия сестринских хроматид и структура мейотических хромосом	12
1.2.4. Формирование фигуры “букета”	15
1.2.5. Мейотическая рекомбинация	15
1.2.6. Спаривание гомологичных хромосом	19
1.2.7. Сборка синаптонемного комплекса	20
1.3. Петергофская коллекция мейотических мутантов ржи	22
1.3.1. Мутации асинапсиса	22
1.3.2. Мутация незавершённого синапсиса	23
1.3.3. Мутации гетерологичного синапсиса	23
1.3.4. Мутации аномального строения латеральных элементов СК	24
1.3.5. Мутации неравномерной конденсации мейотических хромосом	25
1.3.6. Мутации сверхконденсации мейотических хромосом	25
1.3.7. Взаимодействие мейотических генов у ржи	26
1.3.8. Картирование мейотических генов ржи	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	28
2.1. Растительный материал	28
2.2. Свето-микроскопические исследования	28
2.2.1. Приготовление растворов для фиксации и окрашивания цитологического материала	28
2.2.2. Приготовление давленных препаратов	29
2.3. Электронно-микроскопические исследования	29
2.3.1. Подготовка предметных стёкол и растворов	29
2.3.2. Приготовление препаратов	30
2.3.3. Контрастирование препаратов и отбор клеток для исследования	31
2.4. Иммунофлуоресцентные исследования	31
2.4.1. Приготовление препаратов	31
2.4.2. Разведение антител	32
2.4.3. Иммуноокрашивание препаратов	32

2.4.3. Исследование препаратов на флуоресцентном микроскопе	33
2.5. Молекулярно-генетический анализ.....	34
2.5.1. Выделение ДНК.....	34
2.5.2. Полимеразная цепная реакция	34
2.5.3. Электрофорез	35
2.6. Критерии определения стадий мейоза	35
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	37
3.1. Изучение наследования и проявления мейотической мутации <i>sy11</i>.....	37
3.1.1. Наследование мутации.....	37
3.1.2. Свето-микроскопический анализ стадий мейоза	40
3.1.3. Электронно-микроскопический анализ профазы I	45
3.1.4. Обсуждение.....	49
3.2. Ревизия цитологического проявления мейотической мутации <i>sy9</i>	52
3.2.1. Свето-микроскопический анализ метафазы I	52
3.2.2. Молекулярно-генетический анализ	56
3.2.3. Анализ профазы I	61
3.2.4. Обсуждение.....	68
3.3. Иммунофлуоресцентный анализ распределения белков <i>ASY1</i> и <i>ZYP1</i> в мейоцитах мутантов <i>sy1</i> и <i>sy19</i>.....	74
3.3.1. Свето-микроскопический анализ метафазы I и наследование мутаций	74
3.3.2. Анализ профазы I	78
3.3.3. Обсуждение.....	83
3.4. Сравнительный цитологический анализ стадии диплотены у растений дикого типа и мейотических мутантов <i>sy1</i>, <i>sy9</i>, <i>sy11</i> и <i>sy19</i>.....	90
3.4.1. Трансформация латеральных элементов синаптонемных комплексов в диплотене у растений дикого типа.....	90
3.4.2. Диплотена у мейотических мутантов <i>sy11</i>	94
3.4.3. Спирализация осевых элементов хромосом в диплотене у мутантов <i>sy9</i>	94
3.4.4. Фрагментация осевых элементов хромосом в диплотене у мутантов <i>sy1</i> и <i>sy19</i>	97
3.4.5. Обсуждение.....	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
ВЫВОДЫ.....	108
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	110

ВВЕДЕНИЕ

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).

Исследование генетического контроля мейоза имеет как фундаментальное, так и прикладное значение. С помощью мейотических мутаций возможно поэтапно анализировать общий ход мейоза и изучать молекулярную основу его элементарных событий. С другой стороны, знания о мейотических мутациях могут быть полезны для решения конкретных прикладных задач. Есть сообщения об использовании мейотических мутаций растений в селекционном процессе (Dirks *et al.*, 2009). Кроме того, мейотические мутации обнаружены у человека. Как и у растений, они приводят к стерильности (Handel, Schimenti, 2010). В связи с этим изучение генетического контроля мейоза является актуальной и перспективной областью биологических исследований.

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. Для растений существуют коллекции кукурузы, арабидопсиса и риса, которые активно анализируются исследователями мейоза из США, Европы, Японии и Китая. 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, иммунофлуоресцентного анализа, двугибридного анализа белков, анализ экспрессии генов, 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 проявления 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 *su11* 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 синаптомемных комплексов *ASY1* и *ZYP1* в мейоцитах этих мутантов и растений ржи дикого типа.

4. Для изучения заключительных этапов временного существования синаптомемных 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 синаптомемных 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 мейотически хромосом.

Проведён сравнительный анализ картин преобразования осей мейотический хромосом на стадии диплотены у мейотических мутантов *sy1*, *sy9*, *sy11* и *sy19*. Сочетание электронно-микроскопических и иммунофлуоресцентных исследований мейоцитов 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 СК 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 растений, поэтому они поддерживаются в гетерозиготном состоянии (Соснихина *и др.*, 1994; Sosnikhina *et al.*, 2005). 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 на этой стадии, в то время как мутанты характеризуются наличием варьирующего числа унивалентов, что говорит о нарушении процессов спаривания гомологичных хромосом. Для выявления мутантов *su9* также было проведено молекулярное генотипирование растений с использованием SSR-маркера *Xgwm132*, который имеет тесное сцепление с геном *Sy9* (Мальшев *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.

Свето-микроскопический анализ стадий мейоза проводили на давленных ацетокарминовых препаратах материнских клеток пыльцы (МКП), приготовленных классическим способом (Паушева, 1988; Пухальский *и др.*, 2007). Для электронно-микроскопического и иммунофлуоресцентного анализа профазы I мейоза МКП спредировали с помощью гипотонического шока на поверхности раствора сахарозы по методу Гилиса в модификации лаборатории цитогенетики ИОГен РАН (Gillies, 1981; Fedotova *et al.*, 1989; Симановский *и др.*, 2014). Препараты фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида (4%). Для электронно-микроскопического исследования препараты контрастировали раствором азотнокислого серебра. Хорошо распластанные клетки исследовали на электронном микроскопе JEM-100B (JEOL) при малых увеличениях. Для иммунофлуоресцентного выявления мейоз-специфичных белков *ASY1* и *ZYP1* препараты инкубировали с соответствующим набором первичных и вторичных антител и исследовали на флуоресцентном микроскопе Axio Imager D1 (Carl Zeiss).

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 на оси мейотических хромосом, и, таким образом, нарушения синапсиса у мутантов *sy1* и *sy19* не связаны с дефектами загрузки этих структурных белков.

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 было 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Генетический контроль мейоза: общие представления

Впервые гены, влияющие на ход мейоза у растений (кукуруза), были обнаружены Бидлем (G.W. Beadle) в начале 30-х годов XX века (цитировано по Golubovskaya, 1979). В России первым исследователем, начавшим целенаправленно изучать генетический контроль мейоза, стала И.Н. Голубовская. В 1979 году она опубликовала большой обзор, в котором подвергла анализу всё разнообразие известных к тому моменту мейотических мутаций (Golubovskaya, 1979). И.Н. Голубовская выделила семь цитологических этапов мейоза, за которыми установлен особый генетический контроль: вступление в мейоз, синапсис гомологичных хромосом, мейотическая рекомбинация, хиазмообразование, расхождение гомологов, цитокинез и второе деление мейоза. Дальнейшие исследования показали, что среди десятков специфических генов мейоза у растений, грибов и животных большую часть составляют гены, которые проявляются в профазе первого деления и прямо или косвенно влияют на синапсис гомологичных хромосом.

Ранее, в 1956 году два американских цитолога М. Мозес (M. Moses) и Д. Фосет (D. Fawcett) независимо друг от друга открыли мейоз-специфичную структуру, названную синаптонемным комплексом (Moses, 1956; Fawcett, 1956). Это открытие стало одним из самых значимых в развитии исследований мейоза. Синаптонемный комплекс – это двунитевая белковая структура. Он состоит из двух латеральных элементов (ЛЭ), соединённых между собой поперечными филаментами (ПФ), которые формируют центральный элемент (ЦЭ) (**Рисунок 3**). СК – сугубо мейоз-специфичная структура, которая существует только в профазе I мейоза. СК обеспечивает обратимый синапсис гомологичных хромосом и служит ультраструктурным компартментом для протекания молекулярных процессов рекомбинации.

Большинство мейотических генов экспрессируется в профазе I, поэтому СК стал незаменимым инструментом при изучении цитологического проявления мейотических мутаций. Представление о числе уже выявленных специфических генов мейоза у разных организмов даёт **Таблица 1**. Судя по наиболее изученному модельному объекту – дрожжам *Saccharomyces cerevisiae* – мейоз у всех организмов должен управляться сотнями специфических генов. Следует отметить, что среди мутаций мейотических генов наблюдаются фенотипически одинаковые у разных организмов. Накопленный в литературе материал о морфологических изменениях в картинах мейоза, позволяет говорить о гомологических рядах изменчивости признаков мейоза в широком диапазоне таксонов. Малое число изученных генов мейоза у высших растений (50 у кукурузы, по сравнению с 360 у дрожжей) не означает, что

этих генов у растений действительно меньше. Это означает, скорее всего, что около 300 новых генов у кукурузы, арабидопсиса и других растений ещё предстоит открыть (Богданов, Коломиец, 2007).

Это предположение неуклонно подтверждается. Так, за первые полтора десятилетия XXI века открыто и описано 28 новых мейотических генов риса (Luo *et al.*, 2014) и около 30 новых мейотических генов у арабидопсиса (Mercier, Grelon, 2008). Часть из этих новых генов арабидопсиса и риса являются ортологичными, в то время как другие – уникальными.

Прогрессивные исследования мейоза основаны на всестороннем изучении мейотических мутаций и коллекций мейотических мутантов конкретных организмов. В последние десятилетия активно изучаются генетические коллекции растений: кукурузы *Zea mays* (Cande *et al.*, 2009), арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* (Mercier, Grelon, 2008) и риса *Oryza sativa* (Luo *et al.*, 2014). Наша работа является продолжением цикла работ, посвящённых изучению “Петергофской” коллекции мейотических мутантов ржи, созданной С.П. Соснихиной и коллегами на кафедре генетики Санкт-Петербургского государственного университета. Далее мы рассмотрим основные группы изученных на данный момент мутаций растений и подробнее остановимся на коллекции мейотических мутантов ржи.

Таблица 1. Число известных специфических генов мейоза у разных организмов (по Богданов, Коломиец, 2007)

Объект	Число известных генов мейоза		Источник
	всего	Изучено на молекулярном уровне	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	360	300	Priming <i>et al.</i> , 2000
<i>Drosophila melanogaster</i>	320	120	Manheim, Mckim, 2003 Гришаева, Богданов, 2000
<i>Zea mays</i>	50	7	Golubovskaya <i>et al.</i> , 2002 Pawlowsky <i>et al.</i> , 2004
<i>Secale cereale</i>	20	-	Sosnikhina <i>et al.</i> , 2005
<i>Arabidopsis thaliana</i>	20	10	Jones <i>et al.</i> , 2003 Schwarzacher, 2003

1.2. Мейотические мутации растений

1.2.1. Дифференциация мейоцитов

В жизненном цикле растений мейоз служит для перехода от спорофитной ($2n$) к гаметофитной (n) стадии развития. Особенность растений состоит в том, что у них отсутствует преддетерминированная зародышевая линия клеток. Мейоциты дифференцируются в конце жизненного цикла в результате серии гомеозисных активационных шагов (Ma, 2005; Feng, Dickinson, 2007). Что определяет индивидуальность мейоцитов к настоящему времени в полной мере не известно. Известно лишь несколько мутаций, которые вызывают смещение равновесия между мейоцитами и окружающими их соматическими клетками: *mac1* кукурузы (Sheridan *et al.*, 1996; Sheridan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2012), *exs/ems1* арабидопсиса (Canales *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002) и *msp1* риса (Nonomura *et al.*, 2003). Считают, что эти мутации произошли в родственных генах, которые кодируют компонент сигнального каскада, вероятно, вовлечённого в сбор информации от соседних клеток и помогает установить судьбу будущих мейоцитов. Кроме того, открыт ген *Mell* риса, который кодирует ARGONAUTE белок, специфичный для клеток зародышевой линии (Nonomura *et al.*, 2007). Открытие этого гена дало основание предполагать, что РНК-опосредованная система сайлесинга, возможно, участвует в дифференциации мейоцитов, как это было показано в случае других высших эукариот (Holmes, Cohen, 2007).

1.2.2. Вступление в мейоз

Механизмы активации мейоза хорошо изучены у животных и грибов, понимание этого этапа мейотического деления у растений на настоящий момент является фрагментарным (Namant *et al.*, 2006; Mercier, Grelon, 2008).

У арабидопсиса открыто пять *AML*-генов, продукты которых схожи с РНК-связывающим белком MEI2 *Schizosaccharomyces pombe*, играющим определяющую роль в активации мейоза у дрожжей. Фенотипы, наблюдаемые при инактивированных *AML1-5* генах, указывают на роль этих генов в мейозе, однако наблюдаемые нарушения исключают направляющую роль *AML*-генов в инициации мейоза у растений (Kaug *et al.*, 2006). *AML1-5* гены арабидопсиса оказывают сильное плеiotропное действие на развитие растений.

Известно несколько генов, которые могут играть ведущую роль в ранних мейотических событиях у растений. У арабидопсиса мутации в гене *Switch1* препятствуют активации мейотических событий, как минимум, когезии сестринских хроматид и рекомбинации

гомологичных хромосом (Mercier *et al.*, 2001; Agashe *et al.*, 2002; Mercier *et al.*, 2003). У кукурузы известен ген *Ameiotic1(Am1)*, который обладает частичной гомологией с геном *Switch1* арабидопсиса. Для мутантов *am1* характерна замена мейотического деления на деление, подобное митотическому (Golubovskaya *et al.*, 1997a; Pawlowski *et al.*, 2009).

Циклин-подобные белки арабидопсиса (CDC45 и SDS) также могут играть роль в контроле протекания мейотического клеточного цикла либо иметь более специфичную роль в репарации ДНК (Azumi *et al.*, 2002; Stevens *et al.*, 2004). Кроме того, фенотипы мутантов *ms5/tdm* и *tam* арабидопсиса (которые, соответственно, приводят к третьему циклу сегрегации хромосом и удлинению мейоза I) дают основания предполагать, что соответствующие им гены могут являться регуляторами мейотического клеточного цикла (Glover *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004).

Определение судьбы мейоцита и запуск мейотического деления должны происходить до или во время предмейотической S-фазы, т.к. на этой стадии уже происходит загрузка мейоз-специфичных гистонов, когезинов и конденсинов (Strich, 2004).

1.2.3. Когезия сестринских хроматид и структура мейотических хромосом

Во время митоза и мейоза сестринские хроматиды удерживаются вместе с помощью белков когезинового комплекса (**Рисунок 1, А**). В клетках, делящихся путём митоза, когезины соединяют сестринские хроматиды и удерживают их вместе до расхождения в анафазе. В состав когезинового комплекса входят белки SMC1 и SMC3, из группы SMC (Structural Maintenance of Chromosomes – белки поддержания структуры хромосом), и два белка SCC1/RAD21 и SCC3/PSC3, не относящиеся к группе SMC (Haering *et al.*, 2002; Ishiguro, Watanabe, 2007). Когезиновый комплекс присутствует и в мейотических хромосомах. При этом у дрожжей и млекопитающих SCC1 в нём заменён на сходный с ним мейозспецифичный белок REC8, а у дрозофилы на белок C(2)M. У дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* SCC3 заменён на REC11, у млекопитающих – на STAG3. Соматический SMC1 млекопитающих заменён в мейозе на SMC1-beta (Hamant *et al.*, 2006; Богданов, Коломиец, 2007).

В мейозе растений замене подвергается только один компонент когезинового комплекса: SCC1/RAD21 заменяется на растительный аналог REC8. Этот белок идентифицирован и описан у арабидопсиса – SYN1 (Chelysheva *et al.*, 2005), у риса – OsRAD21-4 (Zhang *et al.*, 2006) и у кукурузы – AFD1 (Golubovskaya *et al.*, 2006). Оказалось, что эти белки в большей степени схожи с белками RAD21 млекопитающих и дрожжей, чем с их мейотическими аналогами REC8. Экспрессия растительных аналогов REC8 не является мейозспецифичной. Существует точка зрения, что это является следствием отсутствия преддетерминированной зародышевой линии

клеток у растений (Hamant *et al.*, 2006). Эту точку зрения укрепляет факт отсутствия у арабидопсиса мейозспецифичного аналога белка SCC3, на протяжении митоза и мейоза у арабидопсиса действует один и тот же белок (Chelysheva *et al.*, 2005).

Мутации в гене *Syn1/AtRec8* приводят к сложным мейотическим фенотипам, которые вызывают полную мужскую и женскую стерильность. Первичные дефекты выявляются в ранней лептотене – имеет место неравномерная конденсация хромосом. В анафазе I наблюдается сильная фрагментация хромосом (Bai *et al.*, 1999). Сообщается о возможном участии SYN1 в спаривании хромосом (Cai *et al.*, 2003).

Установлено, что белок AFD1/ZmREC8 необходим для поддержания когезии сестринских хроматид, выравнивания осевых элементов и спаривания хромосом в мейозе у кукурузы (Golubovskaya *et al.*, 2006). Была получена серия аллельных мутаций этого гена у кукурузы. Изучение этих мутантов показало, что формирование осей мейотических хромосом в ранней профазе I зависит от уровня экспрессии REC8. У гомозигот по сильным аллелям (*afd1-1*, *afd1-2* и *afd1-3*) хромосомные оси в профазе I не формируются вовсе (Hamant *et al.*, 2006; Golubovskaya *et al.*, 2006). Однако для гомозигот по слабому мутантному аллелю *afd1-4* характерно и наличие лептотенных осей хромосом, и образование фигуры букета.

Аналогично млекопитающим и дрожжам, когезиновые комплексы растений в центромерных регионах защищены от преждевременного (до анафазы II) расщепления сепаразой специальными белками – шугошинами: AtSGOL1 и AtSGOL2, ZmSGO1, OsSGO1 (Hamant *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011; Cromer *et al.*, 2013; Zamariola *et al.*, 2014). Шугошины растений уникальны тем, что они функционируют только во время первого мейотического деления (Cromer *et al.*, 2013). AtSGOL1 и AtSGOL2 арабидопсиса защищают центромерные когезины от разрушения их в анафазе I, и таким образом предотвращается преждевременное расхождение сестринских хроматид (Cromer *et al.*, 2013; Zamariola *et al.*, 2014).

Кроме белков когезинового комплекса структуру мейотических хромосом определяют конденсины (**Рисунок 1, Б**). У млекопитающих и грибов конденсины необходимы для рекомбинации и спаривания гомологов (Hirano, 2012). Методами обратной генетики установлено, что в геноме арабидопсиса присутствуют гомологи всех генов, продукты которых формируют субъединицы конденсиновых комплексов у млекопитающих и грибов, однако они ещё плохо охарактеризованы и их значение в мейозе растений до конца не установлено. Известно, что мутации в генах арабидопсиса, продукты которых являются субъединицами конденсинового комплекса, приводят либо к гибели проростков, либо сильно снижают жизнеспособность и фертильность растений. Предполагают, что конденсины растений должны иметь функцию в мейозе аналогичную конденсинам животных и грибов (Mainiero, Pawlowski, 2014).

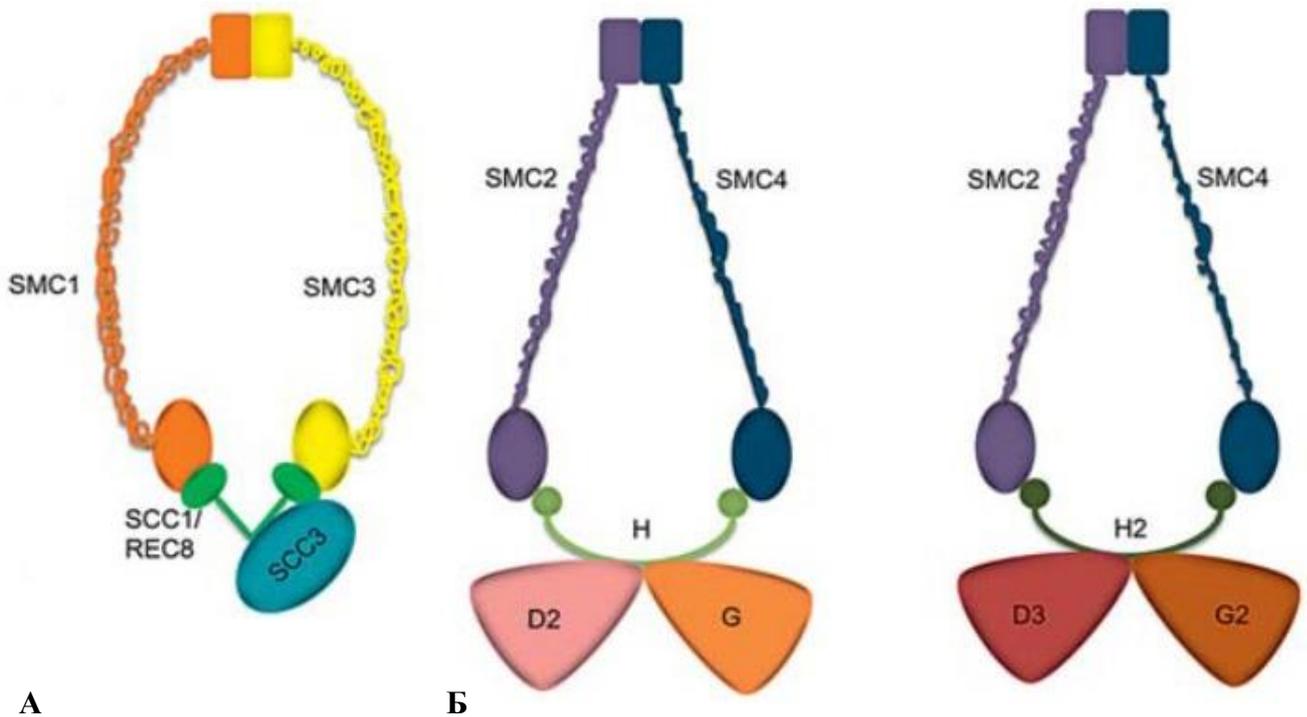


Рисунок 1. Строение когезинового (А) и конденсиновых комплексов (Б). Каждый комплекс содержит 2 SMC субъединицы, которые формируют кольцо, удерживаемое клеизиновой субъединицей. Во время митоза роль когезинового клеизина выполняет SCC1, во время мейоза – REC8. Дополнительный белок SCC3 необходим для правильного функционирования когезинового комплекса (А). Оба конденсиновых комплекса (Б) содержат SMC2 и SMC4 субъединицы. Дополнительные CAP-субъединицы замыкают комплексы и обеспечивают их полноценное функционирование (по Mainiero, Pawlowski, 2014).

1.2.4. Формирование фигуры “букета”

До начала процессов спаривания хромосом теломеры прикрепляются к ядерной оболочке и кластеризуются, образуется фигура “букета”.

У кукурузы идентифицирована мутация *plural abnormalities of meiosis 1 (pam1)*, первичным дефектом которой является нарушение формирования “букета” (Golubovskaya *et al.*, 2002). У мутантов *pam1* также нарушен и синапсис гомологов. Однако количество фокусов RAD51 у мутантов не отличается от нормы. Изучение этого мутанта позволило сделать два вывода. 1. Ранние события рекомбинации не требуют наличия “букета”. 2. Процессы формирования букета и начальные этапы рекомбинации независимы друг от друга (Hamant *et al.*, 2006).

Анализ ряда мутаций кукурузы, у которых нарушено спаривание хромосом, но наличествует “букет”: *phs1*, *maize male sterile 25 (mms25)* и *desynaptic Chris Staiger (dsyCS)*, дал основание полагать, что формирование фигуры букета и спаривание хромосом также являются независимыми процессами. Кроме того, нет фактов, подтверждающих абсолютную необходимость “букета” для спаривания гомологов (Hamant *et al.*, 2006). Однако нельзя исключать роль кластеризации теломер на ядерной мембране в облегчении попарного узнавания гомологов для их последующего спаривания.

1.2.5. Мейотическая рекомбинация

Идентифицировано много генов растений, которые необходимы для правильного протекания мейотической рекомбинации. Благодаря высокой консервативности молекулярных механизмов рекомбинации у эукариот, стратегия обратной генетики стала мощным инструментом для изучения генов рекомбинации у растений, в частности, у арабидопсиса (Bhatt *et al.*, 2001; Anderson, Stack, 2005; Ma, 2005).

Формирование DSB. Мейотическая рекомбинация инициируется двунитевыми разрывами ДНК (DSB – Double-Strand Breaks), которые у дрожжей осуществляет белок SPO11. Белок SPO11-1 арабидопсиса является гомологом SPO11, он необходим для инициации мейотической рекомбинации (Hartung, Puchta, 2000; Grelon *et al.*, 2001; Hartung, Puchta 2001). В мейоцитах мутантов *atspo11-1* обнаруживаются единичные биваленты на стадии диакинеза. Этот факт говорит о том, что либо у этих мутантов рекомбинация подавлена не полностью, либо биваленты в мейоцитах мутантов формируются с помощью независимого от рекомбинации механизма (Grelon *et al.*, 2001). Подобным образом себя ведут мутанты *atspo11-2* (Stacey *et al.* 2006).

У дрожжей для формирования DSB кроме SPO11 требуется 9 вспомогательных белков (Keeney, 2001). Четыре из них имеют своих гомологов у растений (RAD50, MRE11, NBS1, SKI8), однако ни один из этих белков не проявляет полного сходства функций между дрожжами и растениями (Jolivet *et al.*, 2006). С помощью подхода прямой генетики был обнаружен белок AtPRD1, который необходим для образования DSB у арабидопсиса. Двугибридный анализ показал, что AtPRD1 взаимодействует с AtSPO11-1. Это является первым свидетельством наличия комплекса белков, который обеспечивал бы формирование DSB у высших эукариот (De Muyt *et al.*, 2007). Остальные белки-компоненты этого комплекса остаются неизвестными.

Репарация DSB. Большинство белков, задействованных в репарации DSB, сходны в царствах грибов и животных. Функциональный анализ таких генов у арабидопсиса показал, что это справедливо и для растений, хотя у них обнаруживаются некоторые особенности (Mercier, Grelon, 2008).

У дрожжей формирование и процессинг DSB осуществляется с помощью белков MRX (MRN) комплекса, который включает в себя белки MRE11, RAD50 и XRS2/NBS1 (Borde, 2007). Функции MRE11 и RAD50 были изучены у арабидопсиса. Оказалось, что у арабидопсиса MRX-комплекс необходим для процессинга DSB, но не является обязательным для их формирования (Puizina *et al.*, 2004; Bleuyard *et al.*, 2004). Процессинг DSB приводит к появлению односторонних концов ДНК, к которым присоединяются специальные белки, способствующие активному поиску гомологии (Shinohara, Shinohara, 2004). Функции некоторых вовлечённых в этот процесс белков изучены у арабидопсиса. RAD51 и DMC1 являются гомологами RECA, но имеют различные функции в репарации DSB в мейозе у дрожжей. Изучение соответствующих мутантов выявило значительные отличия в выполняемых этими белками функциях. У мутантов *atrad51* репарация DSB не осуществляется (Li *et al.*, 2004), в то время как у мутантов *atdmc1* репарация DSB происходит, но по матрице сестринских хроматид (Couteau *et al.*, 1999; Siaud *et al.*, 2004). Исследователи предположили, что AtRAD51 инициирует поиск гомологии индифферентно от типа матрицы, а AtDMC1 способствует репарации по гомологичной хромосоме.

У кукурузы идентифицировано два гомолога RAD51: RAD51A и RAD51B. Их отсутствие в мейотическом протеоме вызывает менее выраженные повреждения (чем в случае арабидопсиса). У двойных мутантов кукурузы по этим генам наблюдается уникальный фенотип, который не характерен для мутантов *rad51* других организмов: спаривание, синапсис и хиазмообразование между негомологичными хромосомами. Это говорит о необходимости присутствия RAD51 для нахождения хромосомами гомологии при репарации в мейозе у кукурузы. В этом двойные мутанты *rad51* кукурузы схожи с *ph* мутантами пшеницы, у которых

“разрешено” гомеологичное спаривание хромосом (Rey *et al.*, 2015). У двойных мутантов *rad51a*, *rad51b* белок DMC1 может частично обеспечивать инвазию нитей и некоторые женские гаметы выживают (Li *et al.*, 2007).

Кроме белков AtRAD51 и AtDMC1 в репарацию DSB у арабидопсиса вовлечены два паралога RAD51 – AtRAD51C и AtXRCC3. Анализ мутантов *atrad51c* и *atxrcc3* показал, что эти белки взаимодействуют с AtRAD51 на стадии репарации DSB (Osakabe *et al.*, 2002; Kerzendorfer *et al.*, 2006).

Кроме того, у кукурузы есть ген *Phs1*, который у растений является уникальным геном, вовлечённым в запуск механизмов инвазии нитей ДНК (Pawlowski *et al.*, 2004).

Заключительные этапы мейотической рекомбинации. У растений, также как и у других эукариот, существует как минимум два различных типа продуктов репарации DSB: **КО** (кроссоверы; COs – crossovers) и **НКО** (не-кроссоверы; NCOs – non-crossovers) (Mezard *et al.*, 2007). В свою очередь, установлено, что существует два класса КО. Класс I КО характеризуется наличием интерференции, в то время как для II класса КО свойственно независимое распределение по длине бивалента. Соотношение этих классов видоспецифично. Крайними вариантами являются нематода *C. elegans* (только класс I) и дрожжи *S. pombe* (только класс II). У дрожжей *S. cerevisiae* формирование КО I типа зависит от ZMM-белков (ZIP1, ZIP2, ZIP3, ZIP4, MSH4, MSH5 и MER3) и в меньшей степени от белков MLH1 и MLH3 (Lynn *et al.*, 2007).

Существование двух классов КО у растений впервые было предсказано Copenhagen и соавторами (2002) и на данный момент подтверждено благодаря идентификации и описанию гена *Mus81* и гомологов ZMM-белков у арабидопсиса (Copenhagen *et al.*, 2002; Mercier, Grelon, 2008). У мутантов по ZMM-белкам не нарушены ранние события рекомбинации (присутствуют сигналы RAD51/DMC1); синапсис нарушен незначительно. Тем не менее, наблюдается сильное подавление формирования КО. Максимальное снижение КО у *zmm*-мутантов не превышает 85% уровня дикого типа. Это говорит о том, что, как минимум, 15% КО у арабидопсиса являются ZMM-независимыми (II класс).

В геноме арабидопсиса присутствуют два предполагаемых *Mus81* гена. Установлено, что один из них вовлечён в соматическую репарацию ДНК и участвует в образовании 9% мейотических КО. Второй гомолог *Mus81* арабидопсиса является псевдогеном (Hartung *et al.*, 2006; Berchowitz *et al.*, 2007).

Anderson и соавторы (2014) с помощью комбинированного использования иммунофлуоресцентной и электронной микроскопии провели подробный анализ распределения двух классов КО у томата. Установлено, что 18% КО у дикого типа томата являются КО II класса. Для двух классов характерно различное распределение КО: КО I класса локализуется преимущественно в дистальных регионах (и преимущественно в длинных плечах), КО II класса

– в прицентромерных регионах (гетерохроматин). Наблюдалась интерференция между КО I и II класса (Anderson *et al.*, 2014).

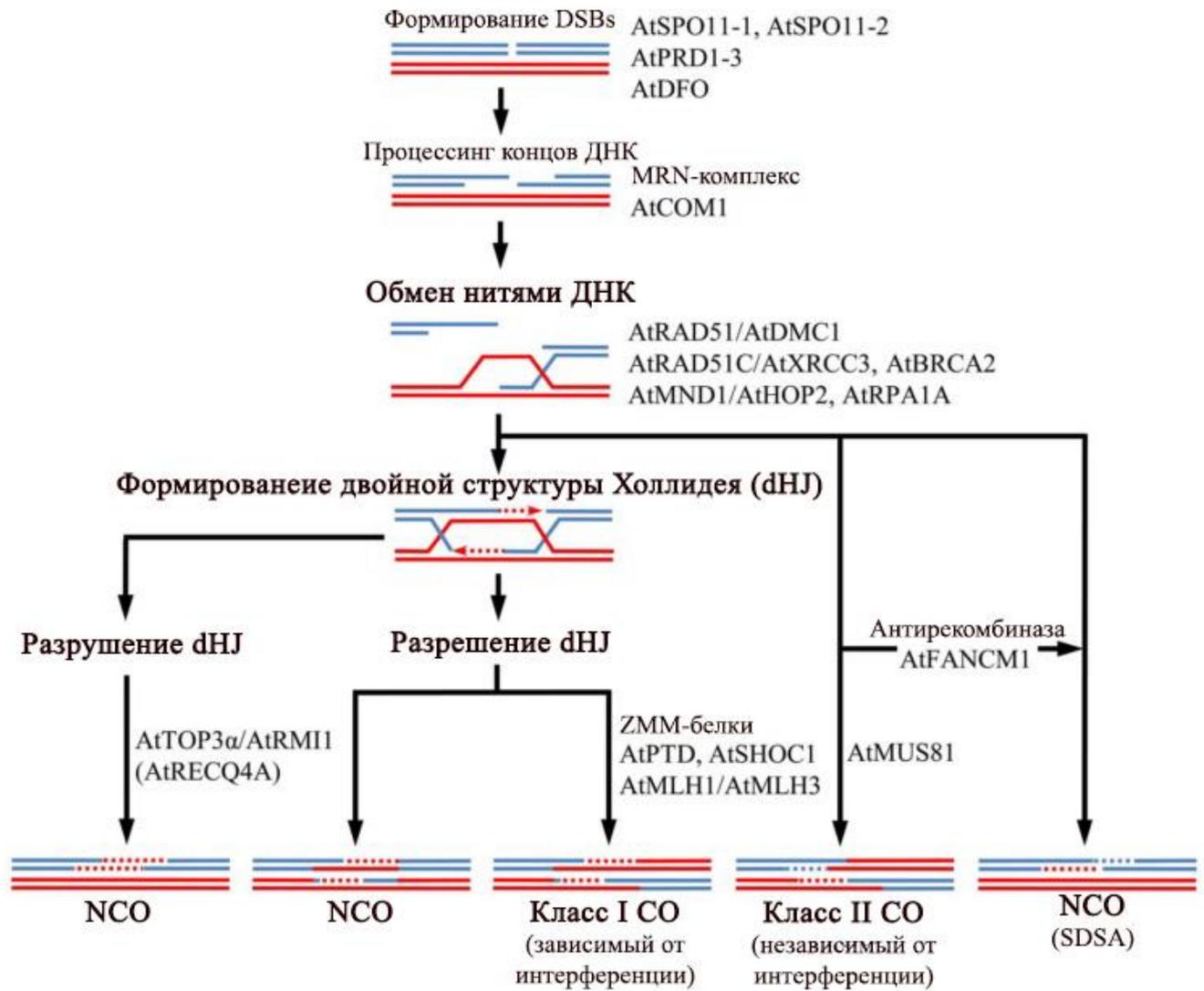


Рисунок 2. Модель рекомбинации у арабидопсиса (по Pradillo *et al.*, 2014).

1.2.6. Спаривание гомологичных хромосом

Наиболее значимый из неразрешённых вопросов в изучении мейоза – какие механизмы обеспечивают гомологичное спаривание хромосом. Такие факторы как морфология хромосом, распределение специфичных последовательностей, связанные с ДНК белки могут вносить определённый вклад в гомологичное узнавание хромосом, но молекулярные механизмы этого сложного процесса остаются неизвестными (Hamant *et al.*, 2006).

Одним из механизмов, который может способствовать гомологичному узнаванию хромосом, является кластеризация теломер на ядерной оболочке, т.е. формирование фигуры букета (Раздел 1.2.4).

У мягкой пшеницы *Triticum aestivum*, известен ген *Ph1*, который координирует гомологичное спаривание хромосом у этого вида, имеющего три гомеологичных генома ($2n = 6x = 42$). В профазе I у пшеницы дикого типа сначала образуются мультиваленты из гомеологичных хромосом, которые затем подвергаются коррекции. В пахитене присутствуют только биваленты гомологичных хромосом. Такая коррекция нарушена у *ph1* мутантов: многие мультиваленты сохраняются до метафазы I. Однако наличие аллеля дикого типа не предотвращает негомологичные/гомеологичные хромосомы от взаимодействия в случае отсутствия гомологичной пары в пшенично-ржаных гибридах (Martinez-Perez *et al.*, 2001). Это наблюдение говорит о том, что разделение между гомологами и гомеологами происходит не ранее начальных этапов спаривания хромосом. Таким образом, ген *Ph1* необходим для коррекции негомологичного (гомеологичного) спаривания у пшеницы (Moore, 2002; Hamant *et al.*, 2006).

Установление гомологии тесно связано с процессами рекомбинации. Выше описаны мутации по генам *Rad51* и *Dmc1* у арабидопсиса и кукурузы. Их изучение стало доказательством того, что ранние этапы рекомбинации (репарация DSB) вовлечены в поиск гомологии для последующего спаривания хромосом (Franklin *et al.*, 1999; Pawlowski *et al.*, 2003). Фактически, рекомбинация может и являться способом поиска гомологии у растений (Hamant *et al.*, 2006).

Распределение RAD51 было изучено у 20 мейотических мутантов кукурузы. Оказалось, что количество фокусов RAD51 в ранней профазе I хорошо и отрицательно коррелирует с количеством униввалентов в метафазе I у 18 из 20 мутантов (Pawlowski *et al.*, 2003). Исключениями оказались мутанты *pam1* (Golubovskaya *et al.*, 2002) и *dysl1*, у которых обнаруживается нормальное распределение RAD51 при нарушенном синапсисе гомологов (Bass *et al.*, 2003).

Ген *Phs1* кукурузы отвечает за загрузку ферментов рекомбинации на хромосомные оси, по крайней мере, белка RAD51 (Pawlowski *et al.*, 2004). В зиготене у мутантов *phs1* регистрируется в среднем 3 фокуса RAD51 вместо 500 (дикий тип). Результатом служит гетерологичный синапсис хромосом в пахитене. Это является ещё одним доказательством необходимости ранних ферментов рекомбинации для осуществления корректного спаривания гомологов. Ген *Phs1* был клонирован. Он кодирует белок, который не обладает значительной схожестью с известными мейотическими белками, но имеет предполагаемые гомологи у арабидопсиса и других растений (Pawlowski *et al.*, 2004). Мутанты *dsyCS* и *segII* кукурузы имеют цитологические фенотипы схожие с цитологическим фенотипом мутантов *phs1* – гетерологичный синапсис хромосом.

1.2.7. Сборка синаптонемного комплекса

Нарушения в формировании синаптонемного комплекса являются наиболее часто встречающимися дефектами у мейотических мутантов, полученных с помощью подходов “прямой” генетики (forward genetics screens). Это объясняется тем, что дефекты синапсиса могут быть следствием нескольких первичных дефектов: когезии сестринских хроматид, гомологичного спаривания хромосом, рекомбинации (Jones *et al.*, 2003; Богданов, Коломиец, 2007). Так, у упоминавшихся выше мутантов *syn1* арабидопсиса и *afd1* кукурузы, у которых отсутствует ключевой компонент когезинового комплекса – REC8, сборка СК не происходит (Bai *et al.*, 1999; Golubovskaya *et al.*, 2006). Это говорит о зависимости инициации сборки СК от надлежащей когезии сестринских хроматид. Загрузка белков СК в клеточное ядро происходит на оси сестринских хроматид, уже сформированные с помощью белков когезинового комплекса.

У мутантов *asynaptic1* (*asy1*) арабидопсиса также нарушен синапсис гомологичных хромосом в профазе I. Ген *Asy1* был клонирован. Оказалось, что он кодирует белок, который обладает значительной гомологией в N-концевой части (домен NORMA) с белком HOP1, компонентом латеральных элементов СК у дрожжей (Caryl *et al.*, 2000). В дальнейшем были идентифицированы гомологи гена *AtASY1* у риса – *PAIR2* (Nonomura *et al.*, 2004) и пшеницы – *TaASY1* (Boden *et al.*, 2007). Мутанты *asy1* арабидопсиса ($2n = 10$) имеют асинаптический цитологический фенотип, однако для них характерно наличие единичных хиазм – в метафазе I в среднем обнаруживается 1,57 бивалент на клетку (Caryl *et al.*, 2000). Фенотип мутантов *pair2* риса оказывается более сильным, в метафазе I наблюдаются только униваленты (Nonomura *et al.*, 2004). Фенотипы мутантов *hop1/asy1* у изученных организмов (дрожжи, нематода, арабидопсис, рис) имеют большую схожесть, что говорит о консервативности роли белка

НОР1/ASY1 в построении СК у этих организмов (Hollingsworth *et al.*, 1990; Zetka *et al.*, 1999; Caryl *et al.*, 2000; Nonomura *et al.*, 2004). В построении ОЭ/ЛЭ в мейозе животных участвуют другие белки: SYCP2 и SYCP3, которые не обладают гомологией с белком НОР1 дрожжей (Богданов, Коломиец, 2007).

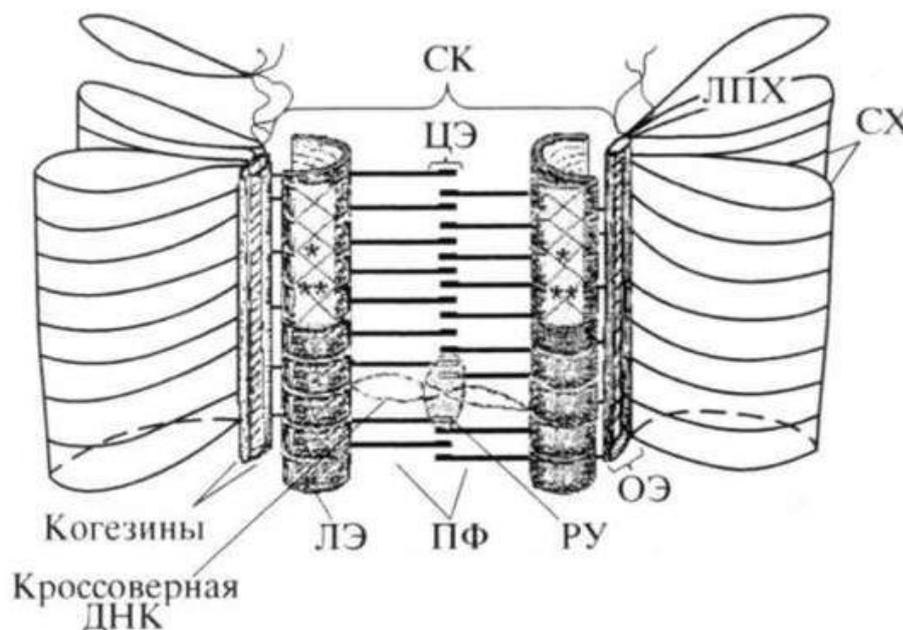


Рисунок 3. Схема строения синаптонемного комплекса (СК): ЦЭ – центральный элемент, ЛЭ – латеральный элемент, ОЭ – осевой элемент неспаренной хромосомы, ЛПХ – латеральные петли хроматина, СХ – сестринские хроматиды, ПФ – поперечные филаменты, РУ – рекомбинационный узелок (по Богданов, 2003).

У арабидопсиса известны два гена *Zyp1a* и *Zyp1b*, которые кодируют компоненты центральных элементов СК (Higgins *et al.*, 2005). Наличие иммунофлуоресцентного сигнала AtZYP1 и у *zyp1a*, и у *zyp1b* мутантов, а также идентичность их цитологических фенотипов, свидетельствует о “взаимозаменяемости” этих генов. Оба белка присутствуют только в профазе I. Установлено, что инициация рекомбинации необходима для загрузки AtZYP1 на хромосомные оси, но она не является достаточным фактором для полимеризации AtZYP1 и превращения его в компонент ЦЭ. При отсутствии и AtZYP1a, и AtZYP1b белков наблюдается задержка мейоза, спаривание и синапсис отсутствует в большинстве мейоцитов. Хиазмы, обнаруживаемые при отсутствии обоих ZYP1 белков образуются как между гомологичными, так и между негомологичными хромосомами, т.е. отсутствие ZYP1 у арабидопсиса “разрешает” рекомбинацию между негомологичными регионами хромосом. Исследования белков СК у дрожжей привело к предположению о существовании “контролирующего” механизма, который

следил бы за протеканием профазы I (Börner *et al.*, 2004). Анализ особенностей распределения AtZYP1 показал высокую схожесть в генетическом контроле мейоза между арабидопсисом и дрожжами. Предполагают, что у растений СК может действовать как “контролирующий” комплекс, который обеспечивает корректное осуществление процессов рекомбинации (Higgins *et al.*, 2005).

1.3. Петергофская коллекция мейотических мутантов ржи

Среди растений рожь является удобным объектом для цитогенетических исследований, и, в частности, для изучения мейоза. Рожь имеет небольшое число крупных хромосом ($2n = 2x = 14$), которые хорошо окрашиваются различными методами. Кроме того, мейоз у ржи протекает, когда колос достигает значительных размеров (до 12 см, а пыльники – до 0,5 см), что позволяет получать большое число материнских клеток пыльцы на нужных стадиях мейоза. Кроме того, рожь является хорошо проработанным цитогенетическим объектом, что облегчает работу по изучению мейоза этого растения и, в частности, работу по исследованию мейотических мутаций.

В отличие от других коллекций мейотических мутантов (кукурузы, риса и арабидопсиса) для создания которых применялись методы индуцированного мутагенеза и генетической трансформации, все мутации в Петергофской коллекции являются спонтанными. Мутации были выделены при самоопылении гибридов от скрещивания отдельных растений популяции (сорт Вятка или сорно-полевая рожь из Закавказья) с автофертильными линиями ржи. Выделенные мутации поддерживаются в гетерозиготном состоянии в самоопылённых линиях. Генетический анализ ведется путем изучения расщепления в самоопылённых семьях от гетерозиготных фертильных растений линий и в гибридных семьях F_2 от скрещиваний отдельных фертильных растений разных расщепляющихся линий (Соснихина *и др.*, 1994; Соснихина *и др.*, 2005).

С помощью генетического анализа и подробного цитологического изучения стадий мейоза мейотические мутации ржи были разделены на 6 групп.

1.3.1. Мутации асинопсиса

К первой группе относятся мутанты *sy1* и *sy9* с высоким числом унивалентов в мейоцитах в метафазе I (MI). На стадиях, аналогичных зиготене и пахитене при нормальном мейозе, у этих мутантов обнаруживаются только осевые элементы хромосом, синапсис отсутствует, СК не формируется. У мутанта *sy1* более чем в 99 % клеток в MI содержат только

униваленты. У мутанта *sy9* таких клеток около 67 %, в остальных 33% клеток встречаются немногочисленные биваленты (Sosnikhina *et al.*, 1992; Соснихина *и др.*, 1998; Sosnikhina *et al.*, 2005). С помощью FISH-зондов установлено, что мутация *sy1* нарушает кластеризацию теломер на ядерной мембране во время лептотены и далее, когда у нормальных растений наступает зиготена. У мутантов *sy9* кластеризация не нарушена или эффект незначителен (Mikhailova *et al.*, 2001). У тех же мутантов, с помощью метода иммунофлуоресценции, было исследовано распределение раннего фермента рекомбинации – белка RAD51. Было установлено, что у мутанта *sy1* флуоресцентный сигнал белка отсутствует на всех исследованных стадиях (от лептотены до пахитены) в отличие от нормальных растений. У мутанта *sy9* обильное число фокусов RAD51 резко снижается по сравнению с нормой уже в ранней пахитене, то есть белок слишком рано исчезает из мейоцитов. Есть основания предполагать, что мутации *sy1* и *sy9* близки мутациям *as6* и *as1* томата, которые имеют сходные асинаптические фенотипы (Havekes *et al.*, 1994; Богданов, Коломиец, 2007).

1.3.2. Мутация незавершённого синапсиса

Для мутанта *sy3* характерен широкий спектр распределения МКП в зависимости от числа унивалентов. Мейоциты, содержащие в МI только униваленты, встречаются с частотой всего 2%. На основе анализа СК этот мутант отнесен к частично асинаптическим, так как он характеризуется незавершенным синапсисом к моменту начала деградации СК, которая наступает в ранней диплотене. На предшествующей ей стадии поздней пахитены обнаружены асинаптические участки в теломерных и интерстициальных районах СК. Наблюдается разрушение осевых элементов СК в асинаптических сегментах еще до наступления отталкивания латеральных элементов СК в диплотене, т.е. происходит преждевременное прекращение синапсиса (Соснихина *и др.*, 1992; Федотова *и др.*, 1992).

1.3.3. Мутации гетерологичного синапсиса

Третья группа мутантов (*sy2*, *sy6*, *sy7*, *sy8*, *sy10* и *sy19*) характеризуется тем, что на стадии пахитены у них наблюдаются картины смены партнеров спаривания латеральных элементов («переключения») и складки латеральных элементов «на себя» (fold-backs). Такие нарушения говорят о наличии негомологичного синапсиса наряду с гомологичным. На стадии МI у этих мутантов наблюдается варьирующее число унивалентов, которое зависит от числа хиазм, возникших при смене партнеров спаривания во время профазы I. В местах асинапсиса и гетерологичного синапсиса отсутствует или резко снижен кроссинговер, в результате чего в

метафазе I выявляются унивваленты и в редких случаях мультиваленты (до 11% у мутантов *sy2* и *sy19*) (Гаджиева, 1992; Fedotova *et al.*, 1994; Соснихина *и др.*, 2001; Соснихина *и др.*, 2002; Соснихина *и др.*, 2007; Соснихина *и др.*, 2009). Предполагают, что дефект у этих мутантов связан с этапом узнавания гомологичных локусов ДНК, то есть проявляется уже во время спаривания гомологичных хромосом в очень ранней профазе I, так как процесс «сборки» белковых элементов СК в значительной степени индифферентен к гомологии локусов ДНК (Богданов, Коломиец, 2007). Механизм действия таких генов пока неясен, но судя по всему, он состоит из нескольких этапов. На ранних этапах спаривания хромосом узнаются все гомологичные последовательности даже в неаллельных положениях, а затем происходит коррекция под воздействием генов, контролирующих строгость гомологичного синапсиса (Соснихина *и др.*, 2005; Богданов *и др.*, 1996). Именно так, считается, действует локус *Ph1* у мягкой пшеницы, имеющей гомологичные геномы (Jenkins, Okumus, 1992).

У мутантов ржи с гетерологичным синапсисом помимо униввалентов в мейозе выявляются биваленты и мультиваленты. Мультиваленты считают результатом редкого кроссинговера по гомологичным последовательностям в эктопическом положении (Соснихина *и др.*, 2005). У мутантов *sy10* было изучено поведение хромосом в МI с использованием пяти FISH-зондов, с помощью которых можно было достоверно идентифицировать каждую пару гомологичных хромосом. Было установлено, что значительная часть бивалентов (39%) у мутанта образована негомологичными хромосомами, хотя биваленты были правильно ориентированы в метафазной плоскости (Jenkins *et al.*, 2005; Mikhailova *et al.*, 2006).

1.3.4. Мутации аномального строения латеральных элементов СК

При изучении электронно-микроскопических фотографий спредированных препаратов пахитенных клеток растений из линии Ms6, характеризующейся мужской стерильностью, были обнаружены неизвестные ранее аномалии ультраструктуры СК. Эта мутация была обозначена как *meib* (Богданов *и др.*, 1997; Bogdanov *et al.*, 1998). Аномалии представляли собой ультраструктурные выросты на латеральных элементах СК. Выросты были двух типов: “шипы” и “перегородки”. Выросты иногда сильно искажали структуру СК, приводя к пробелам на одном из латеральных элементов, а также формировали локальные ветвящиеся структуры. Среднее число таких аномалий на клеточное ядро увеличивалось от ранней пахитены до поздней диплотены. Было предположено, что выросты на латеральных элементах СК возникают в результате модификации структуры белков, формирующих латеральные элементы СК, и/или в результате ошибок самосборки этих белков. Была предложена и альтернативная гипотеза, которая основывалась на том, что имела место достоверная отрицательная корреляция

между числом выростов в субтерминальных сегментах СК и числом рекомбинационных узелков в этих сегментах. Поэтому не было исключено, что возникновение аномальных выростов связано с дефектами формирования этих ферментативных комплексов (Богданов *и др.*, 1997; Bogdanov *et al.*, 1998).

Отмечено, что мутация *mei8* наследуется независимо от мутации гетерологичного синапсиса *sub*, которая проявляется в этой же линии растений Msb (Соснихина *и др.*, 2005).

1.3.5. Мутации неравномерной конденсации мейотических хромосом

Две спонтанные мейоз-специфичные мутации с одинаковым цитологическим проявлением выделены независимо из разных популяций ржи. Обе мутации рецессивны, аллельны и наследуются моногенно, ген был обозначен символом *mei8*. Мутантные аллели этого гена вызывают неравномерную конденсацию хроматина по длине мейотической хромосомы; конденсированный хроматин перемежается участками слабой конденсации. Хромосомы проявляют липкость концов и часто утрачивают индивидуальность. Обычно хромосомы при этой мутации имеют тенденцию к “комкованию”, хотя в некоторых клетках МI различимы открытые биваленты, правильно ориентированные в метафазной плоскости. Мутация не влияет ни на процесс синапсиса, ни на формирование веретена, а влияет только на структуру хромосом. В AI хромосомы расходятся к полюсам, но сильно фрагментируются. Несмотря на резкие нарушения мейоза, наблюдаемые в 100% клеток, основная программа делений мейоза осуществляется до конца, формируются микроспоры с ядрами разного размера и содержащие неравное количество хроматина (Соснихина *и др.*, 2003а).

1.3.6. Мутации сверхконденсации мейотических хромосом

Аллельные мутации *mei5* и *mei10* также имеют сходный фенотип. Для мутации *mei10* характерна сверхкомпактизация хроматина мейотических хромосом, сопровождаемая остановкой деления на разных стадиях мейоза. Кроме того, выявлены нарушения в формировании веретена, что проявляется в отсутствии конвергенции фибрилл на полюсах деления (Шамина *и др.*, 1994; Соснихина *и др.*, 1996). При электронно-микроскопическом анализе МКП мутантов *mei10* были выявлены утолщения латеральных элементов СК (Федотова *и др.*, 1995).

Мутации *mei8* и *mei10* – рецессивные, неаллельные, наследуются и проявляются независимо (Соснихина *и др.*, 2003б).

1.3.7. Взаимодействие мейотических генов у ржи

Для некоторых синаптических мутаций ржи установлено эпистатическое взаимодействие. На основании этого был сделан вывод о порядке активации этих генов в мейозе: *sy9* (асинапсис) > *sy1* (асинапсис) > *sy3* (незавершённый синапсис) > *sy19* (гетерологичный синапсис) (Соснихина *и др.*, 2005). Это оказалось возможным осуществить не для всех пар тестируемых мутаций, т.к. фенотипическое проявление ряда мутаций сходно (наличие варьирующего числа унивалентов в MI). Большинство из исследованных генов наследуется независимо. Сцепление было обнаружено только для гена *sy10* (гетерологичный синапсис) с генами *mei8* и *mei10*, влияющими на компактизацию мейотических хромосом (Соснихина *и др.*, 2003в).

1.3.8. Картирование мейотических генов ржи

С использованием микросателлитных и изозимных маркеров было картировано пять мейотических мутаций ржи. Асинаптические гены *Sy1* и *Sy9* были картированы в прицентромерной области длинных плеч хромосом 7R и 2R соответственно (Мальшев *и др.*, 2009). Ген *sy19* также был локализован в длинном плече хромосомы 7R (Долматович *и др.*, 2013а), ген *Sy10* оказался расположен на длинном плече хромосомы 5R. Ген *sy18* картирован на хромосоме 2R (Долматович *и др.*, 2013б). Локализация мейотических генов относительно молекулярных маркеров открывает перспективы для их точного картирования и клонирования с использованием генов-кандидатов из секвенированных геномов. С другой стороны, молекулярные маркеры позволяют упростить поддержание мутаций в гетерозиготном состоянии, а также создавать двойные мутанты для определения порядка включения генов в молекулярные процессы мейоза с применением маркерного отбора. Такой подход уже применён для изучения двойных мутантов по генам *Sy1* и *Sy9* (Ловцюс *и др.*, 2009).

По степени изученности действия генов на молекулярном уровне Петергофская коллекция мейотических мутантов ржи уступает коллекциям мейотических мутантов арабидопсиса, кукурузы и риса. Однако, благодаря сотрудничеству исследователей этой коллекции в Петербурге с зарубежными коллегами, молекулярные исследования уже начались (Mikhailova *et al.*, 2001; Jenkins *et al.*, 2005; Mikhailova *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2008; Ловцюс *и др.*, 2009). Петергофская коллекция наряду с мутациями, фенотипически сходными с мутациями у арабидопсиса, кукурузы и риса, содержит мутации, которые еще не описаны у других растений (например, *mei6*, приводящая к аномальному строению ЛЭ) и поэтому представляет собой ценный материал для исследований. Кроме того, коллекция богата большой

серией мутаций гетерологичного синапсиса хромосом и представляет особый интерес для исследования, поскольку расшифровка молекулярных механизмов обратимого гомологичного спаривания хромосом является первостепенной задачей для глубинного понимания природы мейоза как уникального биологического процесса.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал

В исследованиях были использованы потомства 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 генетической коллекции мейотических мутантов ржи (Петергофская коллекция), созданной ею и коллегами на кафедре генетики Санкт-Петербургского государственного университета (Соснихина *и др.*, 1994; Соснихина *и др.*, 2005; Sosnikhina *et al.*, 2005). Для удобства описания результатов подробная информация об изученных потомствах приводится в начале соответствующих разделов (Разделы 3.1, 3.2 и 3.3).

2.2. Свето-микроскопические исследования

Свето-микроскопические исследования мейоза у растений проводили на ацетокарминовых давленных препаратах, приготовленных классическим способом (Паушева, 1988; Пухальский *и др.*, 2007) с небольшими модификациями.

2.2.1. Приготовление растворов для фиксации и окрашивания цитологического материала

Для приготовления 200 мл фиксатора 3:1 (уксусный алкоголь, изменённый фиксатор Карнуа) смешивали 150 мл 96% этилового спирта (3 части) и 50 мл (1 часть) ледяной уксусной кислоты. Для фиксации использовали свежеприготовленный охлаждённый (“ice-cold”) раствор. Зафиксированный материал хранили при -20°C.

Для приготовления фиксатора Ньюкомера использовали вещества в следующем соотношении: изопропиловый спирт – 6 частей, пропионовая кислота – 3 части, ацетон – 1 часть, диоксан – 1 часть, петролейный эфир – 1 часть. Преимущество данного фиксатора – возможность хранить материал (для цитологических исследований на свето-микроскопическом уровне) при комнатной температуре и относительно долгое время (год и более).

Для приготовления раствора ацетокармина к 55 мл дистиллированной воды приливали 45 мл ледяной уксусной кислоты, прибавляли 2-5 г кармина и кипятили 3-6 часов в колбе на водяной бане с применением обратного холодильника. После охлаждения насыщенный тёмно-красный раствор фильтровали и помещали в склянку с притёртой пробкой.

2.2.2. Приготовление давленных препаратов

Для экспресс-тестирования стадий мейоза и мейотических фенотипов из живого цветка пинцетом извлекали пыльник и помещали на предметное стекло. Наносили на него каплю ацетокармина, накрывали покровным стеклом и несильно раздавливали. В случае нахождения нужной стадии (диакинез – метафаза I), покровное стекло поднимали, из пыльника выдавливали содержимое (после чего пыльник удаляли со стекла). Каплю повторно накрывали покровным стеклом, аккуратно надавливали большим пальцем и нагревали, исключая кипячения, до интенсивного прокрашивания.

Для подробного цитологического анализа колосья фиксировали с использованием фиксатора Ньюкомера либо фиксатора 3:1. Затем отбирали зафиксированные пыльники в нужной стадии и помещали их в раствор ацетокармина на 1-2 суток. Пыльники раздавливали в капле 45% уксусной кислоты по описанному выше принципу (без нагревания) и изучали под световым микроскопом.

2.3. Электронно-микроскопические исследования

2.3.1. Подготовка предметных стёкол и растворов

Предметные стёкла отмывали щелочным раствором ЭДТА (1 час), промывали в проточной воде и погружали на 30 минут в дистиллированную воду. Чистые стёкла хранили в 96% этаноле. Далее предметное стекло протирали сухой тряпочкой без ворса и погружали на 1/3 длины в 1% раствор пластика фирмы “Falcon” (1 г пластика в 100 мл хлороформа) на 1,5 секунды. Высушивали на воздухе в течение 10 минут и обводили контур пластика лаком. Лак удерживает пластик на стекле в процессе дальнейшей работы с препаратами.

Фиксатор - 4% параформальдегид в 0,1М растворе сахарозы. В 70 мл бидистиллированной воды растворяли 3,4 г сахарозы, помещали раствор на плитку с магнитной мешалкой и добавляли 4 г параформальдегида. Доливали воду до отметки 100 мл и нагревали раствор до 70-80°C. Далее добавляли 4-5 капель 1М NaOH до полного осветления раствора.

Раствор фильтровали, остужали и доводили рН до 8,2 боратным буфером. Готовый раствор хранили при -20°C и использовали только охлаждённым (“ice-cold”).

Боратный буфер. Готовили 2 стоковых раствора. А. 0,2М H_3BO_3 . Б. 0,05М $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. По мере необходимости растворы А и Б смешивали в соотношении 1:4 и получали боратный буфер с рН 9,0.

Детергент для промывания препаратов - 0,4% раствор Pfoto-Flo. Готовили из 4% стокового раствора и доводили рН до 8,5 с помощью боратного буфера.

Краситель – раствор AgNO_3 . Готовили 70% раствор AgNO_3 на предварительно подкисленной с помощью слабой азотной кислоты бидистиллированной воде (рН = 3,5). Растворы AgNO_3 с нейтральным и щелочным рН значительно хуже окрашивают СК растений.

Гипотонический раствор для распластывания клеток - раствор сахарозы. Готовили 0,2М раствор сахарозы в бидистиллированной воде.

Среда Гилиса. В 50 мл среды Игла растворяли 500 мг бычьего альбумина и добавляли 200 мкл 0,5М ЭДТА (среда желтела). Доводили рН до 7,7 с помощью 0,5М NaOH (среда приобретала малиновый цвет). Разливали по пробиркам по 1мл, хранили при -20°C .

0,5М ЭДТА. Для приготовления 100мл раствора брали 18,61 г ЭДТА ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{Na}_2\text{N}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и сначала растворяли его в 70 мл воды. Затем добавляли по одной пеллете NaOH (всего около 20 г) до осветления раствора. Доводили объём раствора до 100 мл, рН доводили до 8,0.

Клей для бленд. Погружали полоску скотча длиной 8-10 см в 20 мл хлороформа. Липкий слой скотча растворялся, вследствие чего раствор приобретал свойства клея.

2.3.2. Приготовление препаратов

Метод приготовления препаратов для электронно-микроскопического исследования синаптомемных комплексов растений основан на распластывании (спредировании) МКП, используя гипотонический шок на поверхности раствора сахарозы (Gillies, 1981; Fedotova *et al.*, 1989).

На основе экспресс-тестирования стадий мейоза и определения цитологического фенотипа (**Раздел 2.2.4**) мы отбирали колосья растений требующегося образца (дикий тип, мейотические мутанты), в которых наблюдали МКП в профазе I мейоза. В углубление часового стекла наносили каплю среды Гилиса и помещали в неё пыльники, в которых по нашей оценке протекает профазы I мейоза. Пыльники разрезали на две части и выдавливали содержимое в среду. Суспензию переносили в пробирку на 1 или 1,5 мл и гомогенизировали. На предметное стекло автоматической пипеткой наносили 4 капли раствора 0,2М сахарозы и на их поверхность

раскапывали полученную суспензию клеток. Через 1,5-2 минуты прикасались к каплям другим предметным стеклом и равномерно распределяли суспензию по покрытой пластиком части предметного стекла. Далее препараты фиксировали в охлаждённом (“ice-cold”) 4% растворе параформальдегида и промывали раствором 0,4% “Pfoto-Flo”. Поскольку “Pfoto-Flo” является детергентом, в дальнейшем раствор AgNO_3 хорошо “растекался” по поверхности препарата.

2.3.3. Контрастирование препаратов и отбор клеток для исследования

На препарат наносили каплю 70% раствора AgNO_3 , накрывали покровным стеклом и помещали в водяной бане в термостат на 56°C. Степень окрашивания контролировали под световым микроскопом. После обнаружения 3-4 хорошо прокрашенных клеток, препарат отмывали в бидистиллированной воде и высушивали на воздухе.

Окрашенный препарат изучали под световым микроскопом и вырезали клетки с хорошо распластанными СК объективом с алмазным метчиком. Под бинокулярной лупой подкапывали воду по границе вырезанных кружков пластика. Если плёнка не отделялась от стекла, то вместо воды подкапывали слабый раствор плавиковой кислоты, который затем быстро и тщательно отмывали бидистиллированной водой. Бленду, зажатую в пинцете, смачивали в жидком клее и высушивали на воздухе, после чего касались блендой поверхности всплывшего кружка пластика. Высушивали на воздухе.

Полученные бленды исследовали на электронном микроскопе JEM-100В при увеличении 3-8 тыс. раз.

2.4. Иммунофлуоресцентные исследования

2.4.1. Приготовление препаратов

Препараты для иммуноцитохимического изучения готовились на стёклах, покрытых слоем поли-L-лизина, аналогично методу, описанному в Разделе 2.3.3. Фиксацию препаратов также проводили нанесением на них 4% раствора параформальдегида (в течение 7 минут), после промывки и высушивания препараты помещались на хранение при -20 °С.

2.4.2. Разведение антител

Сыворотки лиофилизированных первичных антител против белков AtASY1 и AtZYP1, полученные от Л.А. Чельшевой (INRA-AgroParisTech, Centre de Versailles-Grignon, Франция), восстанавливали необходимым объёмом бидистиллированной воды. Таким образом, мы получали неразведённый раствор первичных антител. Далее антитела разводили в ADB (antibody delution buffer: PBS, 3% BSA, 0,05 Triton X-100) с добавлением 0.05% азиды натрия до нужной концентрации.

Вторичные антитела (коммерческие) также разводили в ADB с добавлением 0,05% азиды натрия. Растворы антител хранили строго при +4°C. В **Таблице 2** представлен полный набор использованных в работе антител.

Таблица 2. Первичные и вторичные антитела, использованные в иммуноморфологических исследованиях

Первичные антитела, разведение	Вторичные антитела, разведение
1. Кроличьи антитела против белка ASY1 арабидопсиса <i>A.thaliana</i> , 1:250	1. Конъюгированные с флуорохромом Sy3 козы антитела против IgG кролика, 1:300
	2. Конъюгированные с флуорохромом FITC козы антитела против IgG кролика, 1:500
2. Крысиные антитела против белка ZYP1 арабидопсиса <i>A.thaliana</i> , 1:150	4. Конъюгированные с флуорохромом Alexa 546 козы антитела против IgG крысы, 1:500
	5. Конъюгированные с флуорохромом FITC куриные антитела против IgG крысы, 1:400

2.4.3. Иммуноокрашивание препаратов

Препараты распластанных ядер извлекали с -20°C, выдерживали при комнатной температуре 10 минут (до исчезновения конденсата), отмачивали в PBS (pH = 7,4) в течение 10 минут. Затем инкубировали препараты в водяной бане с первичными антителами при +4°C в

течение ночи. Наносили по 10 мкл разведённого раствора антител на стекло. Стёкла промывали 3 раза по 5 минут в PBS, наносили соответствующие растворы вторичных антител и инкубировали препараты в водяной бане в термостате при +37,5°C в течение 3 часов. После инкубации с вторичными антителами стёкла промывали 3 раза по 5 минут в PBS. Далее заключали препараты в среду “Vectashield” с красителем DAPI. Накрывали препарат покровным стеклом и приступали к анализу препаратов.

2.4.3. Исследование препаратов на флуоресцентном микроскопе

Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager D1 (Carl Zeiss), оборудованного объективами PLAN-NEOFLUAR, ртутной лампой HBO, черно-белой CCD камерой накопления сигнала AxioCam HRm Rev.3 (Carl Zeiss) и набором фильтров (Таблица 3). Для получения цифровых изображений использовалось программное обеспечение Axiovision Release 4.6.3. Полученные изображения затем обрабатывались в программе Adobe Photoshop.

Таблица 3. Фильтры, использованные при работе на флуоресцентном микроскопе

Фильтр	Диапазон	Используемые флуорохромы
Filter set 01 shift free	Широкополосный фильтр (EX BP 365/12, BS FT 395, EM LP 397)	DAPI
Filter set 09 shift free	от 515 нм и выше (EX BP 450-490, BS FT 510, EM LP 515)	FITC
Filter set 43 shift free	Узкополосный фильтр (EX BP 550/25, BS FT 570, EM BP 605/70LP 590)	Alexa 546 Cy3

2.5. Молекулярно-генетический анализ

2.5.1. Выделение ДНК

ДНК выделяли из молодых листьев с использованием СТАВ-метода (Bernatzky, Tanksley, 1986). С растения отбирали листья и помещали в пробирки на 1,5 мл. Добавляли 250 мкл 2х СТАВ-буфера и растирали листья пестиком. Добавляли 200 мкл 2х СТАВ-буфера и 450 мкл дистиллированной воды. Закрывали крышки пробирок и перемешивали их содержимое 30 раз, ставили в водяную баню на 1,5 ч при 65°C. После остужения добавляли 600 мкл хлороформ-изоамина (25:1) и перемешивали содержимое пробирок. Центрифугировали 15 мин на 14 тыс. об./мин, после чего отбирали пипеткой 800 мкл верхней фракции и переносили в новую пробирку на 1,5 мл. Добавляли 700 мкл изопропанола и перемешивали содержимое пробирок 30 раз. Центрифугировали при тех же условиях, после чего изопропанол сливали. Добавляли 300 мкл этанола и через 10 мин пробирки центрифугировали 5 мин на 14 тыс. об./мин. Сливали этанол, пробирки высушивали. Растворяли осевшую на внутренней поверхности пробирок ДНК в 200 мкл дистиллированной воды. Хранили в холодильнике при +4°C.

2.5.2. Полимеразная цепная реакция

При работе с растениями из семьи, расщепляющейся по мутации *su9*, мы использовали SSR-маркер *Xgwm132-2R*, локализованный в прицентромержной области длинного плеча хромосомы 2R (Khlestkina *et al.*, 2004) и тесно сцепленный с мейотическим геном *Sy9* (Малышев *и др.*, 2009). Последовательность праймеров была взята из базы данных GrainGenes (<http://wheat.pw.usda.gov/GG3/>). Праймеры синтезировали в компании “Синтол”.

5' ТАССАААТСГАААСАТСАГГ 3'

5' САТАТСААГГТСТССТТСССС 3'

Для постановки ПЦР готовили ПЦР-смесь, в которой содержалось 10% 10х Таq-буфера, 10% dNTP, 6% MgCl₂, 2% праймер I, 2% праймер II, 2% пробы ДНК, 66% дистиллированной воды и 2% Таq-полимеразы. ПЦР проводили на амплификаторе Biorad 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.

2.5.3. Электрофорез

Электрофорез продуктов амплификации проводили в 2,5% агарозном геле, содержащем 0,5М TBE. В 180 мл дистиллированной воды растворяли 5 г агарозы и добавляли 20 мл 5х TBE. Нагревали в микроволновой печи. Добавляли 6 мкл бромистого этидия. Собирали ванночку, заливали гель и ждали 10-15 минут. Застывший гель помещали в камеру для электрофореза, раскапывали образцы. Электрофорез проводили при 150 В. Изображения получали с помощью цифровой фотокамеры Gel Doc XR с использованием программы Quantity One.

2.6. Критерии определения стадий мейоза

При свето-микроскопическом исследовании стадий мейоза (диакинез – тетрады микроспор) мы пользовались стандартными критериями, принятыми в классической цитогенетике растений (Пухальский и др., 2007; Паушева, 1988).

При изучении профазы I (электронно-микроскопические и иммунофлуоресцентные исследования) мы руководствовались критериями, которые использовались ранее при изучении мейоцитов растений ржи дикого типа и мейотических мутантов (Богданов, Коломиец, 2007; Fedotova *et al.*, 1989).

У растений дикого типа стадию лептотены определяли по начавшемуся процессу формирования ОЭ, которые на этой стадии имеют наиболее протяжённую длину. При переходе к стадии зиготены ОЭ укорачиваются и утолщаются, эти процессы продолжаются и далее (вплоть до пахитены). Главный критерий стадии зиготены при нормальном мейозе – кластрирование концов ОЭ в ограниченной области ядра (фигура “букета”). В зиготене начинается образование СК. Синапсис начинается в первую очередь вблизи теломер, кроме того, по длине бивалентов одновременно возникают точки инициации синапсиса. Стадию пахитены определяли по полностью сформированным СК бивалентов. Противоположные концы СК на стадии пахитены располагаются далеко друг от друга. Дополнительный критерий стадий зиготены и пахитены – взаимное зацепление, интерлокинг и разрывы ОЭ и СК. Начало стадии диплотены определяли по взаимному отталкиванию ЛЭ (десинасис, ранняя диплотена). Среднюю диплотену выявляли по наличию спирализации компонентов разрушающихся СК. Поздняя диплотена – в кариоплазме мейоцитов сохраняются только одиночные фрагменты СК с парными утолщениями на них.

При изучении мутантов *su11* пользовались теми же критериями, что и для растений дикого типа. За исключением нарушений гомологичности синапсиса, события профазы I этих мутантов соответствуют событиям профазы I при нормальном мейозе.

Мейотические мутанты *sy9*, *sy1* и *sy19* характеризуются сильными нарушениями синапсиса. В их мейоцитах, начиная со стадии зиготены, существенно нарушена программа событий профазы I. Поэтому можно говорить лишь о стадиях, аналогичным зиготене, пахитене и диплотене при нормальном мейозе, у этих мутантов. Стадию лептотены у этих мутантов определяли аналогично случаю дикого типа. Стадию, аналогичную зиготене, у мутантов *sy9* и *sy19* определяли по наличию кластеризации теломер. Стадию, аналогичную пахитене, – по рассредоточенным по ядру теломерам и по укороченным и утолщенным ОЭ. У мутантов *sy1* нарушено образование фигуры “букета”, поэтому стадию, аналогичную зиготене-пахитене, у этих мутантов выявляли по укороченным и утолщенным ОЭ. Вспомогательным критерием служили взаимные зацепы и натяжение ОЭ. Стадию, аналогичную диплотене, у мутантов *sy9* определяли по постепенной спирализации ОЭ; у мутантов *sy1* и *sy19* – по постепенной фрагментации ОЭ.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изучение наследования и проявления мейотической мутации *su11*

Материал для исследования. Для изучения мейотической мутации *su11* нам были предоставлены семена от самоопыления растения №130/2 из Петергофской коллекции мейотических мутаций ржи. Растение №130/2 – это гетерозиготное по мутации *su11* растение пятого поколения от инбридинга (I_5) из линии Mc11. В следующем поколении произошло расщепление на растения дикого типа и мутантов *su11* и мы начали подробное исследование мутации. Мы изучили наследование и проявление мутации в трёх последовательных поколениях (I_6 - I_8). Растения выращивали на опытном поле лаборатории генетики и цитологии Московского НИИСХ “Немчиновка” (Московская область) в 2007-2009 гг.

3.1.1. Наследование мутации

В **Таблице 4** представлена родословная (последовательные поколения от самоопыления) растений ржи, изученных в данной работе. Суммарно нами изучено 15 семей, образованных потомками гетерозигот, общей численностью 109 растений (**Таблица 5**). Во всех семьях наблюдалось расщепление на два фенотипических класса: дикий тип и мутантные по мейозу формы. Тестирование мейотических фенотипов вели по цитологическим показателям, которые будут описаны ниже. Численности 13 семей оказались слишком малыми для анализа расщепления. Для двух семей удалось провести статистическую обработку расщепления на основе критерия χ^2 . Расщепление в этих двух семьях оказалось однородным ($X^2_{\text{гет}} = 0.50$, $P=0.480$) и расчёт проводили по объединённым данным. Из 34 изученных растений 10 характеризовались аномальным мейозом. Такое соотношение растений хорошо соответствует теоретически ожидаемому при моногенном наследовании ($\chi^2_{3:1} = 0.35$, $P = 0.554$). Если округлить расчёты и провести анализ расщепления по объединённым данным всех 15 семей (109 растений, 84 из которых растения дикого типа и 25 мутанты), то будет наблюдаться ещё более хорошее соответствие моногенному расщеплению ($\chi^2_{3:1} = 0.25$, $P = 0.617$).

Кроме того, были изучены семьи, образованные в следующем поколении в результате самоопыления полустерильных мутантных растений. Было исследовано 16 таких растений, при этом все они имели мутантный цитологический фенотип (**Таблица 6**).

Таблица 4. Последовательные поколения от самоопыления растений ржи, наследовавших мутацию *su11*. Справа от номера растений указано модальное число бивалентов и унивалентов.

Цветом выделены мутантные растения.

2007 г.		2008 г.		2009 г.			
№1	7"	№18	7"				
		№30	7"				
		№34	5"+4'	№6	5"+4'		
		№35	7"	№12	7"		
				№16	7"		
				№18	6"+2'		
				№21	7"		
				№22	7"		
		№36	7"				
		№43	7"				
№44	7"						
№3	7"	№1	7"				
		№2	7"				
		№3	7"				
		№6	6"+2'				
		№7	7"				
		№17	7"				
		№20	7"				
		№23	5"+4'	№2	5"+4'		
				№4	6"+2'		
				№13	6"+2'		
				№19	6"+2'		
				№25	5"+4'		
				№26	6"+2'		
		№24	7"				
		№25	7"				
		№26	6"+2'	№11	5"+4'		
				№17	6"+2'		
№23	6"+2'						
№27	6"+2'						
№40	5"+4'	№5	6"+2'				
№41	7"						
№4	7"	№4	7"				
		№5	7"				
		№9	7"				
		№10	7"				
		№11	6"+2'				
		№12	7"				
		№13	7"				
		№14	7"				
		№15	7"				
№16	7"						

Продолжение таблицы:

2007 г.		2008 г.		2009 г.			
№4	7"	№19	7"				
		№21	5"+4'				
		№22	7"	№8	7"		
				№10	7"		
				№15	7"		
				№6	6"+2'		
		№28	5"+4'				
		№31	5"+4'				
		№32	7"				
		№37	5"+4'	№9	5"+4'		
		№38	7"				
		№45	7"				
		№48	7"				
№5	6"+2'						
№6	7"						
№8	7"	№42	7"				
		№46	7"				
		№47	7"				
		№49	7"				
		№8	6"+2'	№1	6"+2'		
				№3	6"+2'		
				№7	6"+2'		
				№14	6"+2'		
		№29	7"				
№33	7"						
№39	7"						

Таблица 5. Анализ расщепления по мутации *sy11* в потомствах самоопылённых гетерозигот

Родительское растение	Всего растений в семье	Из них:		$\chi^2_{3:1}$	P
		растений дикого типа	мутантов <i>sy11</i>		
№130/2	7	6	1	-	-
№1 (2007 г.)	7	6	1	-	-
№3 (2007 г.)	14	9	5	0,86	0,355
№4 (2007 г.)	20	15	5	0	1
№8 (2007 г.)	5	4	1	-	-
№35 (2008 г.)	5	4	1	-	-
№22 (2008 г.)	5	3	2	-	-
№232 ¹	4	3	1	-	-
№1204 ¹	6	5	1	-	-
№417 ¹	8	7	1	-	-
№418 ¹	3	2	1	-	-
№419 ¹	4	3	1	-	-
№317 ¹	5	4	1	-	-
№130 ¹	5	4	1	-	-
№131 ¹	11	9	2	-	-
№3 + №4 (2007 г.)	34	24	10	0,35	0,552
\sum (n = 15)	109	84	25	0,25	0,619

¹ Данные по расщеплению в этих потомствах предоставлены С.П. Соснихиной. Растения выращивались на опытных полях кафедры генетики СПбГУ.

$$\chi^2_{0,05} = 3.84 \text{ (d.f. = 1)}$$

Таблица 6. Анализ расщепления в потомствах мутантных растений

Родительское растение	Всего растений в семье	Из них:	
		дикого типа	мутантов
№34 (2008 г.)	1	0	1
№23 (2008 г.)	6	0	6
№26 (2008 г.)	3	0	3
№40 (2008 г.)	1	0	1
№37 (2008 г.)	1	0	1
№8 (2008 г.)	4	0	4
\sum	16	0	16

3.1.2. Свето-микроскопический анализ стадий мейоза

Подробный цитологический анализ был проведён для 29 мутантных растений и 10 растений дикого типа. Наиболее информативная стадия для исследования с помощью светового микроскопа – метафаза первого деления мейоза. Очевидный цитологический дефект, вызываемый мутацией *sy11* – наличие унивалентов в МІ. Число унивалентов у растений варьировало от 0 до 10 в различных МКП у всех мутантных растений (**Рисунок 4**).

В **Таблице 7** представлены распределения МКП в зависимости от числа унивалентов у мутантных растений и растений дикого типа. В среднем число унивалентов для 29 мутантных растений составило $2,7 \pm 0,06$ унивалента на клетку. У растений дикого типа униваленты в МІ встречались редко.

Для более точного описания картины поведения хромосом в МІ было проведено изучение распределения числа хиазм по МКП (**Таблица 8**). Из таблицы видно, что хиазмообразование у данного мейотического мутанта достоверно снижено более чем в 1.5 раза. Помимо унивалентов, у которых отсутствовали обе хиазмы, наблюдались биваленты с одной хиазмой (открытые биваленты). Однако если посмотреть на распределение хиазм на стадии диакинеза, то такого контраста между диким типом и мутантом наблюдаться не будет, хотя различия достоверны (**Таблица 9**). Можно заключить, что МКП мутантов *sy11* при прохождении стадии диакинеза теряют не менее 30% хиазм. К началу МІ это выражается в перераспределении частоты классов пар гомологов в сторону увеличения числа пар, не объединённых хиазмами и объединённых только одной хиазмой, то есть в появлении унивалентов и открытых бивалентов.

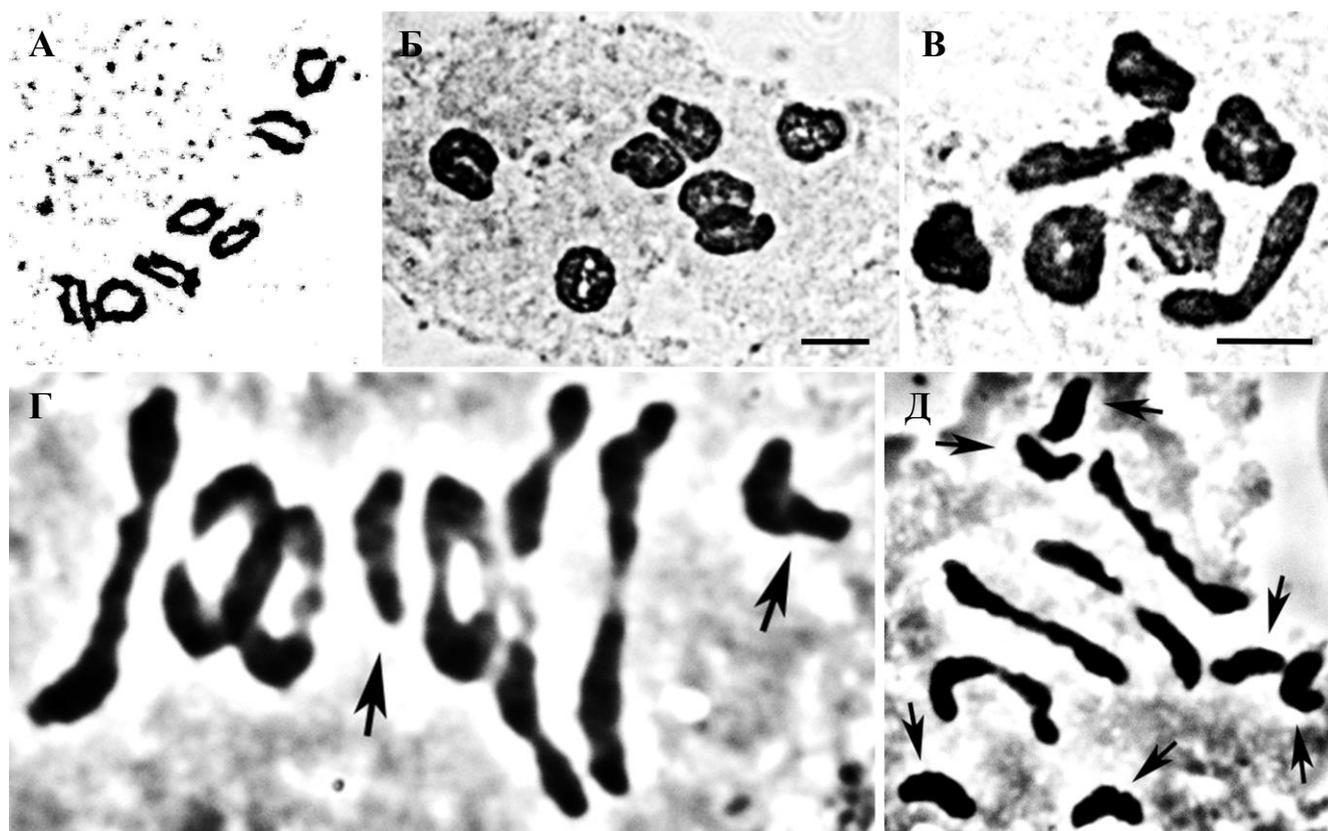


Рисунок 4. Диакинез и метафаза I у растений дикого типа (А – В) и у мейотических мутантов *sy11* (Г, Д):

А – диакинез у растения ржи дикого типа (7 закрытых бивалентов);

Б, В – метафаза I у растений ржи дикого типа (Б – 7 закрытых бивалентов, В – 5 закрытых бивалентов и 2 открытых бивалента);

Г, Д - метафаза I у мейотических мутантов *sy11*: Г – 6 бивалентов (3 закрытых и 3 открытых) и 2 унивалента, Д – 4 открытых бивалента и 6 унивалентов. Униваленты показаны стрелками. Масштабные отрезки – 5 мкм.

Таблица 7. Распределение МКП в зависимости от числа унивалентов в метафазе I у мутантов *sy11* и растений дикого типа

Образец	Число исследованных растений, шт.	Число исследованных клеток, шт.	МКП (%) с числом унивалентов							Среднее число унивалентов на мейоцит, шт.	
			0	2	4	6	8	10	12		14
Дикий тип	17	289	93,7	6,3							0,1 ± 0,03
Мутанты <i>sy11</i>	29	980	32,6	36,0	22,9	6,6	1,8	0,1			2,2 ± 0,06

Таблица 8. Распределение пар гомологов на стадии метафазы I в зависимости от числа хиазм у мутантов *sy11* и растений дикого типа

Образец	Число растений, шт.	Число клеток, шт.	Число пар гомологов, шт.	Доля пар гомологов с числом хиазм, %			Среднее число хиазм на бивалент, шт.
				0	1	2	
Дикий тип	7	291	4725	1,0	10,8	88,1	1,8 ± 0,01
Мутанты <i>sy11</i>	17	675	2037	16,0	56,8	27,2	1,1 ± 0,01

Таблица 9. Распределение пар гомологов на стадии диакинеза в зависимости от числа хиазм у мутантов *sy11* и растений дикого типа

Образец	Число растений, шт.	Число клеток, шт.	Число пар гомологов, шт.	Доля пар гомологов с числом хиазм, %				Среднее число хиазм на бивалент, шт.
				0	1	2	3	
Дикий тип	6	43	301	0.7	16.3	81.4	1.7	1.8±0.02
Мутанты <i>sy11</i>	8	68	476	2.3	30.2	66.4	1.0	1.7±0.02

В некоторых клетках мутантных растений были выявлены мультивалентные ассоциации. В виду особенностей объекта подробный их учёт затруднён, однако нам удалось изучить 351 МКП и среди них в 3% МКП были выявлены мультиваленты. Сам факт наличия мультивалентных ассоциаций в МІ очень важно дополняет цитологический фенотип: для мутантов характерна не только ослабленная способность поддержания хиазм, но и имеет место образование хиазм между негомологичными районами хромосом (косвенным доказательством чего и являются единичные мультиваленты, дошедшие до МІ).

Цитологический анализ последующих стадий мейоза был проведён С.П. Соснихиной и коллегами (кафедра генетики СПбГУ), его результаты (**Таблица 10**) вошли в нашу совместную публикацию (Голубцов *и др.*, 2010). Отставание отдельных хромосом можно рассматривать как результат неправильного расхождения унивалентов. Мосты, в свою очередь, подтверждают наличие ошибок хиазообразования в профазе I. Встречались МКП мутантов с неравным делением, фрагментами хромосом и тяжами хроматина. В результате всех описанных нарушений формировались дефектные тетрады микроспор: тетрады с микроядрами, диады, триады, монады и полиады. В качестве интегрирующего показателя нарушений мейоза мы рассчитали тетрадный индекс: отношение числа нормальных тетрад к общему числу тетрад (Пухальский *и др.*, 2007). Для растений дикого типа из популяции Вятка он был равен $98.8 \pm 0.2\%$, для растений дикого типа из инбредной линии Мс11 – $90.3 \pm 0.7\%$, а для мутанта *sy11* он оказался снижен до $54.5 \pm 1.2\%$. Данный показатель не обладает высокой чувствительностью, но подтверждает повышенное число аномалий у мутантов на завершающих этапах мейоза.

В конце раздела мы приведём данные по завязываемости зерновок от самоопыления. Для растений дикого типа она составила $11,98 \pm 2,75\%$ (варьировала от 3,86 до 23,03%, $n = 6$), а для мутантов *sy11* – $2,2 \pm 0,58\%$ (варьировала от 0 до 10,00%, $n = 19$). Таким образом, у мутантов завязываемость оказалась снижена примерно в 5 раз. Данный факт наглядно иллюстрирует влияние аномалий мейоза на фертильность растений. Несмотря на широкий спектр нарушений, мутантные растения стабильно завязывали единичные зерновки, то есть, мутация *sy11* является полустерильной. Мы объясняем это невысокой степенью проявления аномалий (относительно других мутаций из коллекции), что оставляет небольшой шанс для образования нормальных гамет.

Таблица 10. Характеристика анафазы I, анафазы II и тетрад микроспор у мутантов *su11* и растений дикого типа

Стадия мейоза	Признак	Мутанты <i>su11</i>	Растения дикого типа	
			Из инбредной линии Мс11	Из популяции Вятка
AI	Число растений	12	8	26
	Число клеток	888	950	4084
	из них с нарушениями (%)	45.2 ± 1.67	11.7 ± 0.8	2.6 ± 0.25
	в т.ч. с отставанием хромосом	24.3 ± 1.44	6.9 ± 0.82	1.0 ± 0.16
	с мостами	19.0 ± 1.32	3.1 ± 0.56	0.8 ± 0.14
	с фрагментами хромосом	2.1 ± 0.49	1.7 ± 0.42	0.7 ± 0.13
	с неравным делением	2.0 ± 0.47	0	0
	с тяжами хроматина	0.3 ± 0.19	0	0
AII	Число растений	10	7	26
	Число клеток	886	739	4462
	из них с нарушениями (%)	54.4 ± 1.67	14.2 ± 1.28	1.3 ± 0.17
	в т.ч. с отставанием хромосом	40.6 ± 1.65	13.0 ± 1.24	1.0 ± 0.15
	с мостами	9.1 ± 0.96	0.9 ± 0.36	0.3 ± 0.08
	с фрагментами хромосом	1.3 ± 0.37	0	0
	с неравным делением	2.3 ± 0.49	0	0.02 ± 0.02
	с тяжами хроматина	0.2 ± 0.11	0	0
Тетрады микроспор	Число растений	12	13	24
	Число клеток	1797	1887	3732
	из них с нарушениями (%)	45.5 ± 1.17	9.8 ± 0.68	1.2 ± 0.19
	в т.ч. с микроядрами	30.9 ± 1.09	8.8 ± 0.65	1.1 ± 0.17
	диады с микроядрами	9.1 ± 0.68	0	0
	триады и монады	1.1 ± 0.24	0	0
	с неравным делением	1.7 ± 0.30	0.9 ± 0.22	0.1 ± 0.05
	с тяжами хроматина	0.1 ± 0.08	0	0

3.1.3. Электронно-микроскопический анализ профазы I

На ультраструктурном уровне было исследовано 40 МКП четырех растений дикого типа (№19, №20, №38, №22 – 2008 г.) и 84 МКП пяти мутантов *sy11* (№6, №23 и №27 – 2008г.; №5 и №2 – 2009 г.). Мы анализировали ультраструктурные картины строения СК на стадиях от лептотены до поздней диплотены. Поскольку характер синапсиса подробно и достоверно возможно оценить на стадиях не ранее средней зиготены и не позднее ранней диплотены, именно этому диапазону субстадий было уделено основное внимание.

У растений дикого типа нарушений в строении СК не было выявлено. На стадии пахитены все СК состояли из двух латеральных элементов и были непрерывны по длине (**Рисунок 5**). Нарушения в формировании СК в ходе зиготены и естественной деградации СК во время диплотены также не были выявлены.

У мутантных растений мы обнаружили нарушения синапсиса гомологов, а именно смену партнеров спаривания (“переключения” – switches) и синапсис латеральных элементов СК “на себя” («складки» – foldbacks) (**Рисунки 6, 7 и 8**). В местах таких нарушений были обнаружены зоны асинапсиса. При подсчёте числа аномалий каждое событие “переключения” и каждая “складка” учитывались как отдельные события. “Переключения” и “складки” имели общую динамику изменения по субстадиям, поэтому мы суммировали два показателя и делали дальнейшие заключения по объединённым данным.

Для статистической оценки значимости различий среднего числа нарушений на клетку по стадиям мы сформировали три выборки клеток: 1) средняя зиготена, 2) поздняя зиготена, ранняя и средняя пахитена и 3) поздняя пахитена и ранняя диплотена. Использовали двухсторонний двухвыборочный t-тест для выборок с различными дисперсиями. Оказалось, что различия достоверны для всех трёх пар сравнения на 95% уровне значимости (**Таблица 11**).

Цитологически данный результат можно интерпретировать следующим образом. Проявление мутации можно наблюдать уже на стадии средней зиготены, когда наблюдаются единичные нарушения в строении СК, который только начал формироваться. В поздней зиготене, по мере увеличения общей длины СК, число нарушений достоверно увеличивается не менее чем в 5 раз. Однако на протяжении длительной стадии пахитены происходит постепенное снижение среднего числа дефектов на клетку и к стадиям поздней пахитены – ранней диплотены снижение становится достоверным.

Факт наличия “переключений” партнёров спаривания в пахитене (и их частичное сохранение вплоть до стадии диплотены) логично объясняет присутствие мультивалентных ассоциаций на более поздних стадиях мейоза. Результаты свето-микроскопического и электронно-микроскопического анализа МКП взаимно дополняют и хорошо объясняют полученные результаты.



Рисунок 5. Электронно-микроскопическая фотография распластанного ядра мейоцита растения ржи дикого типа на стадии пахитены. Масштабный отрезок – 5 мкм.

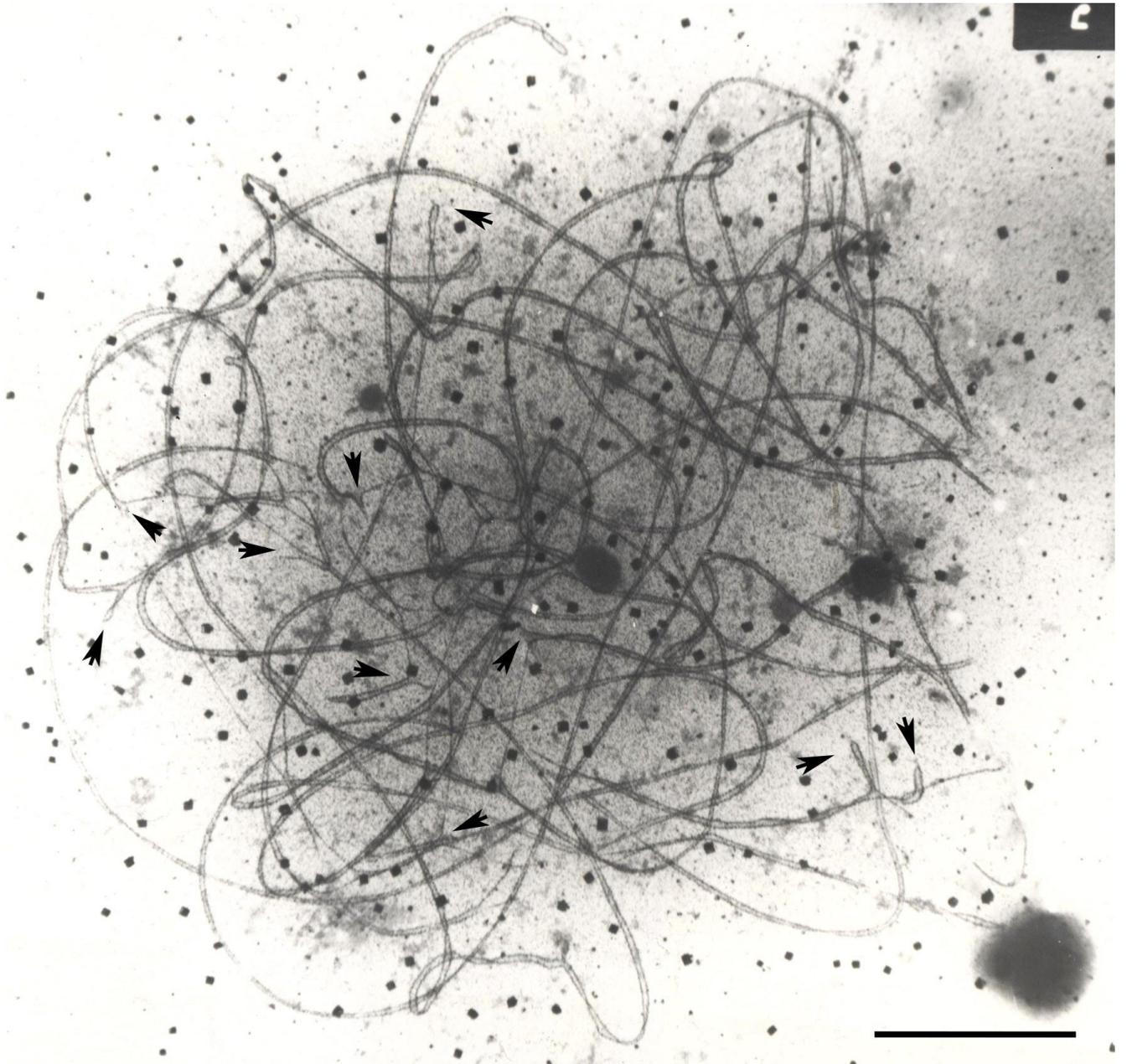


Рисунок 6. Электронно-микроскопическая фотография распластанного ядра мейоцита мутанта *sy11* на стадии поздней зиготены. Многочисленные участки негомологичного синapsиса – “переключения” и “складки” – отмечены стрелками. Масштабный отрезок – 5 мкм.

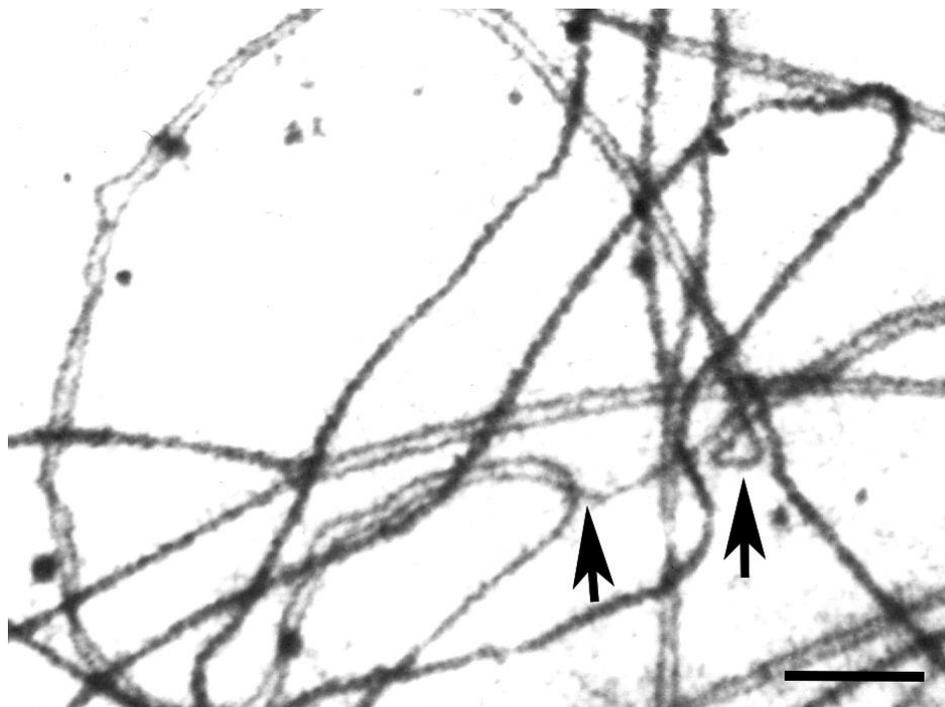


Рисунок 7. Фрагмент распластанного ядра мейоцита мутанта *sy11* на стадии зиготены. Стрелками показаны два “переключения” партнёров спаривания. Всего в ассоциации участвуют четыре латеральных элемента СК. Масштабный отрезок – 1 мкм.

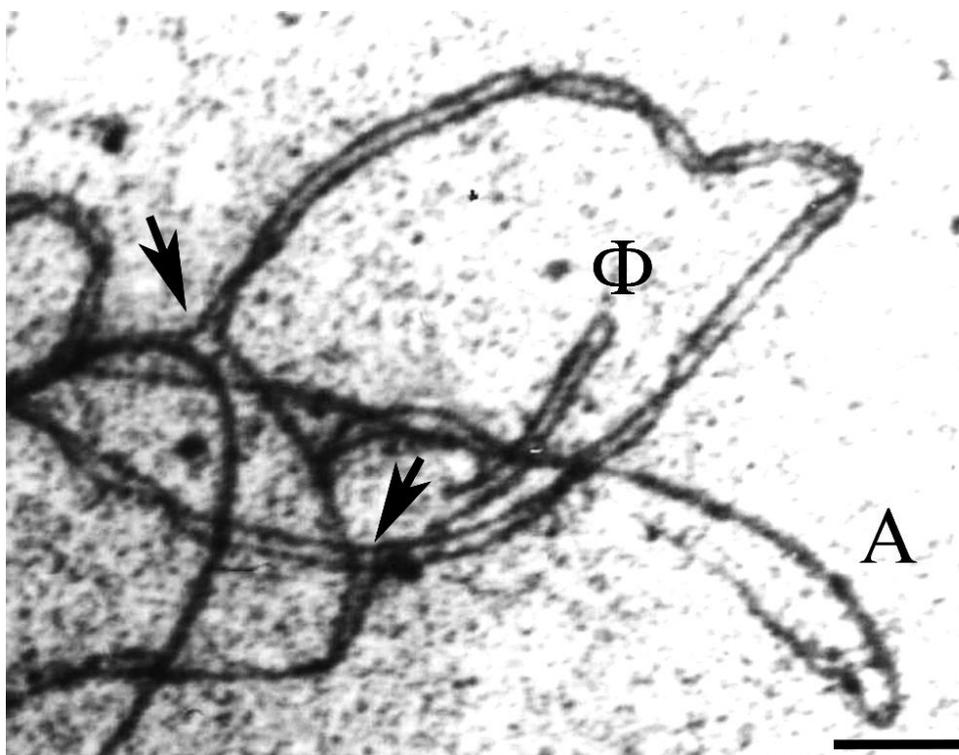


Рисунок 8. Фрагмент распластанного ядра мейоцита мутанта *sy11* на стадии пахитены. Негомологичный синапсис привёл к образованию сложной аномальной ассоциации латеральных элементов СК. Отмечены “переключения” (стрелки), “складка” (Φ) и обширная зона асинопсиса (А). Масштабный отрезок – 1 мкм.

Таблица 11. Динамика событий негомологичного синапсиса по стадиям профазы I у 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	$t_{1-2} = 5.54 > t_{0.05} = 2.07$		
		$t_{2-3} = 2.44 > t_{0.05} = 2.07$	
	$t_{1-3} = 3.09 > t_{0.05} = 2.30$		

3.1.4. Обсуждение

Мутации гетерологичного синапсиса (индискриминантного, негомологичного) описаны у лука (Jenkins, Okumus, 1992), кукурузы (Golubovskaya *et al.*, 1997b), дрожжей (Nairz, Klein 1997). Большое число таких мутаций обнаружено у ржи (Соснихина *и др.*, 2005; Sosnikhina *et al.*, 2005).

Генетический анализ новой мутации *sy11* показал, что признак аномальности мейоза наследуется моногенно и рецессивно. Цитологическое проявление мутации *sy11* соответствует ранее изученным мутациям из группы мутаций гетерологичного синапсиса. На самых ранних стадиях мейотического деления дефекты не выявляются. МКП нормально и без задержки вступают в мейоз. В лептотене формируются ОЭ хромосом, и происходит формирование фигуры «букета», в отличие от мутанта *sy1*, у которого нарушена кластеризация теломер и нет «букета» (Mikhailova *et al.*, 2001). При переходе к стадии ранней зиготены инициируется синапсис. В средней зиготене выявляются единичные нарушения в формирующихся СК, свойственные всем мутациям с гетерологичным синапсисом (Соснихина *и др.*, 2005; Sosnikhina *et al.*, 2005). Однако степень проявления нарушений и дальнейшая их судьба по субстадиям профазы I различна. У изученного нами мутанта *sy11* уже в поздней зиготене число нарушений достоверно увеличивается в несколько раз, достигая своего пика. На протяжении ранней и средней пахитены происходит постепенная их коррекция, и к концу поздней пахитены – началу

ранней диплотены происходит достоверное снижение числа аномалий. Схожей тенденцией обладает мутация *sy7*, но степень её проявления (среднее число нарушений на клетку) выше (Fedotova *et al.*, 1994). Мутации *sy8* и *sy10* также являются более сильными и их пики нарушений приходится на стадии ранней-средней пахитены и поздней пахитены соответственно (Fedotova *et al.*, 1994; Соснихина *et al.*, 2007). Мутация *sy2* вызывает единичные нарушения на протяжении всей профазы I (Соснихина *et al.*, 2002). Несмотря на существенные различия, все мутации обладают одной особенностью: к началу диплотены число ошибок синапсиса снижается.

В диакинезе у мутантов *sy11* формируются конденсированные биваленты, но частота образованных хиазм у мутантов *sy11* достоверно снижена по отношению к дикому типу. Более того, к началу метафазы I происходит потеря ещё примерно трети хиазм, что даёт основание предположить о нарушении одного из этапов сложного процессов рекомбинации и хиазмообразования. Подобная тенденция описана для мутаций *sy18* и *sy2* (Соснихина *и др.*, 2009). В метафазе I у мутанта *sy11* кроме открытых бивалентов и унивалентов наблюдаются единичные мультиваленты. Наличие мультивалентных ассоциаций, несомненно, является следствием негомологичного синапсиса, выявленного нами в профазе I. Стоит отметить, что такие ассоциации с различной частотой были описаны у всех мутантов ржи с гетерологичным синапсисом (Соснихина *и др.*, 2005; Sosnikhina *et al.*, 2005). На более поздних стадиях мейоза выявляется широкий спектр нарушений, которые можно рассматривать как следствие аномалий, регистрируемых в МI накануне сегрегации гомологичных хромосом. Для мутантов *sy11* характерна повышенная частота мостов и отставших хромосом в анафазе I и в анафазе II. Отставание отдельных хромосом можно рассматривать как результат неправильного расхождения унивалентов. Мосты, в свою очередь, косвенно подтверждают наличие ошибок хиазмообразования в профазе I. Также встречались МКП мутантов с неравным делением, фрагментами хромосом и тяжами хроматина. В результате всех описанных нарушений формировались дефектные тетрады микроспор: тетрады с микроядрами, диады, триады, монады и полиады. Завязываемость зерновок у мутантов снижена примерно в 6 раз. Данный факт наглядно иллюстрирует влияние аномалий мейоза на фертильность растений. Несмотря на широкий спектр нарушений, мутантные растения стабильно завязывают единичные зерновки, то есть мутация *sy11* является полустерильной. Это можно объяснить невысокой степенью проявления аномалий (относительно других мутаций гетерологичного синапсиса из Петергофской коллекции), что оставляет небольшой шанс для образования нормальных гамет.

Мутация *sy11* является восьмой по времени описания мутацией ржи с гетерологичным синапсисом, ранее были описаны мутации *sy2*, *sy6*, *sy7*, *sy8*, *sy10*, *sy18* и *sy19*. С помощью тестов на аллелизм было показано, что мутации *sy2* и *sy10*; *sy2* и *sy19*; *sy18* и *sy19* неаллельны между

собой (Соснихина *и др.*, 1994; Соснихина *и др.*, 2005; Соснихина *и др.*, 2009). Ген *sy10* локализован на длинном плече хромосомы 5R, *sy18* – в центромерной области хромосомы 2R, *sy19* – на длинном плече хромосомы 7R (Долматович *et al.* 2013а; Долматович *et al.* 2013б). Более того, изучение двойных мутантов показало, что ген *sy10* начинает действовать в мейозе раньше генов *sy19* и *sy2* (Соснихина *и др.*, 2005). Наличие большого числа генов, отвечающих за строгость гомологии синапсиса, говорит о том, что этот процесс насыщен событиями на молекулярном уровне и находится под строгим генетическим контролем.

3.2. Ревизия цитологического проявления мейотической мутации *su9*

Мутация *su9* является асинаптической мутацией ржи, которая активно исследуется современными методами молекулярной цитогенетики (Mikhailova *et al.*, 2001; Ловцюс *и др.*, 2009; Михайлова *и др.*, 2010). Однако на сегодняшний день не разрешена существенная проблема несоответствия цитологических картин в профазе и метафазе первого мейотического деления. В метафазе I у мутантов *su9* примерно в 2/3 МКП наблюдаются только униваленты. Однако в 1/3 МКП стабильно наблюдаются биваленты, число которых варьирует. При изучении больших выборок клеток (1000 и более) встречаются единичные МКП даже с семью бивалентами (Ловцюс *и др.*, 2009). Руководствуясь современными представлениями о мейозе можно предположить, что в профазе I растений с такой картиной поведения хромосом в MI должны присутствовать хотя бы короткие участки СК (Богданов, Коломиец, 2007). Однако даже коротких фрагментов СК у мутантов *su9* не было обнаружено, и его цитологический фенотип был классифицирован как полностью асинаптический (Федотова, 1988; Соснихина *и др.*, 1998). Нашей задачей стало согласование картин мейоза в профазе I и метафазе I в МКП мутантов *su9*.

Материал для исследования. Для исследования цитологических картин мейоза у мейотических мутантов *su9* нам были предоставлены семена F₃ от самоопыления растения №321/21 (2004 г.) из Петергофской коллекции мейотических мутаций ржи. Растение №321/21 (+/*su9*) – растение из картирующей популяции F₂ от скрещивания индивидуального гетерозиготного по мутации *su9* растения с растением из автофертильной линии L6. Таким образом, в F₃ мы ожидали наблюдать расщепление в соотношении 1:3 на мутантов *su9* и растения дикого типа. Растения F₃ выращивали в теплице кафедры генетики РГАУ-МСХА с осени 2009 г. по весну 2010 г., растения F₄ – с осени 2010 г. по весну 2011 г. Яровизацию проводили при 5-6°C в ноября-январе (F₃) и декабре-феврале (F₄) в яровизационной камере центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА.

3.2.1. Свето-микроскопический анализ метафазы I

У мейотических мутантов *su9* аномалии в MI проявлялись в наличии большого числа унивалентов. Большинство МКП не содержало бивалентов вовсе (**Рисунок 9, А**). Как видно из **Таблицы 12**, все мутантные растения характеризовались сходным уровнем проявления аномалий, поэтому дальнейшие выводы мы делали по объединённым данным. В среднем число унивалентов для мутантных растений составило $13,21 \pm 0,096$ унивалентов на МКП. Редкие

биваленты встречались лишь в 29% клеток (**Рисунок 9, Б**) Наши результаты хорошо согласуются с результатами опубликованных работ, посвящённых данному мутанту, которые были выполнены на больших выборках МКП. Так в выборке из 1026 МКП единичные биваленты были обнаружены в 347, т.е. в 34% клеток (Ловцюс *и др.*, 2009).

Для более подробного анализа МI мы изучили распределение хиазм в МКП (**Таблица 13**). Как видно из таблицы, более 90% пар гомологов в МКП мутантных растений не имели ни одной хиазмы, т.е. представляли собой униваленты. Лишь 5,2% имели хотя бы одну хиазму. Причём число пар гомологов, объединённых двумя хиазмами, составляет всего 0,5% от общего числа изученных пар гомологов. Так в 272 МКП было обнаружено всего 109 бивалентов, и лишь 9 из них были закрытыми (т.е. с двумя хиазмами). У растений дикого типа процент закрытых бивалентов составил более 80% общего числа пар гомологов. В целом, хиазообразование у мейотического мутанта *sy9* оказалось снижено примерно в 30 раз в сравнении с растениями дикого типа из этой же семьи.

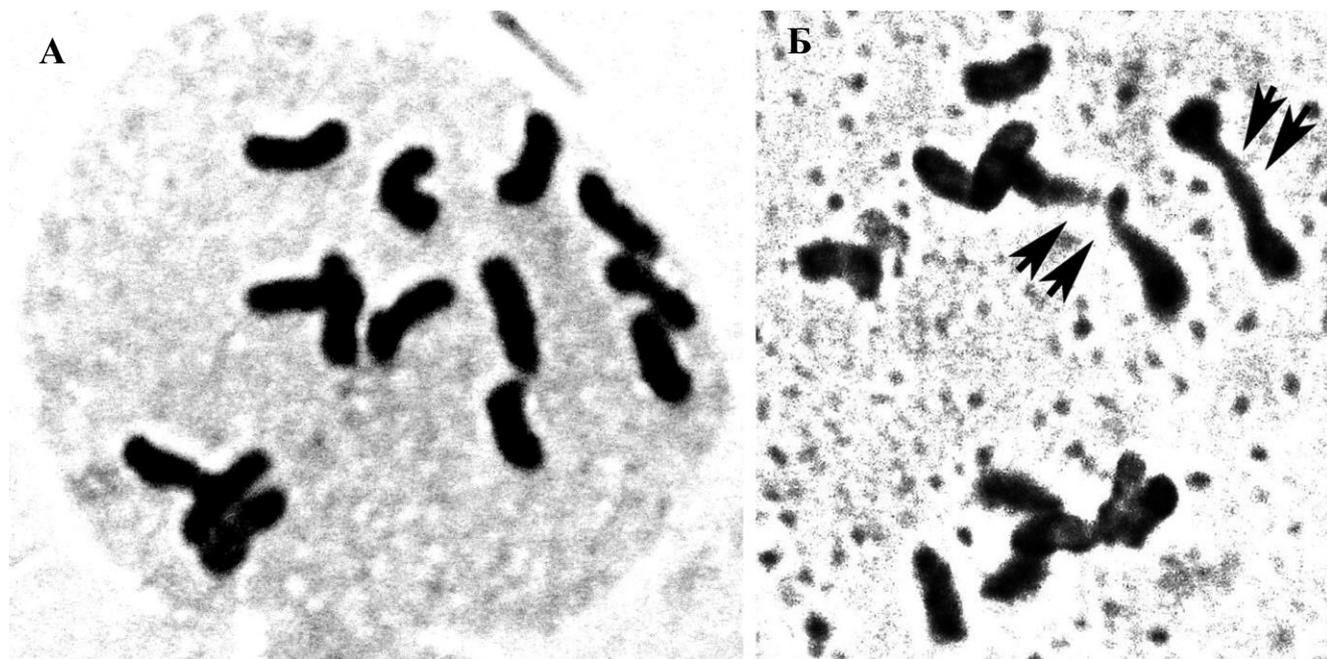


Рисунок 9. Метафаза I у асинаптических мутантов *sy9*: А – 14 унивалентов; Б – 10 унивалентов и 2 открытых бивалента (показаны двойными стрелками).

Таблица 12. Распределение МКП в метафазе I в зависимости от числа унивалентов у растений дикого типа и мутантов *su9*

Номер растения	Кол-во МКП, шт.	Количество МКП с числом унивалентов, шт.								Среднее число унивалентов на МКП, шт.
		0	2	4	6	8	10	12	14	
Растения дикого типа										
№2	25	25								0
№4	25	22	3							0,24
№5	25	20	5							0,4
№6	25	24	1							0,08
№7	25	23	2							0,16
№8	25	25								0
№10	25	14	9	2						0,88
№11	25	24	1							0,08
№12	50	46	4							0,16
№13	25	24	1							0,08
№14	25	24	1							0,08
№15	25	22	3							0,24
№101	25	23	2							0,16
№109	23	19	4							0,3478
№108 ¹	9	9								0
№110 ¹	12	12								0
№123 ¹	8	8								0
№124 ¹	4	4								0
№105 ¹	12	11	1							0,1667
№111 ¹	4	4								0
№132 ¹	4	2	2							1
∑	373	335	36	2						0,20 ± 0,061
%	100	89,8	9,7	0,5						
Мутанты <i>su9</i>										
№1	31						2	10	19	13,1
№3	100						6	18	76	13,4
№9	50				1	2	7	7	33	12,76
№102 ¹	10							3	7	13,4
№121	24						3	4	17	13,17
№129	27						1	7	19	13,33
№136	22						2	5	15	13,18
№130 ¹	7						1	2	4	12,86
№137	18							4	14	13,56
∑	272				1	2	21	55	193	13,21 ± 0,096
%	100				0,4	0,7	7,7	20,2	71,0	

¹ – Данные по этим растениям не учитывались при объединении данных в связи с небольшим количеством МКП в выборке.

Таблица 13. Распределение пар гомологов в метафазе I в зависимости от числа хиазм у растений дикого типа и мутантов *su9*

Номер растения	Кол-во МКП, шт.	Кол-во пар гомологов, шт.	Количество пар гомологов с числом хиазм, шт.			Среднее число хиазм на бивалент, шт.
			0	1	2	
Растения дикого типа						
№2	25	175	0	26	149	1,85
№4	25	175	3	5	167	1,94
№5	25	175	5	7	163	1,90
№6	25	175	1	14	160	1,91
№7	25	175	2	9	164	1,93
№8	25	175	0	32	143	1,82
№10	25	175	11	43	121	1,63
№11	25	175	1	54	120	1,68
№12	50	350	4	64	282	1,79
№13	25	175	1	27	147	1,83
№14	25	175	1	9	165	1,94
№15	25	175	3	53	119	1,66
№101	25	175	2	24	149	1,84
№109	23	161	4	29	128	1,77
№108 ¹	9	63	0	5	58	1,92
№110 ¹	12	84	0	14	70	1,83
№123 ¹	8	56	0	10	46	1,82
№124 ¹	4	28	0	0	28	2,00
№105 ¹	12	84	1	7	76	1,89
№111 ¹	4	28	0	3	25	1,89
№132 ¹	4	28	2	19	7	1,18
∑	373	2611	38	396	2177	1,82 ± 0,028
%		100	1,4	15,2	83,4	
Мутанты <i>su9</i>						
№1	31	217	203	13	1	0,07
№3	100	700	670	26	4	0,05
№9	50	350	317	30	3	0,10
№102 ¹	10	70	67	3	0	0,04
№121	24	168	158	10	0	0,06
№129	27	189	180	8	1	0,05
№130 ¹	7	49	45	4	0	0,08
№136	22	154	145	9	0	0,06
№137	18	126	122	4	0	0,03
∑	272	1904	1795	100	9	0,06 ± 0,008
%		100	94,3	5,2	0,5	

¹ – Данные по этим растениям не учитывались при объединении данных в связи с небольшим количеством МКП в выборке.

Анализ расщепления в потомствах F₃ и F₄ и изучение метафазы I у выщепившихся мутантов показали, что эти мутанты являются типичными асинаптическими мутантами *sy9*, такими же, как в работах Соснихиной и соавторов (Соснихина *et al.* 1998; Соснихина *et al.* 2005). Однако мутация *sy9* характеризуется сложным проявлением и может характеризоваться несколькими цитологическими фенотипами, которые могут быть идентичны цитологическим фенотипам некоторых других синаптических мутантов ржи (**Раздел 3.2.4**). Поэтому, с целью удостовериться, что мы работаем именно с мутантами *sy9*, мы провели молекулярно-генетическое генотипирование с использованием SSR-маркера *Xgwm132*, который сцеплен с геном *Sy9*.

3.2.2. Молекулярно-генетический анализ

Ген *Sy9* был картирован в прицентромерной области длинного плеча хромосомы 2R (Мальшев *и др.*, 2009). На выборке из 120 растений F₂ в этой работе было установлено абсолютное сцепление гена *Sy9* с двумя SSR-маркерами *Xscm43* и *Xgwm132*. На **Рисунке 10** представлена генетическая карта хромосомы 2R, составленная по результатам этого исследования. В нашей работе для анализа наследования мутации *sy9* был выполнен анализ её косегрегации с SSR-маркером *Xgwm132*. В работе С.В. Мальшева с соавторами (2009) показано, что рецессивный (мутантный) аллель гена *Sy9* сцеплен с аллелем SSR-локуса *Xgwm132* длиной 121 п.н., а доминантный – с аллелем длиной 111 п.н. Результаты нашего анализа представлен в **Таблицах 15 и 16** и на **Рисунке 11**.

Все три мутантные растения в поколении F₃, выявленные в результате нашего цитологического анализа, оказались сцеплены с аллелем SSR-локуса *Xgwm132* длиной 121 п.н. (**Таблица 15**). Результаты, полученные с помощью световой микроскопии и молекулярного анализа, полностью совпали. Кроме того, с помощью SSR-маркера мы установили, что все растения дикого типа (имеющие доминантный аллель *Sy9*) являются гетерозиготами. В следующем поколении от их самоопыления можно было ожидать выщепление рецессивных гомозигот *sy9/sy9*. В исследованной семье мы не обнаружили гомозигот по доминантному аллелю *Sy9*, что, очевидно, связано с небольшим количеством растений в выборке.

Для дальнейшей работы с мутацией в поколении F₄ мы вырастили потомство растения №2 (+/*sy9*). На выборке из 30 растений F₄ мы наблюдали расщепление уже на все три генотипических класса: гомозиготы по аллелю дикого типа +/+ (5 растений), гомозиготы по мутантному аллелю *sy9/sy9* (10 растений) и гетерозиготы +/*sy9* (15 растений). Мейотический фенотип нами был определён для 16 растений. Данные цитологического анализа и генотипирования с использованием SSR-маркера *Xgwm132*, как и ожидалось, полностью

совпали (**Таблица 16**). Наблюдающееся в данном потомстве расщепление по мутации *sy9* (которое было приравнено к расщеплению по сцепленному с ней локусу *Xgwm132*) соответствовало расщеплению 1:2:1 ($\chi^2_{1:2:1} = 1,67$, $P = 0,434$). Если огрубить расчёты и объединить выборки растений из F_3 и F_4 , то расщепление также будет соответствовать ожидаемому, но с меньшей вероятностью ($\chi^2_{1:2:1} = 4,64$, $P = 0,098$). Сводные данные по анализу расщепления представлены в **Таблице 14**.

Несмотря на отсутствие статистически достоверных отличий от теоретически ожидаемых частот, в обоих потомствах прослеживается дисбаланс в численностях классов гомозигот: наблюдается “недобор” гомозигот по аллелю дикого типа в пользу численности гомозигот по мутантному аллелю. В работе С.В. Малышева и соавторов (2009), в которой описана работа с картирующей популяцией F_2 , также отмечен дисбаланс в распределении долей гомозигот при сохранении доли гетерозигот равной 0,5, но в обратную сторону. Авторы предположили, что в изучаемом районе хромосомы 2R может присутствовать селективный фактор, который ведёт к гаметофитной селекции (Малышев *и др.*, 2009). Возможно, при переходе от поколения F_2 к F_3 (или от F_3 к F_4) произошла рекомбинация между локусом селективного фактора и геном *Sy9*, и, таким образом, рецессивный (мутантный) аллель мей-гена стал сцеплен с «выигрышным» аллелем селективного фактора. В результате чего мы регистрировали дисбаланс в пользу рецессивных гомозигот, а не в пользу доминантных гомозигот как это наблюдалось С.В. Малышевым и соавторами.

Таблица 14. Анализ расщепления в F_3 и F_4 по мейотической мутации *sy9*

Поколение	Общее количество растений	Количество гомозигот +/+	Количество гетерозигот +/- <i>sy9</i>	Количество гомозигот <i>sy9/sy9</i>	$\chi^2_{1:2:1}$	P
F_3	15	0	12	3	-	-
F_4	30	5	15	10	1.67	0.434
Σ	45	5	27	13	4.64	0.098

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

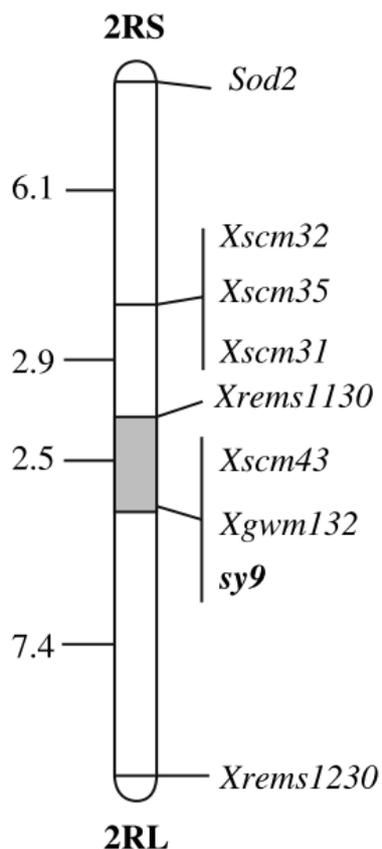


Рисунок 10. Генетическая карта хромосомы 2R, показывающая расположение мейотической мутации *sy9* относительно молекулярных маркеров. Серым цветом выделена область центromеры (Малышев и др., 2009).

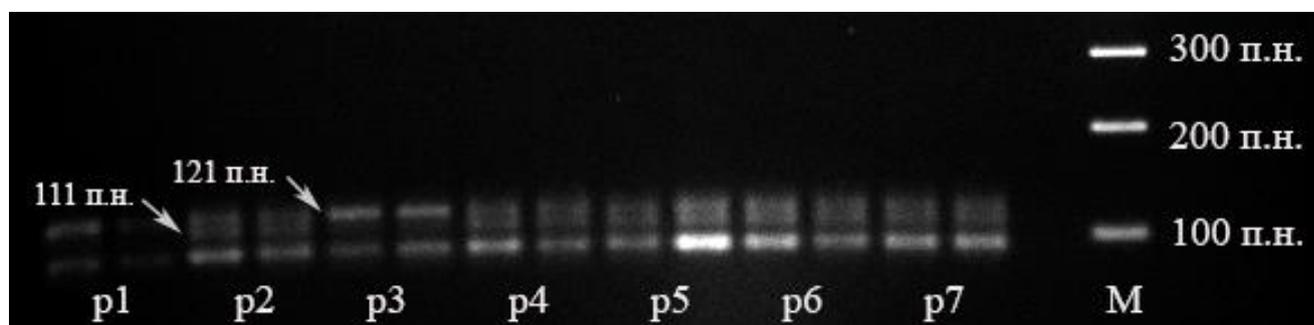


Рисунок 11. Фрагмент электрофореграммы продуктов амплификации SSR-маркера *Xgwm132* на растениях из потомства растения №321/21 (+/*sy9*). Растения №1 и №3 – рецессивные гомозиготы (*sy9/sy9*). Остальные пять растений – гетерозиготы (+/*sy9*).

Таблица 15. Результаты генотипирования растений F₃ (потомство растения №321/21) с использованием SSR-маркера *Xgwm132* и завязываемость зерновок от самоопыления у тех же растений

Номер растения	Мейотический фенотип	Длина аллеля(ей) SSR-локуса <i>Xgwm132</i>	Генотип	Завязываемость зерновок от самоопыления	
				Количество колосьев, шт.	% завязываемости
№1	мутант	121 п.н.	<i>sy9/sy9</i>	4	0
№2	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	<i>+sy9</i>	3	66,3
№3	мутант	121 п.н.	<i>sy9/sy9</i>	6	0
№4	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	<i>+sy9</i>	5	32,8
№5	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	<i>+sy9</i>	1	25
№6	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	<i>+sy9</i>	4	21,4
№7	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	<i>+sy9</i>	3	45,4
№8	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	<i>+sy9</i>	нет данных	
№9	мутант	121 п.н.	<i>sy9/sy9</i>	3	0
№10	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	<i>+sy9</i>	нет данных	
№11	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	<i>+sy9</i>	3	49,4
№12	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	<i>+sy9</i>	1	34,1
№13	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	<i>+sy9</i>	10	42,0
№14	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	<i>+sy9</i>	1	41,1
№15	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	<i>+sy9</i>	2	42,3

Таблица 16. Результаты генотипирования растений F₄ (потомство растения №2) с использованием SSR-маркера *Xgwm132*

Номер растения	Мейотический фенотип	Длина аллеля(ей) SSR-локуса <i>Xgwm132</i>	Генотип
№101	дикий тип	111 п.н.	+/+
№102	мутант	121 п.н.	sy9/sy9
№103	–	111 п.н.	+/+
№104	–	121 п.н. + 111 п.н.	+/ <i>sy9</i>
№105	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	+/ <i>sy9</i>
№107	–	121 п.н. + 111 п.н.	+/ <i>sy9</i>
№108	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	+/ <i>sy9</i>
№109	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	+/ <i>sy9</i>
№110	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	+/ <i>sy9</i>
№111	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	+/ <i>sy9</i>
№112	–	121 п.н.	sy9/sy9
№113	–	111 п.н.	+/+
№114	–	121 п.н. + 111 п.н.	+/ <i>sy9</i>
№115	–	121 п.н.	sy9/sy9
№116	–	121 п.н.	sy9/sy9
№119	–	121 п.н. + 111 п.н.	+/ <i>sy9</i>
№121	мутант	121 п.н.	sy9/sy9
№122	–	111 п.н.	+/+
№123	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	+/ <i>sy9</i>
№124	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	+/ <i>sy9</i>
№126	–	121 п.н.	sy9/sy9
№127	–	121 п.н. + 111 п.н.	+/ <i>sy9</i>
№129	мутант	121 п.н.	sy9/sy9
№130	мутант	121 п.н.	sy9/sy9
№131	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	+/ <i>sy9</i>
№135	–	121 п.н. + 111 п.н.	+/ <i>sy9</i>
№136	мутант	121 п.н.	sy9/sy9
№137	мутант	121 п.н.	sy9/sy9
№138	–	111 п.н.	+/+
№139	дикий тип	121 п.н. + 111 п.н.	+/ <i>sy9</i>

3.2.3. Анализ профазы I

Мы изучили профазу I у трёх мейотических мутантов *sy9* – растений №1, №3 и №9 – и двух растений яровой ржи сорта Селенга (нормальный мейоз, контроль).

Наше исследование мы начали с применения метода иммуоцитохимии. Использованные нами антитела выявляли ржаной ортолог белка AtASY1, который у арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* и капусты *Brassica oleracea* ассоциирован с латеральными элементами СК (Caryl *et al.*, 2000; Armstrong *et al.*, 2002). Правомерность использования антител к белку AtASY1 для маркирования ЛЭ у ржи была показана в работах Е.И. Михайловой и соавторов (Mikhailova *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2008; Михайлова *и др.*, 2010).

Мы установили, что у растений ржи дикого типа сигналы ASY1 появлялись в ранней лептотене в виде многочисленных фокусов, рассредоточенных по ядру мейоцита. Далее, по мере развития стадии лептотены, сигналы ASY1 приобретали линейный вид и, с этого момента, начинали совпадать с цитологической картиной ОЭ/ЛЭ, контрастированных нитратом серебра, которую мы наблюдали при электронно-микроскопическом исследовании.

Сигнал ASY1 в МКП мутантов *sy9* оказался слабым, образованные им оси были тусклыми и тоньше, чем ОЭ в МКП растений дикого типа на аналогичных стадиях. В 50,6% МКП мутантов ($n = 85$) наблюдалась незавершённая загрузка ASY1 на хромосомные оси: диффузное распределение сигнала по МКП, пунктирная загрузка ASY1 на хромосомные оси, фрагментированные оси (**Рисунок 12**). В оставшихся 49,4% МКП нам удалось проследить сформированные оси. Такие МКП были взяты для дальнейшего изучения профазы I у мутантов (**Рисунок 13**). Стоит отметить, что даже в таких клетках прослеживалась нехватка ASY1: сигнал был слабым, быстро “выгорал” под флуоресцентной лампой, съёмку изображений приходилось осуществлять при большей экспозиции, чем съёмку МКП растений дикого типа на аналогичных стадиях. Таким образом, нами отмечена особенность мутантов *sy9* – дефицит ASY1 на мейотических осях хромосом.

За исключением слабого сигнала ASY1 в МКП стадия лептотены у мутантов *sy9* не отличалась от стадии лептотены у растений дикого типа с нормальным мейозом.

Подробно проанализировав цитологическую картину мейоза у мутантов *sy9* на стадии аналогичной зиготене-пахитене, мы выявили укорочение и утолщение ОЭ по сравнению с ОЭ в лептотенных МКП. Это соответствует изменениям при переходе от лептотены к зиготене, и далее к пахитене, при нормальном мейозе у ржи и других организмов. В отличие от МКП растений дикого типа, у которых, начиная со стадии ранней зиготены, начинается спаривание хромосом в многочисленных сайтах по всей длине пар гомологов (спаривание начинается преимущественно в теломерных регионах) (Gillies, 1985), у мутантов *sy9* выявлялись лишь немногочисленные и относительно короткие участки спаренных хромосом (**Рисунок 14**,

Таблица 17). В среднем нами было обнаружено $2,1 \pm 0,27$ подобных спаренных участков на МКП ($n = 14$; $\min = 0$, $\max = 5$). Средняя длина спаренных участков составила $4,7 \pm 0,30$ мкм ($n = 30$; $\min = 2,7$; $\max = 8,8$). Таким образом, в МКП мутантов *sy9* на стадии аналогичной зиготене-пахитене происходило редкое, но регулярное, спаривание хромосомных осей.

Процесс взаимодействия гомологичных хромосом принято разделять на четыре этапа: поиск гомологии, пресинаптическое выравнивание, спаривание и синапсис, т.е. сборка СК (Loidl, 1990). Руководствуясь результатами иммуноцитохимического исследования, полученными с помощью двухмерной флуоресцентной микроскопии, мы можем достоверно анализировать только первые три этапа. С целью изучения завершающего этапа спаривания хромосом – синапсиса – мы провели электронно-микроскопическое исследование.

При окрашивании профазных МКП нитратом серебра и изучении их на трансмиссионном электронном микроскопе, так же как и при анализе распределения ASY1, у мутантов *sy9* выявлялись дефекты в строении осей мейотических хромосом. ОЭ контрастировались плохо, часто наблюдались протяжённые непрокрашенные участки, бреши. В 59,1% МКП на стадиях от лептотены до диплотены ($n = 22$) выявлялись те или иные дефекты в строении ОЭ (тонкие оси, бреши, фрагментация ОЭ). В оставшихся 40,9% МКП присутствовали сформированные ОЭ.

При подробном изучении характера расположения ОЭ в таких МКП мы обнаружили спаренные участки, которые по строению и картине поведения ОЭ/ЛЭ соответствуют СК (**Рисунок 15, Таблица 18**).

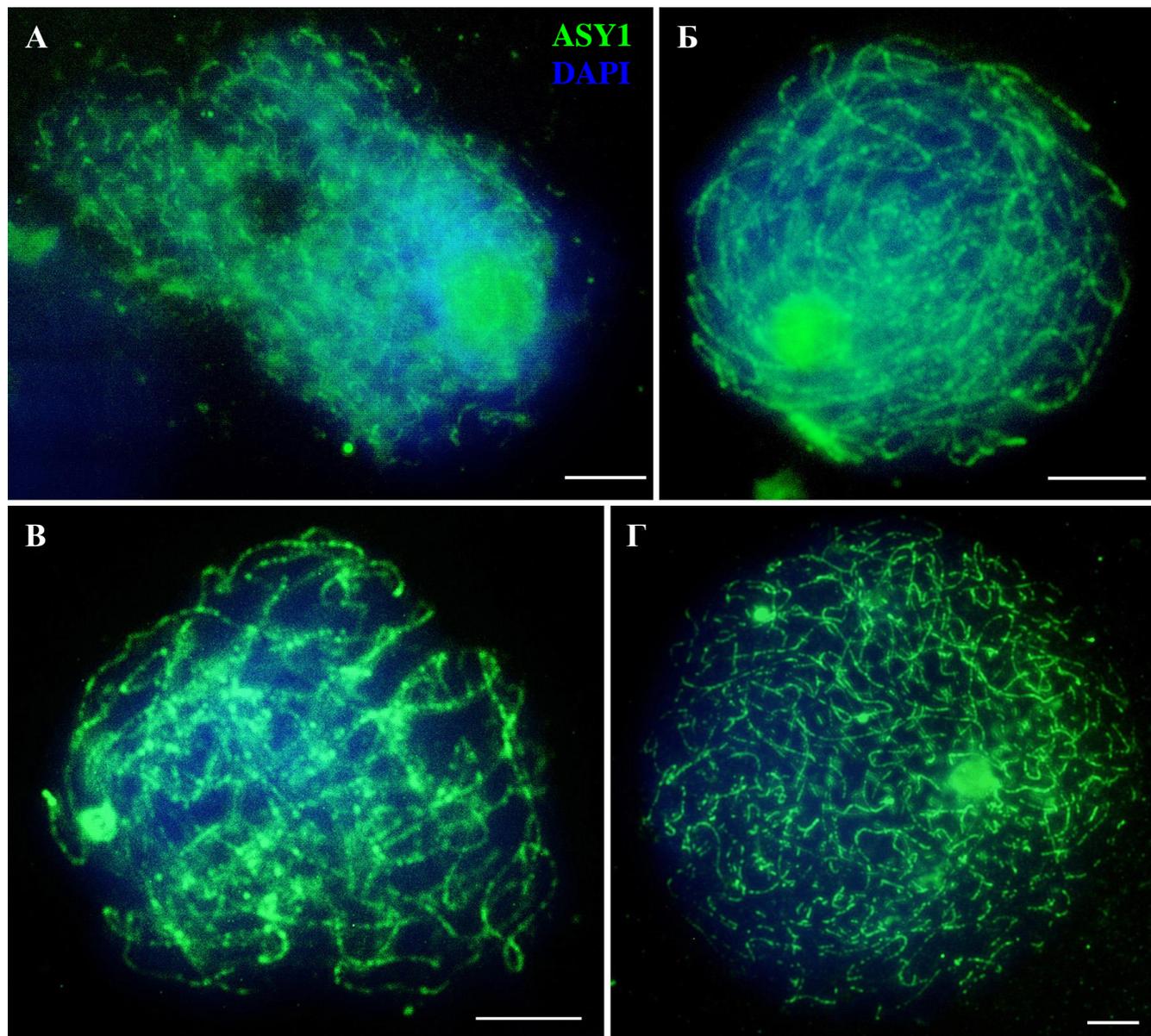


Рисунок 12. Иммунофлуоресцентное выявление белка ASY1 (зелёный) в распластанных ядрах мейоцитов асинаптических мутантов *зу9* в профазе I. Незавершённая загрузка ASY1 на хромосомные оси: **А** – диффузное распределение сигнала по мейоциту и фрагментация хромосомных осей, **Б, В** – пунктирная загрузка на хромосомные оси, **Г** – фрагментация осевых элементов хромосом. Хроматин окрашен DAPI (синий). Масштабные отрезки – 5 мкм.

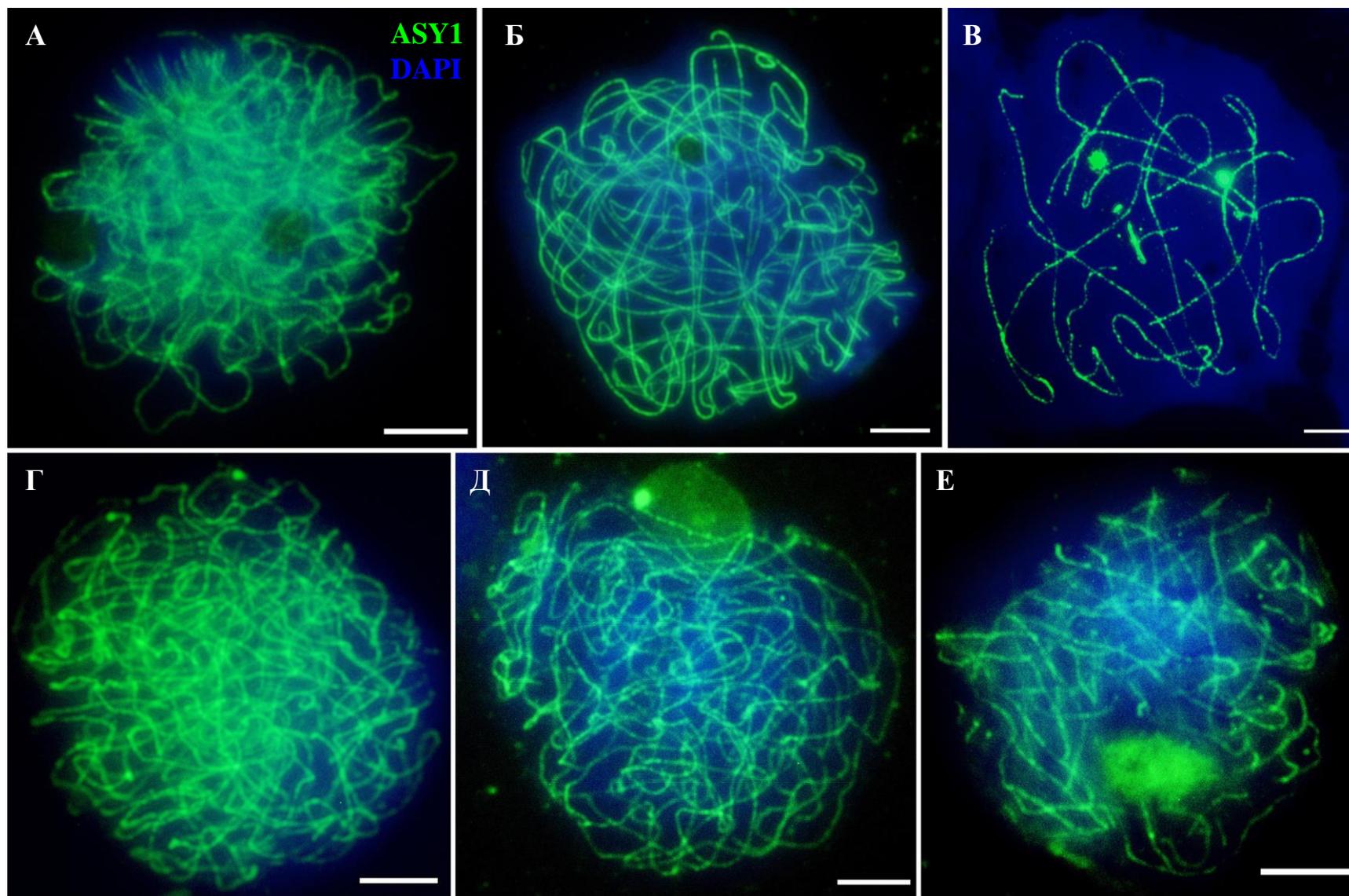


Рисунок 13. Иммунофлуоресцентное выявление белка ASY1 (зелёный) в распластанных ядрах мейоцитов растений дикого типа (А - В) на стадиях лептотены (А), зиготены (Б) и пахитены (В) и асиноптических мутантов *su9* (Г - Е) на стадиях аналогичных лептотене (Г) и зиготене-пахитене (Д, Е). Хроматин окрашен DAPI (синий). Масштабные отрезки – 5 мкм.

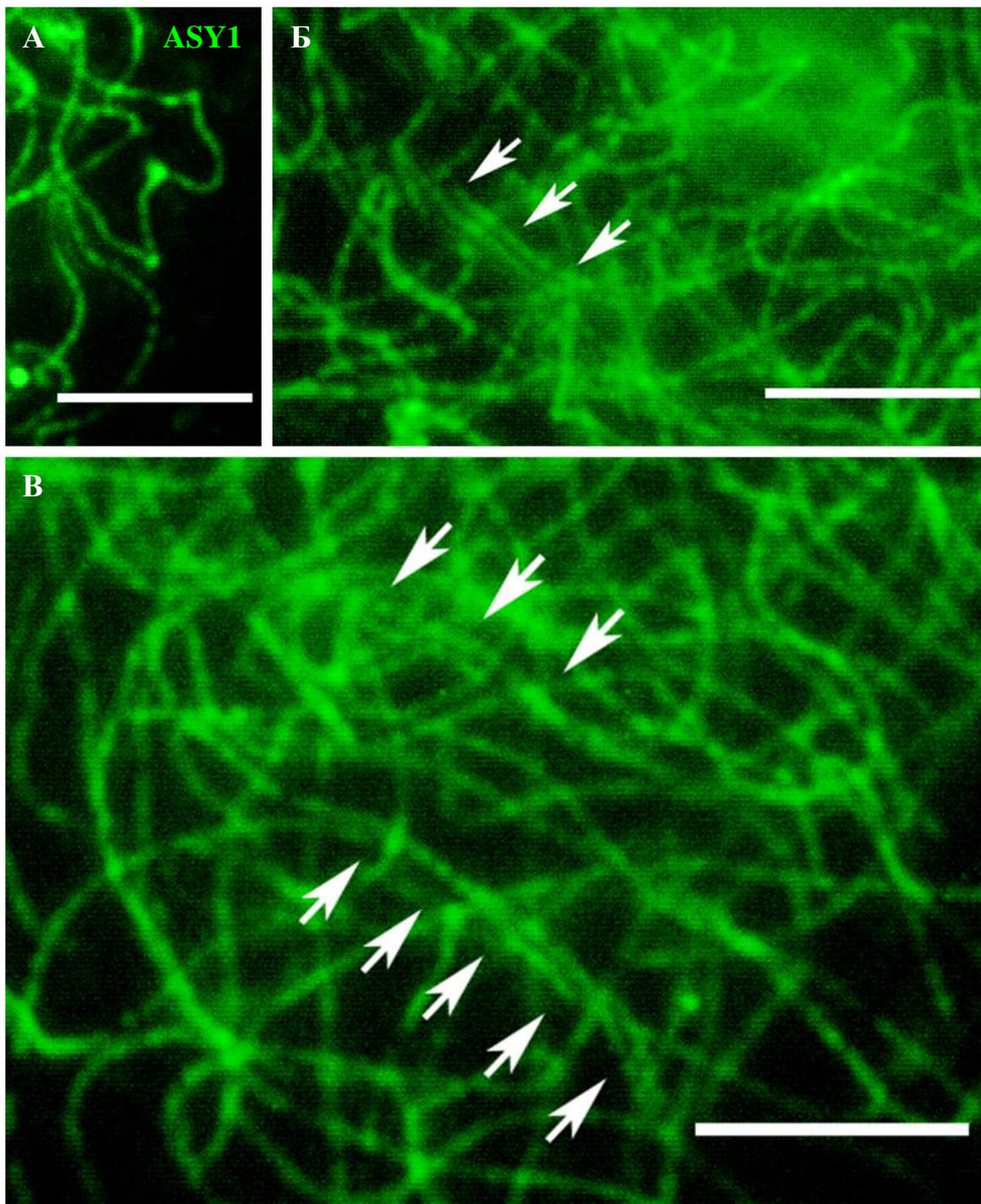


Рисунок 14. Иммунофлуоресцентное выявление белка ASY1 (зелёный) в распластанных ядрах мейоцитов асинаптических мутантов *sy9* на стадии, аналогичной зиготене-пахитене при нормальном мейозе: **А** – пресинаптическое выравнивание осевых элементов хромосом; **Б, Б'** – спаренные участки осевых элементов хромосом (показаны стрелками). Масштабные отрезки – 5 мкм.

Таблица 17. Анализ спаренных участков ОЭ, выявленных с помощью антител к AtASY1, у мутантов *su9* на стадии, аналогичной зиготене-пахитене при нормальном мейозе

Условный номер МКП	Количество спаренных участков, шт.	Длина спаренных участков, мкм
№1	1	6,3
№2	2	2,7; 3,4
№3	2	3,4; 2,9
№4	3	5,9; 7,4; 4,1
№5	5	7,2; 5,6; 4,6; 4,3; 4
№6	1	4,7
№7	3	7,2; 8,8; 5,3
№8	2	3,6; 3,8
№9	2	6,3; 3,4
№10	2	5,7; 5,7
№11	2	2,9; 2,8
№12	2	3,4; 3,8
№13	1	5,9
№14	2	3,4; 3,3
	Среднее кол-во спаренных участков на МКП: 2,1 ± 0,27	Средняя длина одного спаренного участка: 4,7 ± 0,30

Таблица 18. Анализ фрагментов СК у мутантов *su9*, выявленных с помощью электронно-микроскопического исследования

Условный номер МКП	Стадия	Количество фрагментов СК, шт.
№1	Лептотена-зиготена	0
№2	Лептотена-зиготена	1
Среднее кол-во фрагментов СК в лептотене-зиготене		0,5
№3	Зиготена-пахитена	1
№4	Зиготена-пахитена	2
№5	Зиготена-пахитена	0
№6	Зиготена-пахитена	0
№7	Зиготена-пахитена	1
Среднее кол-во фрагментов СК в зиготене-пахитене		0,8 ± 0,37
№8	Диплотена	2
№9	Диплотена	0
Среднее кол-во фрагментов СК в диплотене		1

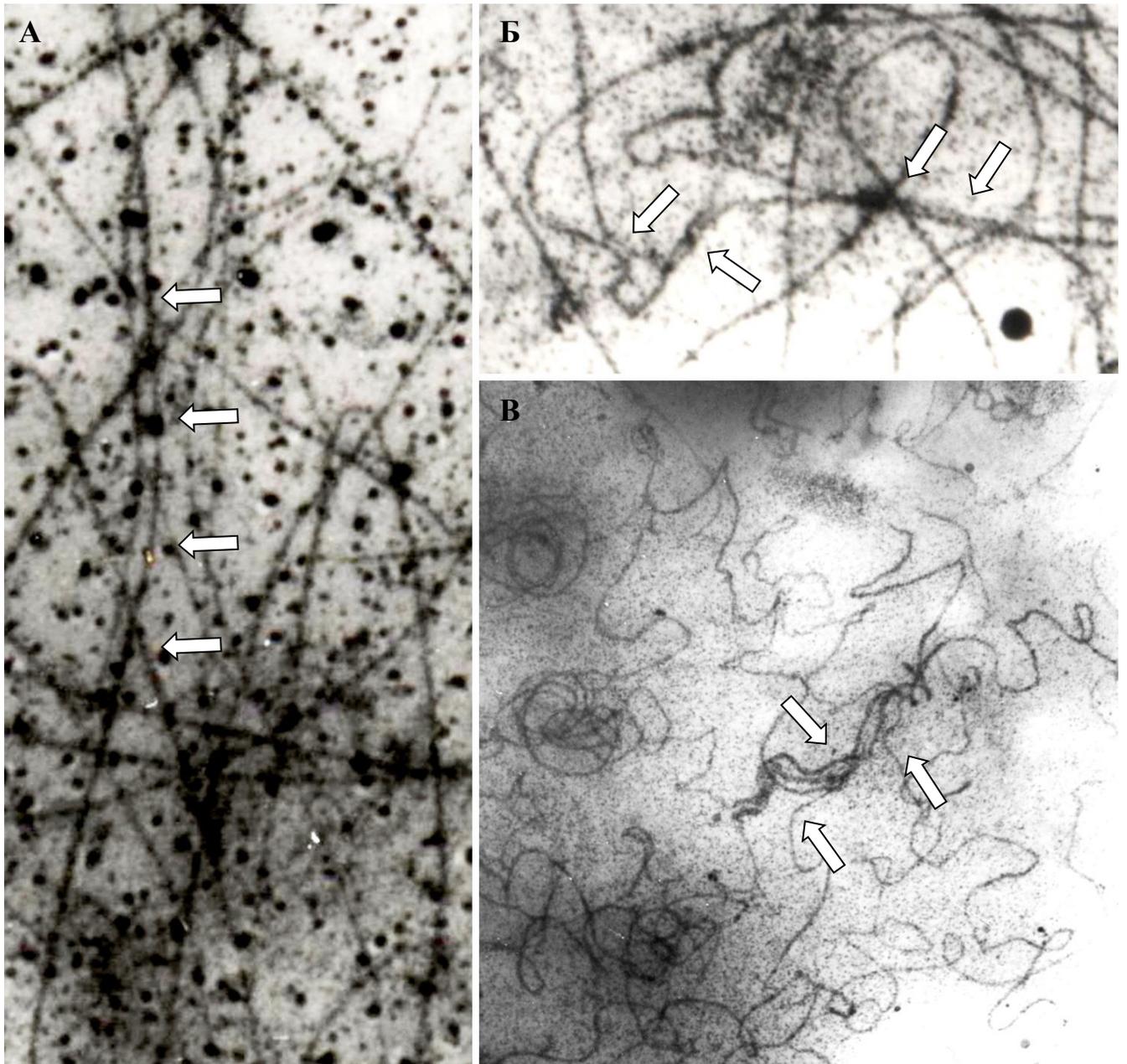


Рисунок 15. Фрагменты электронно-микроскопических фотографий распластанных ядер мейоцитов асинаптических мутантов *su9* на стадиях аналогичных лептотене-зиготене (А), зиготене-пахитене (Б) и диплотене (В). Стрелками отмечены фрагменты синаптонемных комплексов.

3.2.4. Обсуждение

Нами исследовано проявление моногенной рецессивной мутации *sy9*, которая вызывает полную мужскую и женскую стерильность у растений ржи (в отличие, к примеру, от полустерильной мутации *sy11*, результаты анализа которой описаны в Разделе 3.1).

Очевидный дефект мутации *sy9* – наличие высокого числа униввалентов в метафазе I. В оригинальной статье, посвящённой данной мутации (Соснихина *и др.*, 1998) авторами было выделено две группы мутантных растений согласно спектрам распределения униввалентов по МКП. К первой группе были отнесены мутантные растения со средним числом униввалентов на МКП от 3,5 до 10,7. У таких растений 8,7 – 49,0% МКП содержали только унивваленты (14 униввалентов), в остальных МКП наблюдалось от 0 до 12 униввалентов. Ко второй группе были отнесены растения со средним числом униввалентов на МКП от 10,8 до 14. У таких мутантов в 74,1-98,5% МКП наблюдались только унивваленты, в оставшихся МКП обнаруживались 1-3 бивалента (т.е. 8-12 униввалентов).

Все девять изученных нами мутантных растений – как в F₃, так и в F₄ – имели 60-77% МКП с 14 униввалентами, а среднее число униввалентов на МКП для них составило от 12,76 до 13,56. Очевидно, что по классификации Соснихиной и соавторов (1998) все изученные в нашей работе растения следует отнести ко второй группе мутантов *sy9*. Такая классификация является в достаточной мере условной с цитологической точки зрения, т.к. даже внутри групп наблюдаются достоверные различия между растениями по характеру спаривания хромосом в метафазе I. Задача данной классификации описать важную генетическую особенность мутации *sy9* – различную степень проявления мутации (силу мутации) не только между различными МКП одного растения, что свойственно всем синаптическим мутациям ржи *и других* растений, но и между различными мутантными растениями.

Многочисленные исследования характера наследования в различных потомствах растений (инбредная линия *Mc9*, различные гибридные поколения от скрещивания с маркерными линиями и линиями с другими мутациями) показали, что мутация *sy9* определяется рецессивным аллелем одного гена (Соснихина *и др.*, 1998; Ловцюс *и др.*, 2009; Малышев *и др.*, 2009). Однако проявление мутации отличается у различных гомозигот *sy9/sy9*, что и отражается в упомянутой выше группировке мутантных растений по силе регистрируемых в MI нарушений. Важно отметить две особенности наследования принадлежности мутантных растений к разным группам.

1. В потомстве одного гетерозиготного растения *+/sy9* могут выщепляться рецессивные гомозиготы *sy9sy9*, которые принадлежат к различным группам мутантов (Соснихина *и др.*, 1998).

2. Принадлежность мутантных растений к той или иной группе наследуется. Так, например, все изученные нами мутантные растения, которые принадлежали к последовательным поколениям F₃ и F₄ (самоопыление) от скрещивания гетерозиготного по *su9* растения (№321/21, 2004 г.) с маркерной линии (без мейотических мутаций), принадлежали не только к одной и той же второй группе, но и также имели идентичную картину поведения хромосом в МІ вплоть до нюансов (**Таблицы 12 и 13**). Мутанты *su9*, для которых Е.И. Михайлова и соавторы проводили иммуноцитохимические эксперименты (Ловцюс *и др.*, 2009; Михайлова *и др.*, 2010) имели крайнюю выраженность мутации – 14 унивалентов во всех клетках (Е.И. Михайлова, личное сообщение). Такой цитологический фенотип, как и в нашем случае, оказался наследуемым. С помощью отбора и скрещиваний его удалось перенести на яровой фон (Михайлова, 2011).

Эти факты дают нам основания предполагать наличие одного или нескольких генов (генов-модификаторов), которые не влияют на моногенный характер расщепления 3:1, но оказывают влияние на выраженность (силу) мутации в индивидуальных растениях. Изучение характера наследования подобных генов и их эффекта является довольно сложной задачей и на данный момент исследование генов, оказывающих влияние на проявление мутации *su9*, не увенчалось успехом.

Следует упомянуть об особенности расположения унивалентов в МКП у мутантов *su9*. У мутантных растений 2-й группы 53,8% унивалентов располагаются на полюсах клетки, остальные – в центре мейоцита или оказываются разбросанными по МКП (Соснихина *и др.*, 1998). Характер поляризации унивалентов у мутантов *su9* в тех МКП, в которых наблюдаются только униваленты, достоверно отличается от случайного биномиального из-за более высокой, чем ожидается, частоты классов с поляризацией унивалентов типа 2/12, 1/13, 0/14. Такой же характер поляризации унивалентов характерен и для асинаптических мутантов *su1*. Более высокая частота клеток с крайними типами поляризации вместе с высокой частотой клеток (46,2%) с разбросанными хромосомами или оставшимися в центре, по мнению авторов, может указывать на повреждение веретена деления (Соснихина *и др.*, 1998). Непосредственного изучения веретена деления у синаптических мутантов ржи не проводилось. Данное предположение ждёт подтверждения, или опровержения, в будущих исследованиях.

На поздних стадиях мейоза (после МІ) у мутантов *su9* регистрируется широкий спектр типичных для синаптических мутантов нарушений, которые, как принято считать, являются следствием нарушений в МІ. В результате мейоза у мутантов *su9* формируются аномальные тетрады с большим числом микроядер, встречаются полиады. Пыльца полностью стерильна. Семена на мутантных растениях, независимо от их группы, не завязываются ни при самоопылении, ни при свободном цветении (Соснихина *и др.*, 1998). В нашей работе семена на

мутантных растениях ($n = 9$) не завязывались ни при изолировании колосьев (**Таблица 15**), ни в условиях переопыления с растениями дикого типа с фертильной пылью. Эти наблюдения говорят о том, что мутация *su9* вызывает полную мужскую и женскую стерильность.

Наша работа была сфокусирована на изучении профазы I у мутантов *su9*. С помощью иммунофлуоресцентного выявления ржаного ортолога белка AtASY1 и электронно-микроскопического анализа профазных МКП мы установили две важные особенности цитологического фенотипа мутантов *su9*.

1. Мутанты характеризуются дефектными мейотическими осями хромосом, что выявляется как при электронно-микроскопическом анализе ОЭ, контрастированных азотнокислым серебром, так и при иммуноцитохимическом изучении распределения ортолога белка AtASY1 – на хромосомных осях наблюдается его дефицит.

2. В профазе I у мутантов *su9* регистрируются единичные, но регулярные, события спаривания хромосом и синапсиса.

Ранее, Е.И. Михайловой и соавторами (Ловцюс *и др.*, 2009) также был применён иммуноцитохимический подход для изучения распределения ASY1 в профазе I у мутантов *su9*. Было выявлено, что у мутантов отсутствует сигнал ASY1 в 90% МКП. В остальных мейоцитах сигнал выявлялся в виде дискретных фокусов. В зиготене наблюдались отдельные фокусы, а в пахитене – короткие отрезки, при этом в ядрышке наблюдалось диффузное свечение (Ловцюс *и др.*, 2009). В этом исследовании Е.И. Михайлова и соавторы проводили анализ на мутантных растениях *su9*, для которых было характерно наличие в метафазе I только унивалентов. По классификации Соснихиной и соавторов (1998) такие растения также как и растения, изученные в нашей работе, следует отнести ко второй группе. Однако такие растения со средним числом унивалентов на МКП 13,9-14,0 занимают крайнее положение во второй группе, неотличимы по картине поведения хромосом в МI от самого сильного мутанта ржи *su1* и достоверно отличаются по показателям МI от растений, изученных в нашей работе. В связи с этим, как минимум в рамках обсуждения результатов нашей работы, имеет смысл разделить вторую группу мутантов *su9* на две подгруппы. Условно обозначим их как группы 2А и 2Б. В группу 2А мы отнесём растения, которые имеют в среднем от 10,8 до 13,8 унивалентов на МКП в МI, в т.ч. растения, изученные в нашей работе; в группу 2Б – растения со средним числом унивалентов на МКП равным 13,9-14,0, в т.ч. мутанты *su9*, изученные Е.И. Михайловой и соавторами. Таким образом, по силе регистрируемых в МI нарушений мы выделяем три группы мутантных растений *su9*: группа 1 (слабое проявление мутации), группа 2А (умеренно сильное проявление мутации) и группа 2Б (максимальное проявление мутации).

Анализ распределения ржаного ортолога белка AtASY1, таким образом, был проведён для групп 2А и 2Б мутантных растений *su9*. В обеих группах мутантных растений наблюдается

нарушение загрузки *ASY1*. Но сила дефектов по группам отличается. В группе 2А мутантных растений примерно в половине МКП наблюдается нарушенная либо незавершённая загрузка *ASY1* на оси хромосом, но в половине МКП удаётся проследить сформированные оси, которые, однако, также испытывают дефицит *ASY1* по сравнению с растениями дикого типа. В группе 2Б мутантов *su9* вовсе не обнаруживаются МКП со сформированными осями *ASY1*. В таких МКП наблюдаются либо отдельные фокусы, либо короткие фрагменты осей. Таким образом, имеет место прямая зависимость между силой дефектов в загрузке *ASY1* на хромосомные оси в профазе I и снижением уровня регистрируемого в диакинезе-метафазе I хиазмообразования.

Второй важный вывод нашей работы состоит в том, что при подробном изучении поведения осей мейотических хромосом в профазе I у мутантов *su9* мы обнаружили короткие участки спаренных ОЭ и фрагменты сформированных СК.

Ранее, в результате электронно-микроскопического исследования профазы I у мутантов *su9*, Ю.С. Федотова и соавторы (Федотова, 1988; Соснихина *и др.*, 1998) зарегистрировали полный асинопсис хромосом. При изучении единичных профазных ядер не было выявлено участков синапсиса хромосом и следов сформированных СК. Такой профазный цитологический фенотип не соответствовал картине поведения хромосом в MI, в которой стабильно наблюдается небольшое количество бивалентов примерно в 1/3 клеток. Биваленты образуются в результате процессов рекомбинации и последующего хиазмообразования, для протекания которых у всех изученных высших эукариот необходим СК (Богданов, Коломиец, 2007). Поэтому мы предположили, что при дальнейшем изучении профазных МКП мутантов *su9* в них будут обнаружены, как минимум, короткие фрагменты СК.

Можно было предположить и альтернативную гипотезу: редкие хиазмы образуются у мутантов *su9* без участия СК. Установление такого факта можно было бы считать необычным. Мы не нашли в литературе свидетельств наличия механизмов, обеспечивающих образование хиазм вне пространства СК у высших эукариот. Однако полностью исключать возможность наличия подобных механизмов у покрытосеменных растений нельзя в виду достаточного разнообразия стратегий мейоза у эукариот, и наличия генов (систем генов) в геномах высших эукариот, обеспечивавших эволюционно древние способы редукции числа хромосом (Богданов, Коломиец, 2007).

Решение сложившегося противоречия было главной задачей нашего исследования мутантов *su9*. Обнаружив фрагменты СК в профазных МКП мутантов, мы смогли его разрешить. На стадии, аналогичной зиготене-пахитене при нормальном мейозе, у мутантов *su9* нами было зарегистрировано в среднем $2,1 \pm 0,27$ участков спаренных ОЭ и $0,8 \pm 0,37$ фрагментов СК. В метафазе I нами было обнаружено $0,4 \pm 0,06$ хиазм на МКП. На основании этих наблюдений можно сделать следующие заключения.

1. У мутантов *sy9* число сайтов спаривания достоверно ниже числа обнаруживаемых фрагментов СК: двухсторонний t-тест для выборок с различными дисперсиями: $t = 2,89$; $t_{0,05} = 2,26$; $P(t \leq t_{0,05}) = 0,018$. Из этого можно заключить, что не во всех спаренных участках ОЭ в итоге происходит формирование СК. В свою очередь это говорит о том, что у мутантов *sy9* существенно снижена способность как к спариванию хромосом, так и к образованию СК в уже спаренных участках осей хромосом.

2. Хотя мы обнаруживали фрагменты СК в профазных МКП в два раза чаще, чем хиазмы в метафазных МКП, различие между средним числом фрагментов СК и средним числом хиазм на МКП не является достоверным. Возможно, при увеличении выборки профазных МКП это различие станет достоверным и можно будет заключить, что не все фрагменты СК становятся сайтами для протекания процессов рекомбинации у мутантов *sy9* (что соответствует нашим субъективным наблюдениям). Однако на данный момент мы можем сделать лишь вывод о том, что количество фрагментов СК примерно соответствует количеству регистрируемых в МІ хиазм. В любом случае, наш вывод разрешает противоречие, которое сложилось на момент начала нашего исследования. Редкие хиазмы у мутантов *sy9* образуются, очевидно, благодаря наличию коротких фрагментов СК, на цитологической и молекулярной основе которых и происходят редкие события рекомбинации и хиазмообразования, а не благодаря какому-либо экстраординарному механизму мейоза, который обеспечивал бы образование хиазм вне пространства СК.

В заключение главы перечислим все известные на данный момент дефекты, вызываемые мутацией *sy9*: дефицит ASY1 на мейотических осях хромосом, нарушение процессов спаривания гомологов, нарушение формирования СК, наличие унивалентов в МІ и широкий спектр нарушений на последующих стадиях и, наконец, полная мужская и женская стерильность растений.

Самый ранний выявляемый эффект мутации – дефицит ASY1 – не может быть единственной причиной наличия унивалентов в МІ, т.к. в группе 2А мутантов обнаруживаются МКП, в которых оси хромосом сформированы, но их спаривание происходит лишь в отдельных регионах, не во всех из которых, кроме того, в последствии происходит формирование СК. Т.е. нарушена и загрузка ASY1, и сами по себе процессы спаривания гомологов и процесс построения СК между ними. В свою очередь, наличие унивалентов в МІ и, как следствие, нарушения в I и II делениях мейоза не могут в полной мере объяснить стерильность растений, т.к. даже мутанты 1 группы, у которых наблюдается сравнительно невысокий уровень нарушений, обладают полной мужской и женской стерильностью (при таком же уровне цитологических нарушений другие мутанты способны завязывать семена – например, мутанты *sy3* и *sy11*). Можно говорить о том, что мутация *sy9* характеризуется плейотропным действием

на мейоциты. Первичные дефекты (или один первичный дефект, который нарушает сразу несколько цепочек мейотических событий), вызываемые мутацией, нам пока неизвестны. Новую информацию может дать протеомный анализ, который позволит установить белки и их характеристики, по наличию которых различаются мейоциты растений дикого типа и мейотических мутантов. Такую работу начали осуществлять Е.И. Михайлова и коллеги для мутаций *su1* и *su9* с использованием 2D – DIGE сравнительного электрофореза и последующей масс-спектрометрии специфичных для мейотических мутантов белков. В мейоз-специфичном протеомном “ландшафте” мутантов *su1* выявляется один специфичный белок, который является модификацией белка GAPDH, ответственного за энергетический метаболизм (Михайлова *и др.*, 2015). Мутанты *su9*, в свою очередь, характеризуются наличием нескольких уникальных белков (Е.И. Михайлова, личное сообщение). Этот факт является прямым доказательством плейотропного действия мутации *su9* на мейоциты. После расшифровки последовательностей специфичных белков мы приблизимся к пониманию того, какие молекулярные процессы нарушены, и нарушены каким образом, в мейоцитах гомозиготных по мутации *su9* растений.

3.3. Иммунофлуоресцентный анализ распределения белков ASY1 и ZYP1 в мейоцитах мутантов *sy1* и *sy19*

Материал для исследования. Для работы с мутациями *sy1* и *sy19* были использованы потомства от самоопыления растений №6s/7/7 (2008 г., Aberystwyth); №227/8, №227/9 и №227/14 (2004 г., Петергоф).

Растение №6s/7/7 – гетерозиготное по мутации *sy1* и гомозиготное по гену яровости *Sp1* растение. Генотип этого растения был определён Е.И. Михайловой и коллегами с помощью молекулярных маркеров *Rems1135* (сцеплен с *Sy1*) и *Rems1237* (сцеплен с *Sp1*) в ходе собственных исследований (Михайлова, 2011). Поскольку мутация *sy1* является моногенной и рецессивной (Соснихина *и др.*, 2005; Малышев *и др.*, 2009), в потомстве от самоопыления этого растения мы ожидали наблюдать расщепление по этой мутации в соотношении 3:1. Также мы ожидали, что все растения в данном потомстве будут яровыми.

Растения 227/8, 227/9 и 227/14 – это растения F₂ от скрещивания озимой линии-носителя мутации *sy19* с яровой линии Яр10. Генотип этих растений не был известен. Однако растение F₁ было гетерозиготным по мутации *sy19* (что было установлено С.П. Соснихиной по результатам генетического анализа) и, поскольку мутация *sy19* наследуется моногенно и рецессивно (Соснихина *и др.*, 2005; Долматович *и др.*, 2013а), хотя бы в одном из трёх потомств F₃ мы ожидали зафиксировать выщепление рецессивных гомозигот *sy19/sy19*. Также мы ожидали наблюдать расщепление по признаку озимости-яровости в потомствах F₃.

Растения выращивали в теплице ИОГен РАН весной-летом 2012 г.

3.3.1. Свето-микроскопический анализ метафазы I и наследование мутаций

И для мутантов *sy1*, и для мутантов *sy19*, изученных в нашей работе, было характерно высокое содержание унивалентов в МКП на стадии метафазы I (**Рисунок 16, Таблицы 20 и 21**). Модальное число унивалентов в МКП для растений гомозиготных по обеим мутациям составило максимально возможное для ржи число – 14.

В нашем исследовании было изучено 136 МКП шести мутантов *sy1/sy1*. При этом был обнаружен лишь единственный открытый бивалент, в остальных 135 МКП обнаруживались только униваленты. Для мутантов *sy19* была характерна немногим более высокая частота появления бивалентов в МКП. В 11,8% МКП мутантов *sy19* встречалось по одному открытому биваленту, в 6,6% МКП – по два открытых бивалента. В остальных 81,6% МКП присутствовали только униваленты.

Среднее число унивалентов для мутантов *sy1* составило $13,98 \pm 0,016$ унивалентов на МКП, для мутантов *sy19* – $13,49 \pm 0,254$ (для растений дикого типа – $0,21 \pm 0,066$).

Расщепление в потомствах, в которых обнаруживались мутантные растения, как и ожидалось, соответствовало моногенному расщеплению в случае полного доминирования (Таблица 19).

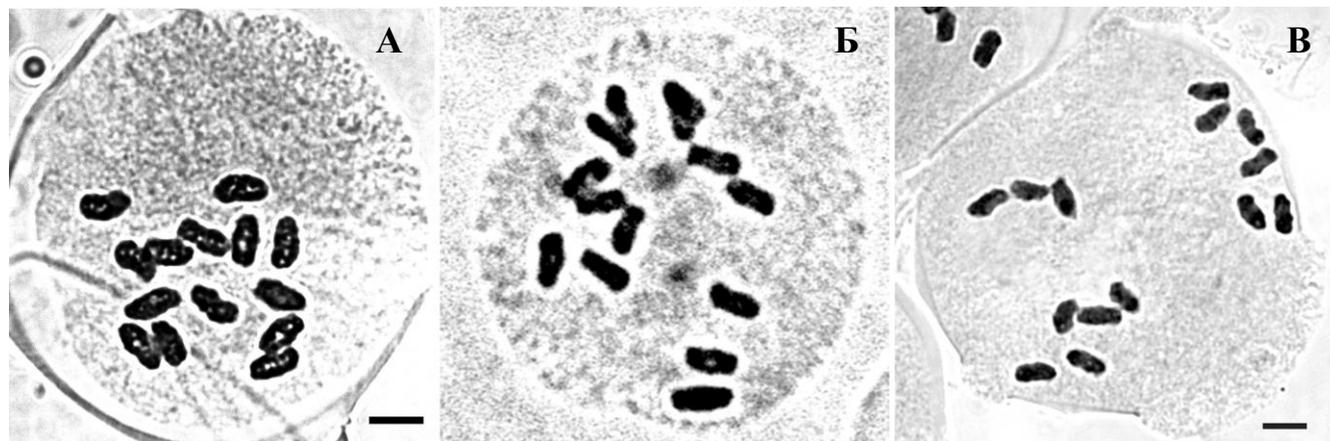


Рисунок 16. Метафаза I у мейотических мутантов *sy1* (А, Б) и *sy19* (В). Во всех трёх мейоцитах наблюдается по 14 унивалентов. Масштабные отрезки – 5 мкм.

Таблица 19. Анализ расщепления по мейотическим мутациям *sy1* и *sy19* в изученных потомствах

Родительское растение и его генотип	Растений изучено	Дикий тип	Мутанты	$\chi^2_{3:1}$	P
Расщепление по <i>sy1</i>					
6s/7/7 (+/ <i>sy1</i>)	20	14	6	0.27	0.603
Расщепление по <i>sy19</i>					
227/14 (+/+)	13	13	0	-	-
227/8 (+/ <i>sy19</i>)	18	16	2	-	-
227/9 (+/ <i>sy19</i>)	18	11	7	1.85	0.174
Σ (227/8 + 227/9)	36	27	9	0	1

$$\chi^2_{0,05} = 3.84 \text{ (d.f. = 1)}$$

Таблица 20. Распределение МКП в зависимости от числа унивалентов метафазе I у растений дикого типа и мутантов *sy1* и *sy19*

Образец	Кол-во МКП, шт.	Количество МКП с числом унивалентов, шт.								Среднее число унивалентов на МКП, шт.
		0	2	4	6	8	10	12	14	

Растения дикого типа:

6s/7/7 (n = 15)	88	76	9	3						0,34
227/8 (n = 16)	90	83	7							0,16
227/9 (n = 11)	80	75	5							0,13
Σ (%)	<u>258</u> 100	<u>234</u> 90,7	<u>21</u> 8,1	<u>3</u> 1,2						0,21±0,066

Мутанты *sy1* (из потомства 6s/7/7):

№202	25								25	14
№204*	11								11	14
№235	25								25	14
№243	25								25	14
№249	25								25	14
№264	25						1	24		13,92
Σ (n = 6) (%)	<u>125</u> 100						<u>1</u> 0,8	<u>124</u> 99,2		13,98 ± 0,016

Мутанты *sy19* (¹– из потомства 227/8, ² – из потомства 227/9):

№214 ^{1*}	5								5	14
№225 ¹	25					2	6	17		13,2
№218 ^{2*}	6						1	5		13,67
№220 ^{2*}	10							10		14
№232 ²	25					3	3	19		13,28
№248 ^{2*}	13						2	11		13,69
№258 ²	26							26		14
№259 ^{2*}	5							5		14
№261 ^{2*}	12							12		14
Σ (n = 9) (%)	<u>76</u> 100					<u>5</u> 6,6	<u>9</u> 11,8	<u>62</u> 81,6		13,49 ± 0,254

* – Данные по этим растениям не учитывались при объединении данных в связи с небольшим количеством МКП в выборке.

Таблица 21. Распределение МКП в зависимости от числа хиазм в метафазе I у растений дикого типа и мутантов *sy1* и *sy19*

Образец	Кол-во МКП, шт.	Кол-во пар гомологов, шт.	Число пар гомологов с числом хиазм, шт.			Среднее число хиазм на бивалент, шт.
			0	1	2	
Растения дикого типа:						
6s/7/7 (n = 15)	88	616	15	131	470	1,74
227/8 (n = 16)	90	630	7	96	527	1,83
227/9 (n = 11)	80	560	5	62	493	1,87
Σ (%)	<u>258</u> 100	<u>1806</u> 100	<u>27</u> 1,5	<u>289</u> 16	<u>1490</u> 82,5	1,81±0,038
Мутанты <i>sy1</i> (из потомства 6s/7/7):						
№202	25	175	175	0	0	0
№204*	11	77	77	0	0	0
№235	25	175	175	0	0	0
№243	25	175	175	0	0	0
№249	25	175	175	0	0	0
№264	25	175	174	1	0	0,005
Σ (n = 6) (%)	<u>125</u> 100	<u>875</u> 100	<u>874</u> 99,9	<u>1</u> 0,01	<u>0</u> 0	0,001
Мутанты <i>sy19</i> (¹ – из потомства 227/8, ² – из потомства 227/9):						
№214 ^{1*}	5	35	35	0	0	0
№225 ¹	25	175	165	10	0	0,06
№218 ^{2*}	6	42	41	1	0	0,02
№220 ^{2*}	10	70	70	0	0	0
№232 ²	25	175	166	9	0	0,05
№248 ^{2*}	13	91	89	2	0	0,02
№258 ²	26	182	182	0	0	0
№259 ^{2*}	5	35	35	0	0	0
№261 ^{2*}	12	84	84	0	0	0
Σ (n = 9) (%)	<u>76</u> 100	<u>532</u> 100	<u>513</u> 96,4	<u>19</u> 3,6	<u>0</u> 0	0,04 ± 0,019

* – Данные по этим растениям не учитывались при объединении данных в связи с небольшим количеством МКП в выборке.

3.3.2. Анализ профазы I

Мутации *sy1* и *sy19* являются хорошо изученными мейотическими мутациями ржи (Соснихина *и др.*, 1994; Соснихина *и др.*, 2005; Михайлова *и др.*, 2010). Ранее для этих мутаций был проведён электронно-микроскопический анализ СК (Sosnikhina *et al.*, 1992; Соснихина *и др.*, 2001). В результате этих исследований было установлено, что в мейоцитах мутантов *sy1* наблюдается асинапсис хромосом: СК не образуется, на протяжении всей профазы I в ядрах МКП присутствуют только неспаренные осевые элементы хромосом. У мутантов *sy19* был выявлен гетерологичный синапсис хромосом: СК образуется, но с большим количеством ошибок гомологии синапсиса. В мейоцитах мутантов *sy19* кроме нормально сформированных участков СК выявляются большое количество смен партнёров спаривания (“switches”) и участков с синапсисом латеральных элементов “на себя” (“foldbacks”) и сопровождающих их обширных зон асинапсиса. Таким образом, эти мутации принадлежат к разным группам мейотических мутаций: *sy1* является сильной асинаптической мутацией, а мутация *sy19* – мутацией гетерологичного (индискриминантного, негомологичного) синапсиса. Наша работа была посвящена иммунофлуоресцентному изучению распределения мейоз-специфичных белков в профазе I у этих мутантов.

Мейоз-специфичные белки у ржи неизвестны. Поэтому иммуноцитохимический подход для изучения мейоза у этого объекта основан на использовании антител к известным белкам других видов, в той или иной степени родственных ржи. Нами были использованы антитела, выработанные против белков ASY1 и ZYP1 арабидопсиса *A.thaliana*. Белок AtASY1 – белок, ассоциированный с латеральными элементами СК у капусты и арабидопсиса (Caryl *et al.*, 2000; Armstrong *et al.*, 2002), AtZYP1 – структурный белок поперечных филаментов центрального элемента СК (Higgins *et al.*, 2005). В исследованиях мейоза у покрытосеменных растений ASY1 используется как маркер латеральных элементов СК, ZYP1 – как маркер центрального элемента. Используя антитела против этих белков арабидопсиса, мы выявляли ортологи этих белков у ржи.

Мы исследовали распределения ASY1 и ZYP1 в профазе I мейоза у доступных нам мутантов ржи и провели сравнительный иммунофлуоресцентный анализ распределения этих белков в мейоцитах мутантов *sy1* и *sy19*. Подобное исследование для этих мутантов проводилось впервые. Методом иммуноцитохимии нами были изучены растения №243 и №249 (мутанты *sy1*), растение №214 (мутант *sy19*) и растение №250 (дикий тип).

В МКП растений ржи дикого типа сигналы ASY1 появлялись в ранней лептотене в виде многочисленных фокусов, рассредоточенных по ядру мейоцита. Далее, по мере развития стадии лептотены, сигналы ASY1 приобретали линейный вид и, начиная с этого момента, начинали

соответствовать картине поведения ОЭ/ЛЭ, которую мы наблюдали при электронно-микроскопическом изучении МКП после контрастирования хромосомных осей нитратом серебра. Сигналы ZYP1 начинали выявляться, также начиная со стадии лептотены. При этом они формировали независимые линейные треки, которые были частично разобщены с осями ASY1. При переходе к стадии зиготены происходило объединение линейных сигналов ASY1 и ZYP1 в двухполосую структуру неспаренных хромосомных осей (**Рисунок 17, А – В**). На стадии пахитены ASY1 и ZYP1 выявлялись нами также в виде двухполосой структуры, но уже синаптированных осей хромосом (**Рисунок 17, Г – Е**). Сформированные СК имеют трёхполосую структуру (ЛЭ – ЦЭ – ЛЭ), которая доступна для выявления только при электронно-микроскопическом исследовании, либо при использовании трёхмерной флуоресцентной микроскопии высокого разрешения. При использовании двумерной флуоресцентной микроскопии, как в случае нашего исследования, СК выявляется в виде недифференцированной линейной структуры, в составе которой, в зависимости от используемых антител, выявляются те или иные белки. По этой причине мы регистрировали двухполосые треки ASY1 и ZYP1 в структуре СК на стадии пахитены, а не трёхполосые, как можно было бы ожидать исходя из морфологии СК.

Зарегистрированное нами распределение ASY1 и ZYP1 в МКП мутантов *sy1* и *sy19* было схожим (**Рисунки 18 и 19**). До стадии зиготены картина распределения этих белков не отличалась от дикого типа. В лептотене формировались частично обособленные треки ASY1 и ZYP1. На стадии, аналогичной зиготене-пахитене при нормальном мейозе, происходило объединение линейных сигналов в структуре ОЭ, которые оставались неспаренными на протяжении всей профазы I. Сигналы ASY1 и ZYP1 оставались объединёнными и во время процессов трансформации и деградации СК в диплотене-диакенезе. В отличие от мутантов *sy9*, у которых наблюдалась спирализация ОЭ, у мутантов *sy1* и *sy19* в диплотене происходила фрагментация ОЭ (**Раздел 3.4**).

Следует отметить, что сигналы ZYP1 были намного слабее сигналов ASY1 как в МКП растений дикого типа, так и в МКП обоих мутантов (вне зависимости от набора используемых вторичных антител). Это наблюдение косвенно говорит о количественном различии в присутствии этих белков в МКП у ржи, которое соответствует картинам, наблюдаемым в других организмах. Например, установлено, что в профазе I мейоза пшеницы экспрессия ZYP1 в пять раз меньше экспрессии ASY1 (Khoо *et al.*, 2012).

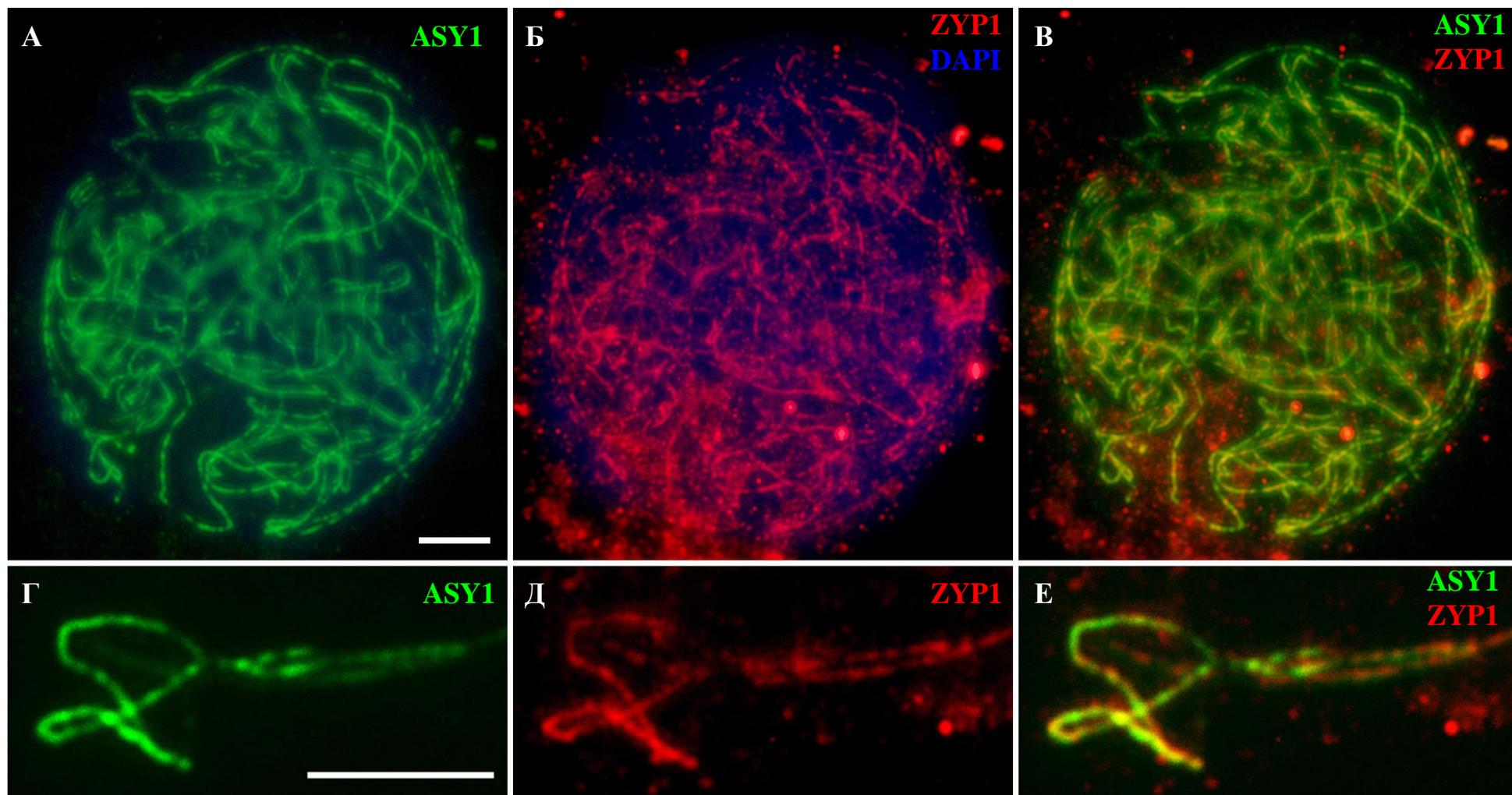


Рисунок 17. Распределение белков ASY1 (зелёный) и ZYP1 (красный) в распластанных ядрах мейоцитов растений ржи дикого типа: **А**, **Г** – распределение ASY1; **Б**, **Д** – распределение ZYP1; **В**, **Е** – совмещение сигналов ASY1 и ZYP1; **А**, **Б**, **В** – мейоцит на стадии зиготены; **Г**, **Д**, **Е** – фрагмент мейоцита на стадии поздней зиготены. Хроматин окрашен DAPI (синий). Масштабные отрезки – 5 мкм.

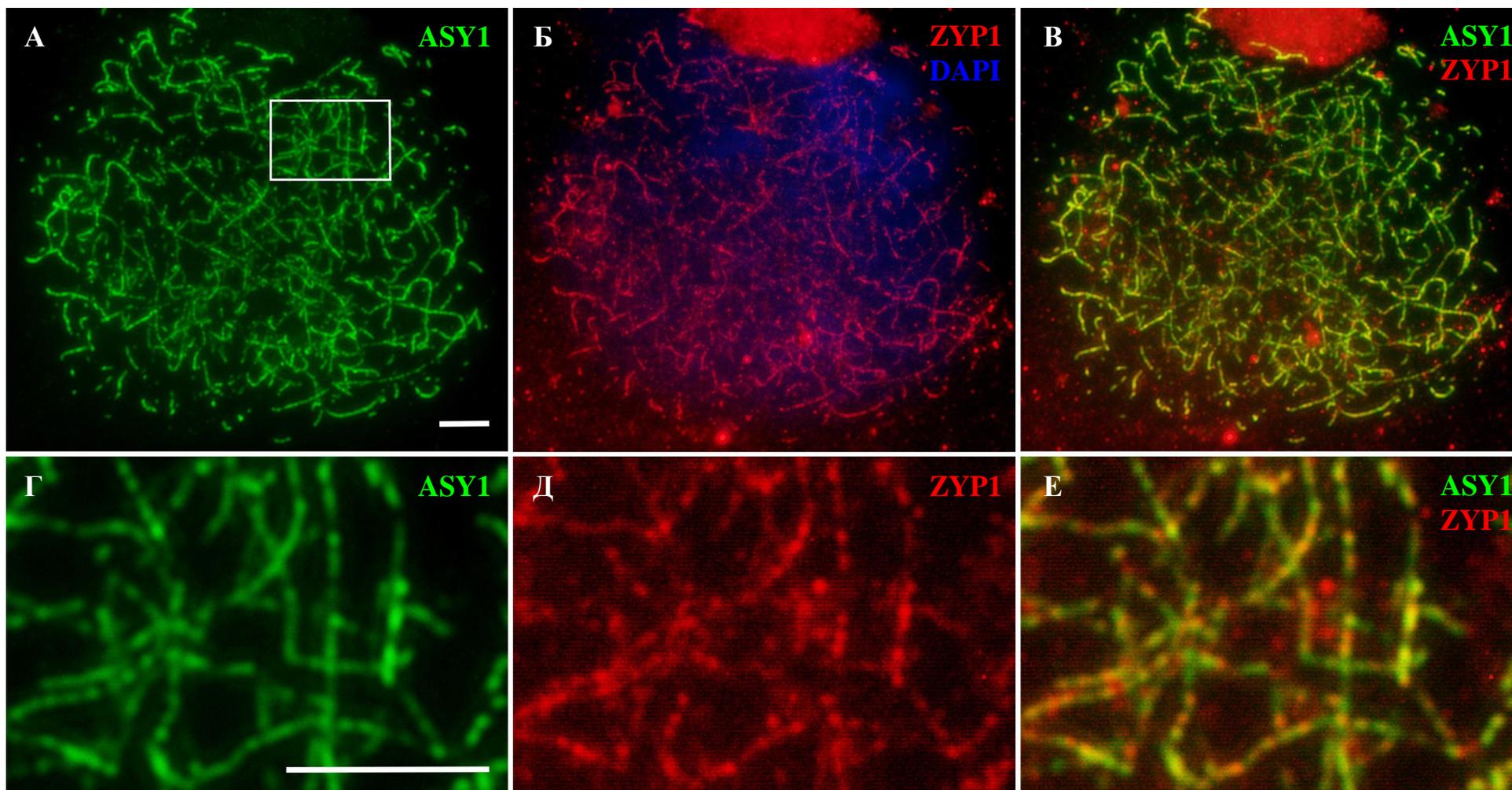


Рисунок 18. Распределение белков ASY1 (зелёный) и ZYP1 (красный) в распластанных ядрах мейоцитов асинаптических мутантов *sy1*: А, Г – распределение ASY1; Б, Д – распределение ZYP1; В, Е – совмещение сигналов ASY1 и ZYP1; А, Б, В – мейоцит на стадии, аналогичной зиготене-пахитене; Г, Д, Е – фрагмент того же мейоцита. Хроматин окрашен DAPI (синий). Масштабные отрезки – 5 мкм.

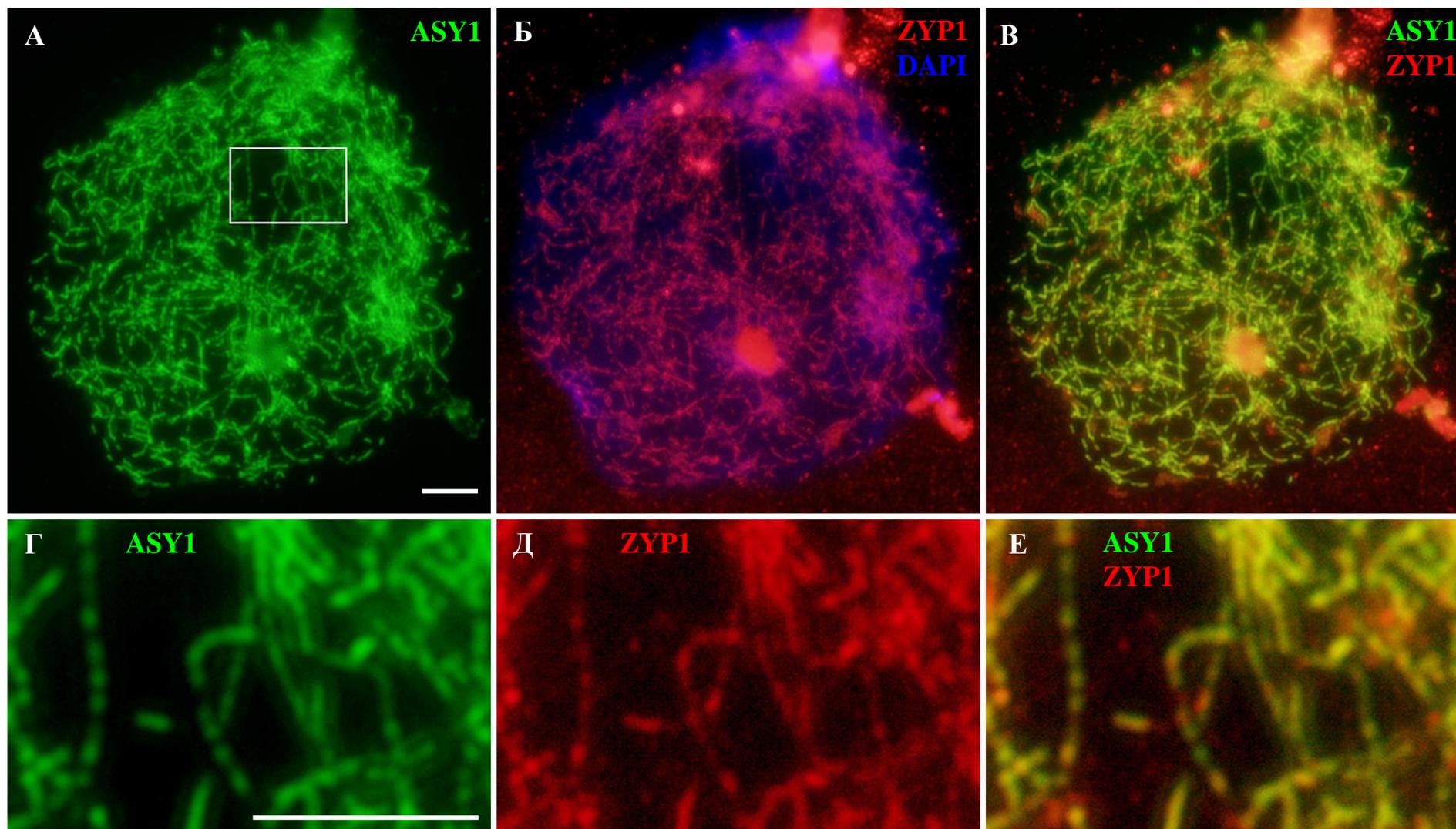


Рисунок 19. Распределение белков ASY1 (зелёный) и ZYP1 (красный) в распластанных ядрах мейоцитов мутанта *sy19*: **А, Г** – распределение ASY1; **Б, Д** – распределение ZYP1; **Б', Е** – совмещение сигналов ASY1 и ZYP1; **А, Б, Б'** – мейоцит на стадии, аналогичной зиготене-пахитене; **Г, Д, Е** – фрагмент того же мейоцита. Хроматин окрашен DAPI (синий). Масштабные отрезки – 5 мкм.

3.3.3. Обсуждение

Изучение совместного распределения белков ASY1 и ZYP1 в последние годы стало неотъемлемой частью прогрессивных исследований мейоза у высших растений. Такие исследования проведены среди двудольных растений для арабидопсиса, среди однодольных – для риса, ячменя, кукурузы, пшеницы и ржи. Также стали появляться работы, в которых распределение данных белков используется для изучения мейоза у экзотических, с точки зрения цитогенетики, видов. Например, распределение ASY1 и ZYP1 изучено у растения *Luzula elegans*, у которого наблюдается инвертированная последовательность стадий мейоза и существование СК у этого вида растений вызывало вопрос у исследователей. Проведя иммунофлуоресцентный анализ распределения этих белков (вместе с другими цитогенетическими методами), авторы сделали вывод о том, что СК у *L. elegans* существует и протекание профазы I принципиально не отличается от видов растений с классической последовательностью стадий мейоза (Heckmann *et al.*, 2014).

Иммунофлуоресцентный подход для изучения ортологов белков AtASY1 и AtZYP1 у ржи впервые был применён Е.И. Михайловой и соавторами (Mikhailova *et al.*, 2006). Коллективом авторов было изучено совместное распределение ASY1 и ZYP1 в МКП растений ржи дикого типа и мейотических мутантов *sy10*. В результате исследования была предложена модель сборки СК у ржи, в соответствии с которой линейные оси белков ASY1 и ZYP1 образуются до синапсиса гомологов, объединяясь в трёхполосую структуру, у которой два слоя ASY1 фланкируют слой ZYP1, только на стадии пахитены. Кроме того, был сделан вывод о том, что белки ASY1 и ZYP1 необходимы, но недостаточны для сборки СК у ржи: оба белка присутствуют на осях мейотических хромосом у мутантов *sy10*, образуя двухполосые линейные оси, но сборка СК нарушена (Mikhailova *et al.*, 2006; Михайлова *и др.*, 2010).

В нашей работе мы использовали анализ распределения белков ASY1 и ZYP1 для раскрытия молекулярных особенностей дефектов, вызываемых мутациями *sy1* и *sy19*. У этих мутантов нарушено образование ЦЭ при полностью сформированных ОЭ: у мутантов *sy1* наблюдается полный асинапсис гомологов и ЦЭ не образуется, у мутантов *sy19* ЦЭ образуется, но как между гомологичными, так и между негомологичными хромосомами. Мы выдвинули гипотезу о том, что у мутантов *sy1* и/или у мутантов *sy19* может быть нарушена загрузка белка ZYP1 на хромосомные оси в профазе I, что и обуславливает цитологические фенотипы мутантов.

Однако наша гипотеза не подтвердилась. Мы не зарегистрировали отличий в загрузке как ASY1, так и ZYP1 на хромосомные оси ни у мутантов *sy1*, ни у мутантов *sy19*. Оба белка

присутствуют в сравнимом с диким типом количестве на мейотических осях хромосом, но процессы взаимодействия гомологов в МКП мутантов нарушены.

Таким образом, мы можем сделать два вывода.

1. СК в профазе I у ржи образуются не путем встраивания белка ZYP1 между синаптирующими гомологами, а путем объединения образовавшихся еще до начала синапсиса линейных структур этого белка.

2. Присутствие ZYP1 на осях мейотических хромосом ржи не является решающим условием успешного осуществления синапсиса гомологов. ZYP1 присутствует на осях мейотических хромосом у мутантов *sy1* и *sy19*, но формирование СК у этих мутантов нарушено. Очевидно, что для объединения хромосомных осей в трехполосную структуру СК у ржи необходим дополнительный фактор.

Наши выводы являются первым подтверждением модели (**Рисунок 20**), предложенной Е.И. Михайловой и соавторами на основе анализа распределения ASY1 и ZYP1 у растений ржи дикого типа и мутантов *sy10* (Михайлова и др., 2010). Мы получили идентичные результаты по распределению этих двух белков при нормальном мейозе и обогатили модель данными по мутациям *sy1* и *sy19*.

Для растений первые белки ЦЭ были описаны у арабидопсиса *A. thaliana* – AtZYP1a и AtZYP1b, которые имеют 93% гомологию на нуклеотидном уровне соответствующих им генов (Higgins *et al.*, 2005). Открытие этих белков было сделано с помощью BLAST анализа протеома арабидопсиса на основе уже известных к тому времени белков поперечных филаментов СК: SCP1 крысы (Meuwissen *et al.*, 1992), SCP1 человека (Meuwissen *et al.*, 1997), ZIP1 дрожжей (Sym *et al.*, 1993), c(3)G дрозофилы (Page, Hawley, 2001) и SYP-1 нематоды (MacQueen *et al.*, 2002), т.е. с помощью стратегии «обратной генетики» (reverse genetics strategy), которая успешно применяется в изучении мейотических генов растений (Mercier, Grelon, 2008). Затем, уже на основе последовательностей белков ZYP1a и ZYP1b арабидопсиса, были идентифицированы белки ЦЭ других растений: ZYP1 ячменя (Barakate *et al.*, 2014), ZEP1 риса (Wang *et al.*, 2010), ZYP1 мягкой пшеницы (Khoo *et al.*, 2012) и ZYP1 кукурузы (Golubovskaya *et al.*, 2011).

Ранее были изучены *Asy1*-гены и соответствующие им белки у арабидопсиса, риса и пшеницы: AtASY1 (Caryl *et al.*, 2000; Armstrong *et al.*, 2003), OsPAIR2 (Nonomura *et al.*, 2004; Nonomura *et al.*, 2006) и TaASY1 (Boden *et al.*, 2007; Boden *et al.*, 2009) соответственно.

Для всех перечисленных выше видов растений было изучено распределение белков ASY1 и ZYP1 в ядрах мейоцитов во время профазы I мейоза. Далее мы рассмотрим особенности распределения ASY1 и ZYP1 в профазе I у этих видов и сравним их с полученными нами результатами на ржи.

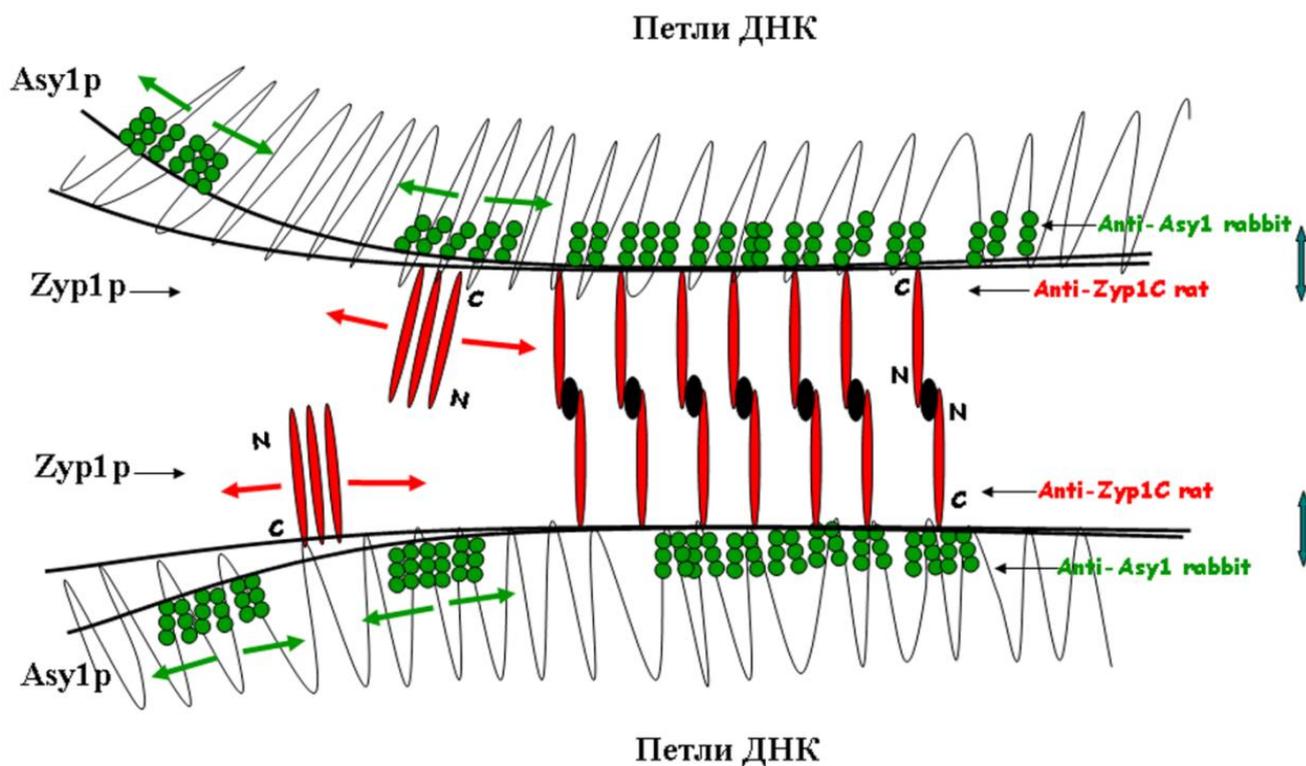


Рисунок 20. Модель загрузки белков ASY1 и ZYP1 на оси мейотических хромосом ржи. Независимые линейные сигналы (“треки”) ASY1 и ZYP1 формируются до начала синапсиса. Далее происходит объединение сигналов двух белков (но не их колокализация) на осях неспаренных мейотических хромосом. В пахитене сигналы ZYP1 двух гомологов объединены, формируется трёхполосая структура, в которой сигналы ZYP1 заключены между сигналами ASY1 (Михайлова *и др.*, 2010).

У арабидопсиса *A.thaliana* сигналы ASY1 появляются при переходе МКП от G2 стадии предмейотической интерфазы к лептотене в виде дискретных фокусов и предшествуют появлению сигналов ZYP1. К моменту появления сигналов ZYP1, сигналы ASY1 уже успевают сформировать протяжённые треки вдоль неспаренных хромосомных осей. По мере развития процессов синапсиса оба белка обнаруживаются вдоль бивалентов профазных мейотических хромосом, сигналы ZYP1 удлиняются. В пахитене формируется непрерывная трёхкомпонентная структура, в которой сигнал ZYP1 заключён с двух сторон треками ASY1 (Higgins *et al.*, 2005).

У пшеницы *T.aestivum* сигналы ZYP1 начинают появляться во время ранней лептотены в виде точечных фокусов, которые локализуются в хроматине. Во время перехода МКП к стадии зиготены сигналы ZYP1 формируют короткие линейные треки, в течение средней зиготены они

удлиняются. В пахитене сигналы ZYP1 представляют собой протяжённые треки, в то время как ASY1 уже “выгрузился” из этих регионов. Сигналы ZYP1 появляются в тех регионах, в которых первым появился ASY1 и в которых он к тому моменту уже выгрузился. В пахитене трёхполосная структура белков ASY1 и ZYP1 не формируется (Khoo *et al.*, 2012).

Phillips и соавторы (2012) провели анализ распределения ASY1 и ZYP1 в ядрах мейоцитов у ячменя *H. vulgare* с использованием трёхмерной флуоресцентной микроскопии высокого разрешения (3D-SIM). Авторы установили, что у ячменя во время зиготены сигналы ASY1 пропадают из только что синаптированных регионов, в которые начинает загружаться ZYP1, однако появляются на хромосомных осях вновь на стадии пахитены. При этом в пахитене сигнал слабее и распределён не по всей длине СК. Было предложено два возможных объяснения такой динамики ASY1: либо происходит временная модификация его эпитопа, и поэтому он перестаёт выявляться после синапсиса и до наступления зрелой пахитены, либо, действительно, ASY1 выгружается с хромосомных осей во время зиготены и загружается вновь на стадии пахитены (Phillips *et al.*, 2012). Так или иначе, это является отличительной особенностью профазы I ячменя.

Белок PAIR2 риса *O. sativa* (ортолог ASY1 арабидопсиса и пшеницы) появляется на стадии S/G2 предмейотической интерфазы, в ранней профазе он ассоциирован с ОЭ. Во время синапсиса гомологов PAIR2 выгружается с хромосомных осей и начинает присутствовать в нуклеоплазме в виде диффузного сигнала (Nonomura *et al.*, 2006). Белок поперечных филаментов СК риса ZEP1 (ортолог белков ZYP1 других растений) появляется в лептотене в виде отдельных фокусов, во время поздней лептотены и в течение стадии зиготены сигналы постепенно удлиняются и формируют короткие треки; к моменту наступления пахитены сигнал оказывается выровнен вдоль всей длины бивалентов. Такое распределение сохраняется вплоть до поздней пахитены, затем, в диплотене, ZEP1 отделяется от СК и присутствует в виде агрегатов в нуклеоплазме. В диакинезе остаточные сигналы сепарированы от бивалентов, но продолжают присутствовать в нуклеоплазме. Интересно, что ZEP1 снова загружается на хромосомы в молодых микроспорах, во время деконденсации хромосом после мейотического деления, что даёт основание предполагать о дополнительных функциях этого белка (Wang *et al.*, 2010).

У кукурузы *Z.mays* сигналы ASY1 появляются в лептотене. В лептотене и зиготене ASY1 маркируют неспаренные регионы хромосом. После синапсиса, сигнал ASY1 на осях хромосом сильно ослабевает и становится прерывистым. Более надёжным маркером ЛЭ у кукурузы является белок AFD1 (ортолог REC8), который ассоциирован с ОЭ/ЛЭ и до, и после синапсиса гомологов. ZYP1 появляется в лептотене в виде диффузного сигнала. Во время зиготены ZYP1 загружается в синаптированные регионы и формирует линейные сигналы между

гомологичными хромосомами, в пахитене сигналы формируют непрерывный сигнал по всей длине бивалентов, в поздней пахитене сигнал фрагментируется и рассеивается (Wang *et al.*, 2009; Golubovskaya *et al.*, 2011).

Время появления обоих белков в МКП всех изученных видов, судя по всему, не отличается – это G2/лептотена для ASY1 и лептотена для ZYP1. Однако характер загрузки этих белков на мейотических хромосомах и их распределение отличается у изученных растений. В упрощённом виде особенности участия белков ASY1 и ZYP1 в синапсисе хромосом у этих видов представлены в **Таблице 22**.

Таблица 22. Отличительные особенности загрузки и распределения белков ASY1 и ZYP1 в профазе I мейоза у шести видов растений

	Белок ASY1		Белок ZYP1	
	Сигнал пропадает/ослабевает после синапсиса	В пахитене образуется трёхполосая структура из белков ASY1 и ZYP1	Загружается на хромосомные оси до синапсиса	Загружается в места синапсиса
Арабидопсис	–	+	–	+
Пшеница	+	–	–	+
Ячмень	+	+	–	+
Рис	+	–	–	+
Кукуруза	+	–	–	+
Рожь	–	+	+	–

По характеру загрузки/выгрузки ASY1 рожь схожа с арабидопсисом и ячменём. У этих растений ASY1 присутствует на полностью сформированных профазных бивалентах и надёжно маркирует латеральные элементы СК. В отличие от них у пшеницы, риса и кукурузы сигналы ASY1 пропадают из синаптированных регионов.

Существует гипотеза, согласно которой ослабление или полное исчезновение сигнала ASY1 из синаптированных регионов (у пшеницы, ячменя, риса и кукурузы) является следствием маскировки или модификации его (белка ASY1) эпитопа в процессе синапсиса, вследствие чего сигнал ASY1 пропадает с хромосомных осей. Косвенным доказательством этого предположения является факт того, что в профазе I ячменя сигнал ASY1 сначала пропадает из регионов синапсиса в зиготене, а затем появляется вновь в пахитене. Одно из объяснений такого поведения сигналов ASY1 – временная модификация его эпитопа (Phillips *et*

al., 2012). Другое косвенное доказательство этой гипотезы было получено на кукурузе. При использовании модифицированного способа фиксации МКП, 2% раствором параформальдегид вместо 4% раствора, сигналы ASY1 сохранялись и во время пахитены. При такой фиксации структура конденсированного хроматина сохраняется не полностью, поэтому авторы предполагают, что при традиционной фиксации после завершения синапсиса происходит маскировка эпитопа ASY1 (Golubovskaya *et al.*, 2006; Golubovskaya *et al.*, 2011). В случае, если эта гипотеза верна, то все шесть изученных растений не имеют принципиальных отличий в распределении ASY1. Прямых доказательств факта модификации эпитопа ASY1 в синаптированных регионах на сегодняшний день нет.

Распределение ZYP1 схоже у всех пяти изученных ранее видов. Сигналы этого белка встраиваются в регионы спаривания и по мере развития синапсиса удлиняются. Такая картина поведения белков поперечных филаментов характерна и для других видов организмов. Однако рожь имеет уникальную особенность по иммунофлуоресцентному портрету белка ZYP1 – белок загружается не в места синапсиса гомологов, а формируют линейные сигналы (“треки”) ещё до начала синапсиса в лептотене, которые затем объединяются с треками ASY1. Далее, по мере осуществления синапсиса, объединяются треки ZYP1 двух гомологичных хромосом и формируется трёхполосая структура, в которой два объединённых трека ZYP1 с двух сторон “flanкируется” сигналами ASY1. Взаиморасположение этих белков в пахитене у ржи дикого типа было установлено с помощью трёхмерной флуоресцентной микроскопии высокого разрешения (Mikhailova *et al.*, 2006). Факт сборки треков ZYP1 у ржи до начала спаривания установлен в двух независимых работах – в работе Е.И. Михайловой и соавторов и в нашем исследовании. В этих исследованиях использовались различные способы приготовления мейотических препаратов и их фиксации.

Судя по всему, ржаной ортолог белка ZYP1 является также и белком ОЭ/ЛЭ. Доказательством этого является и результат анализа синаптических мутантов *sy10* (Mikhailova *et al.*, 2006), *sy1* и *sy19* (наша работа). У всех трёх мутантов наблюдается загрузка ZYP1 на хромосомные оси вне зависимости от синапсиса: ZYP1 присутствует на осях хромосом, но образование ЦЭ нарушено. У ржи дикого типа ZYP1, судя по всему, выполняет и функцию белка ЦЭ: в пахитене линейные сигналы ZYP1 двух гомологов объединяются и оказываются заключёнными между сигналами ASY1, которые образуют соответствующее ширине СК пространство. Т.к. формирование ЦЭ у мутантов не происходит, а ZYP1 присутствует на осях хромосом, то для объединения треков ZYP1 необходимы дополнительные факторы, которые, возможно, и дефектны у изученных мутантов. Открыты новые белки ЦЭ у мыши и нематоды, которые формируют сложные комплексы с белками поперечных филаментов и необходимы для их корректной сборки (Hamer *et al.*, 2006; Schild-Prüfert *et al.*, 2011; Schramm *et al.*, 2011;

Hawley, 2011). Еще ранее методами биоинформатики предсказан новый белок ЦЭ у нематоды (Гришаева *и др.*, 2004). Вполне возможно, что аналогичные им белки наличествуют и в мейотическом протеоме ржи.

Таким образом, ортолог AtZYP1 у ржи сочетает в себе особенности как белков ЛЭ, так и белков поперечных филаментов СК. Этот факт является уникальной особенностью мейотических хромосом ржи.

3.4. Сравнительный цитологический анализ стадии диплотены у растений дикого типа и мейотических мутантов *sy1*, *sy9*, *sy11* и *sy19*

Анализ профазы I у мейотических мутантов в предыдущих разделах заканчивался на стадии пахитены. В этом разделе мы отдельно остановимся на стадии диплотены у изученных в нашей работе форм ржи и проведём их сравнительный цитологический анализ. Выделение такого анализа 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 очень мало. Существует только небольшое число работ, в которых в той или иной степени уделено внимание судьбе СК на стадиях диплотены и диакинеза. Специальные публикации, посвящённые этим стадиям, были сделаны только сотрудниками лаборатории цитогенетики ИОГен РАН (Fedotova *et al.*, 1989; Коломиец *и др.*, 2001; Симановский *и др.*, 2014). 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. В вопросах преобразования СК в ходе диплотены достаточно белых пятен.

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 были получены оригинальные данные о трансформации ультраструктурных компонентов СК на стадии диплотены (Fedotova *et al.*, 1989).

Поэтому в нашей работе мы уделили особое внимание вопросу разборки (деградации, трансформации) СК и продолжили детальное изучение стадии диплотены у ржи дикого типа и у мейотических мутантов *sy11*, *sy9*, *sy1* и *sy19*. Анализ проводился на тех же растениях, подробная работа с которыми описана в **Разделах 3.1, 3.2 и 3.3.**

3.4.1. Трансформация латеральных элементов синаптонемных комплексов в диплотене у растений дикого типа

При электронно-микроскопическом изучении диплотенных МКП растений ржи дикого типа (контрастирование препаратов проводили раствором AgNO_3 с $\text{pH} = 3,5$) мы обнаружили цитологические картины подобные тем, что были описаны ранее Федотовой и соавторами

(1989). Также мы провели иммунофлуоресцентный анализ диплотенных МКП с использованием антител против белка AtASY1. Цитологические картины, выявленные обоими методами, оказались полностью идентичными.

В ранней диплотене наблюдалось локальное отталкивание (десинапсис) латеральных элементов (**Рисунок 21, А**). В средней диплотене зона десинапсиса увеличивалась, трансформирующиеся ЛЭ приобретали вид петель (**Рисунок 21, Б, В**). Начиная с этой стадии можно было наблюдать разделение (расслоение) ЛЭ на две нити, которые формировали независимые петли. Между линейно расположенными вдоль бивалента основаниями петель сохранялись участки СК, которые к этой стадии становились более электронно-плотными (т.е. утолщёнными). В дальнейшем, в поздней диплотене, такие фрагменты СК превращались в парные плотные утолщения латеральных элементов.

Начиная со средней диплотены выявлялась спирализация компонентов деградирующих СК. По нашим наблюдениям в кариоплазме мейоцитов ржи на стадии средней диплотены присутствовали следующие структуры, которые имели тенденцию приобретать спирализованный вид.

1. Компоненты (белковые нити) расслоившихся ЛЭ.
2. Латеральные элементы, которые десинаптировали, но не расслоились (**Рисунок 22, Г**).
3. Сохраняющиеся фрагменты ещё недеградировавших (либо деградировавших неполностью) СК (**Рисунок 22, В**)

Постепенно такие структуры исчезали. В поздней диплотене в кариоплазме присутствовали парные утолщения ЛЭ с редкими остатками других компонентов деградировавших ЛЭ (**Рисунок 22, Д**).

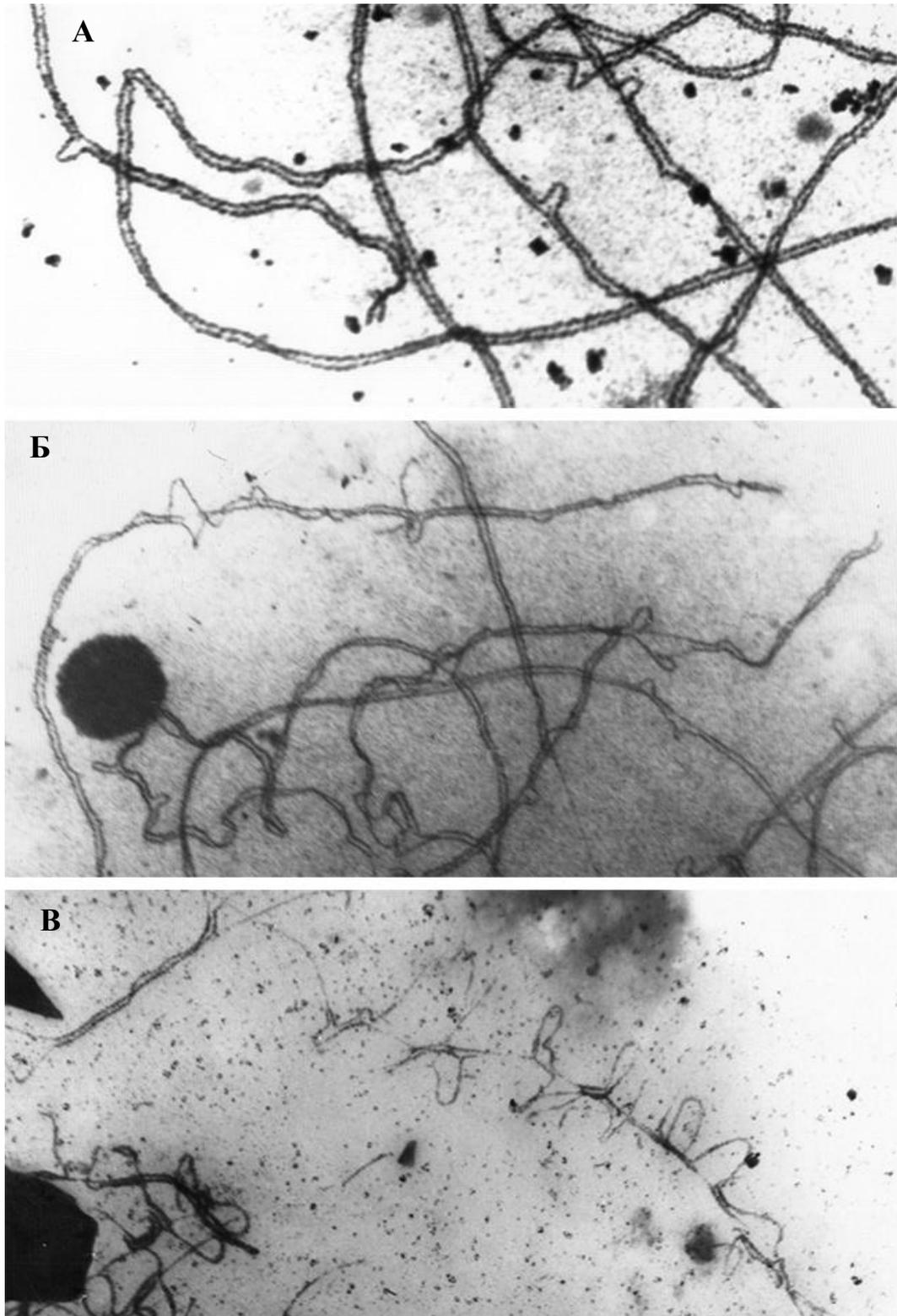


Рисунок 21. Фрагменты электронно-микроскопических фотографий распластанных ядер мейоцитов растений ржи дикого типа на стадии диплотены (контрастирование AgNO_3 с $\text{pH} = 3,5$): **А** – ранняя диплотена; **Б** – ранняя-средняя диплотена; **В** – средняя диплотена.

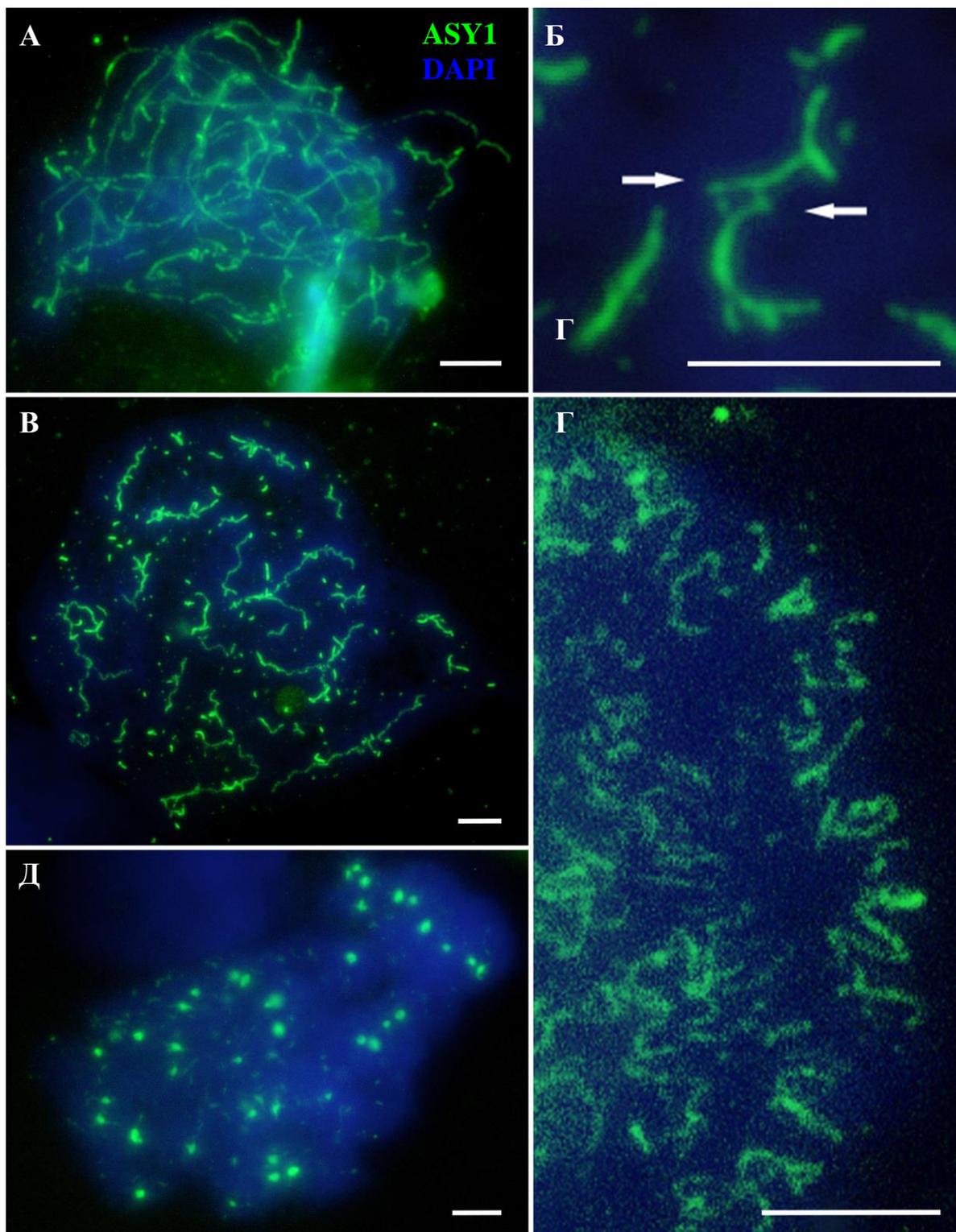


Рисунок 22. Иммунофлуоресцентное выявление белка ASY1 (зелёный) в распластанных ядрах мейоцитов растений ржи дикого типа на стадии диплотены: **А** – ранняя диплотена; **Б, В, Г** – средняя диплотена; **Д** – поздняя диплотена; **Б** – десинапсис латеральных элементов синаптонемных комплексов (показан стрелками); **Г** – спирализация десинапсировавших латеральных элементов. Хроматин окрашен DAPI (синий). Масштабные отрезки – 5 мкм.

3.4.2. Диплотена у мейотических мутантов *sy11*

В зиготене-пахитене у мутантов *sy11* происходит гетерологичный синапсис хромосом (**Раздел 3.1**). В пахитене кроме СК, образованных гомологичными хромосомами, присутствуют сложные конфигурации СК, которые являются следствием негомологичного синапсиса. Гетерологичный синапсис сопровождается регионами асинапсиса хромосом.

В ранней диплотене в МКП мутантов *sy11*, аналогично дикому типу, наблюдается локальное отталкивание ЛЭ и их выпетливание из структуры СК (**Рисунок 23, А**). ОЭ, которые оставались неспаренными в пахитене, в ранней диплотене приобретали волнистую структуру и начинали спирализовываться. Подобную картину трансформации ОЭ мы наблюдали также в ранней диплотене у мутантов *sy9* (**Раздел 3.4.3**).

Средняя диплотена у мутантов *sy11* неотличима от поздней диплотены у растений дикого типа. Сохранившиеся фрагменты СК имели извитой, и часто спирализованный, вид, выявлялась спирализация деградирующих ЛЭ/ОЭ и их компонентов (**Рисунок 23, Б**).

3.4.3. Спирализация осевых элементов в диплотене у мутантов *sy9*

В пахитене у мутантов *sy9* нами был выявлен сильный асинапсис хромосом, спаривание и синапсис происходили только в единичных сайтах. В пахитенных МКП присутствовали преимущественно неспаренные осевые элементы мейотических хромосом (**Раздел 3.2**).

В ранней диплотене ОЭ приобретали волнистый (извитой) вид, общая длина ОЭ при этом увеличивалась (**Рисунок 24, А, Б**). Далее происходила постепенная спирализация ОЭ. В средней диплотене все осевые элементы в МКП мутантов *sy9* оказывались спирализованными (**Рисунок 24, В, Г**).

Начиная со стадии средней диплотены выявлялись непарные утолщения на спирализованных ОЭ. К поздней диплотене ОЭ разрушались, в МКП выявлялись только непарные утолщения ОЭ, которые при использовании антител против ASY1 давали сильное флуоресцентное свечение (**Рисунок 24, Д**). Следовательно, они содержали белок ASY1.

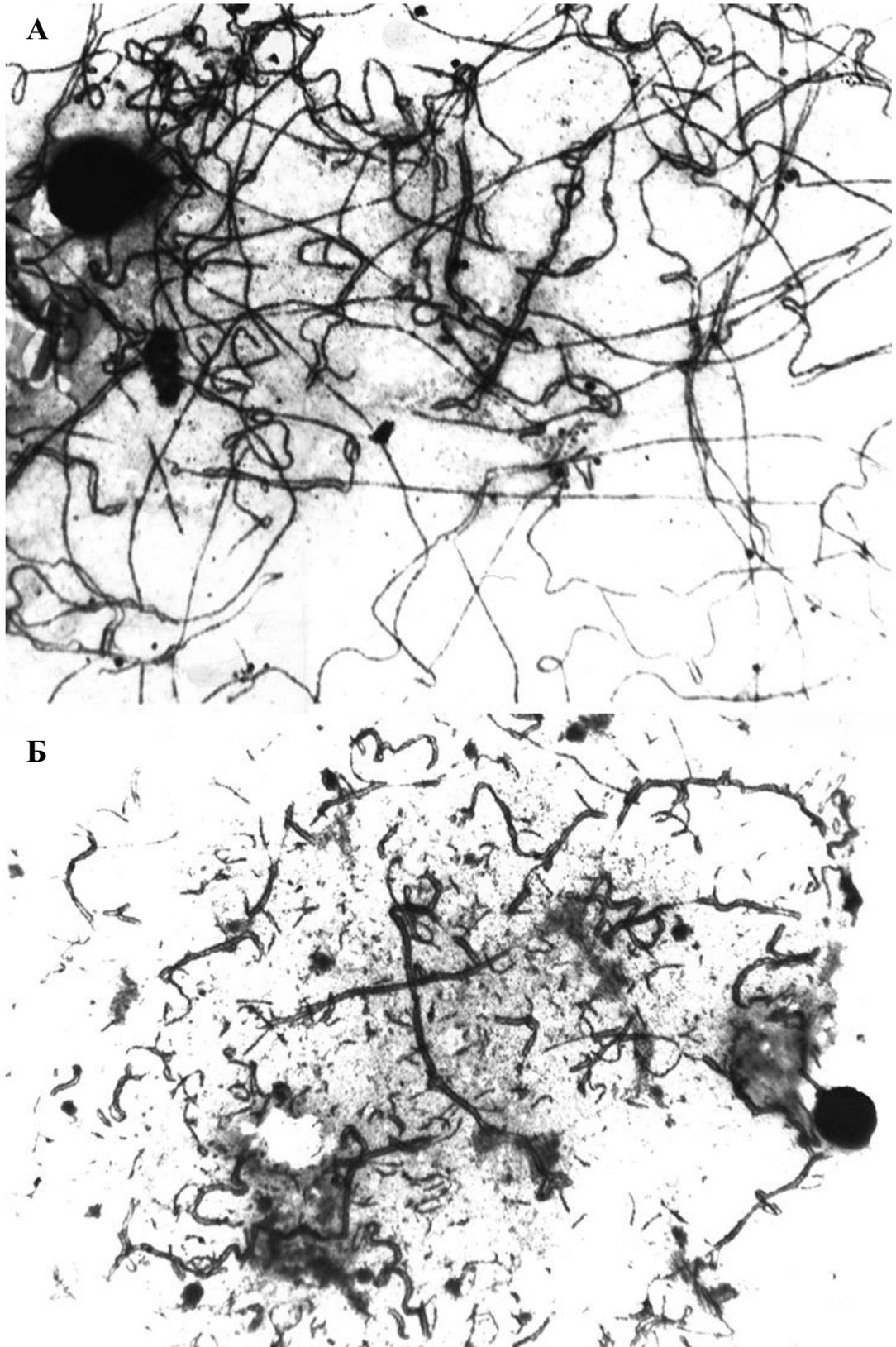


Рисунок 23. Электронно-микроскопические фотографии фрагментов распластанных ядер мейоцитов мутантов *su11* на стадии ранней-средней диплотены (А) и на стадии средней диплотены (Б). Контрастирование 70% раствором AgNO_3 (А – рН = 3,5; Б – рН = 7).

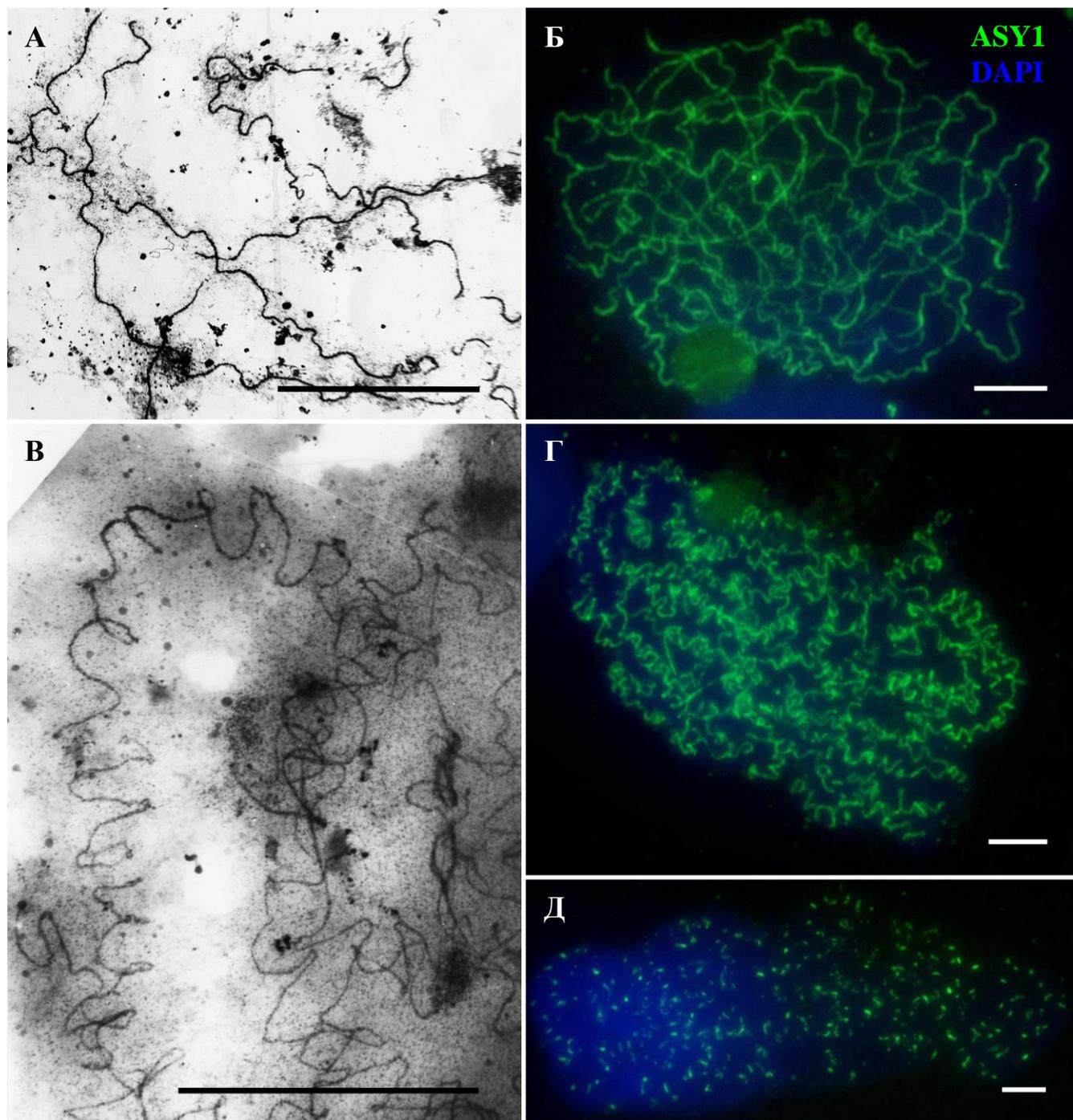


Рисунок 24. Спирализация осевых элементов хромосом в распластанных ядрах мейоцитов на стадии диплотены у асинаптических мутантов *sy9*: **А, В** – фрагменты электронно-микроскопических фотографий; **Б, Г, Д** – иммунофлуоресцентное выявление белка ASY1 (зелёный), хроматин окрашен DAPI (синий); **А, Б** – ранняя диплотена, **В, Г** – средняя диплотена, **Д** – несколько мейоцитов на стадии поздней диплотены. Масштабные отрезки – 5 мкм.

3.4.4. Фрагментация осевых элементов хромосом в диплотене у мутантов *sy1* и *sy19*

В диплотене у мутантов *sy1* и *sy19* нами не было выявлено следов спирализации ОЭ. В отличие от растений дикого типа и мутантов *sy9* и *sy11* у этих мутантов деградация ОЭ происходила путём их постепенной фрагментации (**Рисунки 25 и 26**). В ранней диплотене начинали образовываться бреши. В средней диплотене в МКП присутствовали короткие фрагменты деградирующих ОЭ. В поздней диплотене обнаруживались лишь точечные остатки ОЭ. С помощью совместного выявления белков ASY1 и ZYP1 в МКП мутантов *sy1* и *sy19* нами было установлено, что сигналы этих белков, объединившись на осях профазных хромосом в пахитене (**Раздел 3.3**), остаются объединёнными вплоть до полной их (осей) деградации в поздней диплотене (**Рисунок 25, В, Г, Д; Рисунок 26, Б, В, Г**). Утолщения на деградирующих ОЭ у мутантов *sy1* и *sy19* не обнаруживались.

3.4.5. Обсуждение

Если анализ хромосом на стадии пахитены удобен для изучения детальной линейной структуры хромосом и для выяснения степени их гомологии, то на стадии диплотены возможен точный анализ числа хиазм и их локализации. Во время диплотены хромосомы еще достаточно длинны (по сравнению с последующей стадией диакинеза), а гомологи десинаптивированы по всей длине, кроме локусов хиазм, где еще сохраняются короткие фрагменты СК с рекомбинационными узелками (Zickler, Kleckner, 1999). По этой причине знание детальной структуры хромосом на стадии диплотены имеет существенное значение для цитогенетики. Однако методы электронной микроскопии, позволившие открыть СК и выяснить роль этой важной вспомогательной структуры в механизмах синапсиса, рекомбинации и образования хиазм, оставались до некоторого времени неэффективными для анализа ультраструктуры диплотенных хромосом. Кроме фрагментов СК, составлявших доли процентов длины хромосом, остальная длина хромосом не поддавалась анализу из-за деконденсированного (диффузного) состояния хроматина и отсутствия каких-либо морфологических маркеров на хромосомах, как у животных, так и у растений (Zickler, Kleckner, 1999; Богданов, Коломиец, 2007).

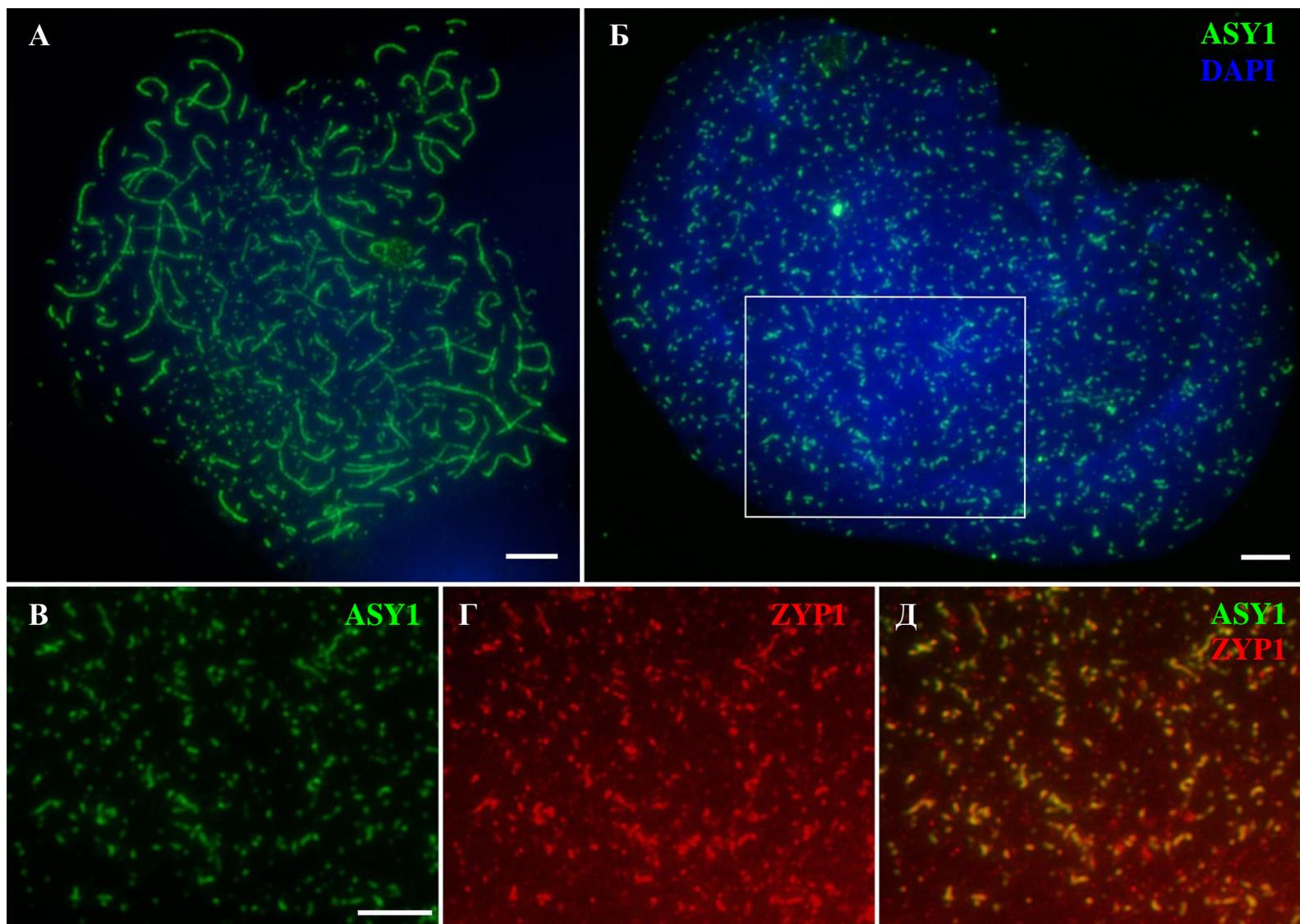


Рисунок 25. Фрагментация осевых элементов хромосом в распластанных ядрах мейоцитов мутантов *sy1* на стадии диплотены. Иммунофлуоресцентное выявление белков ASY1 (зелёный) и ZYP1 (красный): **А** – мейоцит на стадии средней диплотены; **Б** – мейоцит на стадии поздней диплотена; **В, Г, Д** – фрагмент того же мейоцита. Хроматин окрашен DAPI (синий). Масштабные отрезки – 5 мкм.

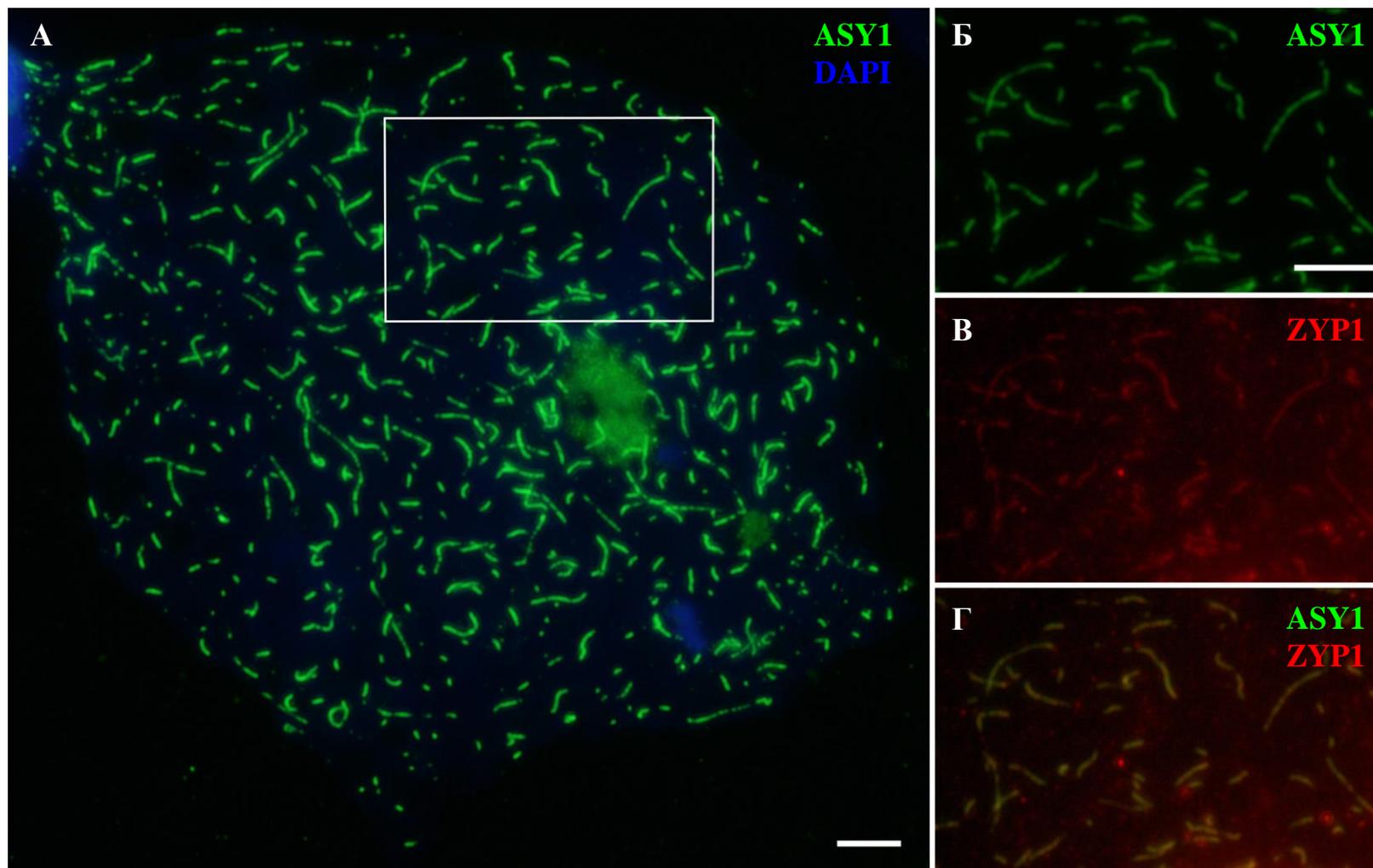


Рисунок 26. Фрагментация осевых элементов в распластанных ядрах мейоцитов мутантов *sy19* на стадии диплотены. Иммунофлуоресцентное выявление белков ASY1 (зелёный) и ZYP1 (красный): **А** – мейоцит на стадии средней диплотены, **Б, В, Г**– фрагмент того же мейоцита. Хроматин окрашен DAPI (синий). Масштабные отрезки – 5 мкм.

В лаборатории цитогенетики ИОГен РАН, благодаря применению модифицированного метода контрастирования тотальных препаратов СК и исследования их под электронным микроскопом, были получены оригинальные данные об ультраструктуре компонентов СК на заключительных стадиях профазы I мейоза у ржи (Fedotova *et al.*, 1989). Модификация метода состояла в том, что ядра МКП, разрушенных гипотоническим шоком и фиксированных на подложке нейтральным 4% раствором параформальдегида, контрастировали азотнокислым серебром при кислых значениях pH. Это позволило выявить более тонкие детали ультраструктуры СК и их разрушающихся частей, чем при традиционном контрастировании СК азотнокислым серебром при нейтральном pH.

На основании этих исследований была предложена модель демонтажа СК (Fedotova *et al.*, 1989). Согласно этой модели, на стадии диплотены мейоза происходят следующие события.

1. Локальное отталкивание ЛЭ с образованием на них утолщений.
2. Образование небольших петель, которые состоят из материала ЛЭ в области отталкивания ЛЭ и превращение длинных СК в линейную последовательность его коротких сегментов, соединённых тонкими нитями, образующими петли. При этом петли – парны и билатерально симметричны
3. Вытягивание петель и укорочение сегментов СК.
4. Превращение нитей, образующих петли, в складки и спирали электронно-плотной нити, вытягиваемой из латеральных элементов.
5. Образование парных бобовидных утолщений на парных витках спирали.
6. Деграция спиралевидных нитей.

Модель получила подтверждения в последующих исследованиях на мышши *Mus musculus* (Коломиец *и др.*, 2001) и в работах других авторов, которые использовали иные методы изучения мейотических хромосом на других объектах (Stack, 1991; Reed *et al.*, 1992; Rufas *et al.*, 1992). Это описание вошло в монографию (Богданов, Коломиец, 2007). Однако, заключение о том, что в исходной публикации Ю.С. Федотова и соавторы (1989) наблюдали трансформацию именно ЛЭ, а не центрального элемента СК или нитей хроматина, было сделано только на основании данных электронно-микроскопического изучения монохромно окрашенных СК, вызывало дискуссии (О.Л. Коломиец, личное сообщение) и требовало доказательств. Благодаря применению метода иммуноцитохимического выявления ASY1 – специфического белка, ассоциированного с ОЭ/ЛЭ, такие доказательства были получены в нашей работе.

Картина распределения ортолога белка ASY1 в мейоцитах ржи полностью повторяла цитологическую картину ОЭ/ЛЭ при электронно-микроскопическом исследовании в условиях, когда эти элементы СК контрастировали азотнокислым серебром при pH = 3.5. В диплотенных МКП растений ржи дикого типа нам удалось выявить взаимное отталкивание (десинапсис)

латеральных элементов СК (**Рисунок 21, А; Рисунок 22, Б**), спирализацию десинаптировавших ЛЭ (**Рисунок 21, В; Рисунок 22, Г**) и образование парных утолщений (**Рисунок 22, Д**). Все эти структуры иммуноокрашивались антителами к белку ASY1, что является прямым доказательством их происхождения из латеральных элементов СК. Измерив параметры спиралей, выявляемых методом контрастирования серебром при кислом рН и антителами к ASY1, мы убедились, что имеем дело с идентичными структурами. Диаметр спирали в обоих случаях (при электронно-микроскопическом и иммуноцитохимическом исследованиях) составлял от 1 до 2,5 мкм, длина витка спирали – 2-4 мкм, шаг спирали – 0,5-2 мкм.

Нам не удалось увидеть разделения латерального элемента на две нити на стадии средней диплотены при иммуноокрашивании, как это выявляется при ультраструктурном анализе СК под электронным микроскопом (Fedotova *et al.*, 1989). Этому есть возможные объяснения. 1. Одиночные нити состоят из белка ASY1, но в виду меньшей разрешающей способности флуоресцентного микроскопа по сравнению с электронным микроскопом они остались неразличимы для оптики. 2. Одиночные нити состоят из какого-то другого структурного белка и поэтому не выявляются антителами к белку ASY1. И, наконец, возможно еще одно предположение (3): одиночные нити не являются компонентами ЛЭ. Однако структурная принадлежность таких нитей к ЛЭ может быть доказана следующим соображением. Структуры, из которых происходят нити (выпетливающиеся участки параллельно лежащих ЛЭ после их взаимного отталкивания) детектируются антителами к белку ASY1, а значит и освобождающиеся из них одиночные нити также должны являться компонентами ЛЭ, и предположение 3 должно быть отвергнуто. Из двух оставшихся предположений наиболее вероятно первое: флуоресцентный микроскоп не позволяет выявить такое расслоение нитей состоящих из белка ASY1, какое выявляется с помощью электронного микроскопа.

У мейотических мутантов *su9* с помощью электронно-микроскопического анализа СК обнаруживается спирализация ОЭ (**Рисунок 24, В**). При иммуноцитохимическом выявлении белка ASY1, мы увидели ту же картину поведения ОЭ. Процесс спирализации ОЭ (**Рисунок 24, Г**) в диплотене мутантов *su9* выражен сильнее, чем спирализация остатков ЛЭ в норме. Это является отличительной особенностью мутации *su9*, и, судя по всему, связано с её асинаптическим характером. Не исключено, что именно нарушение укладки сжатой спирали в структуре латерального элемента СК на стадиях зиготены-пахитены отсутствует у мутантов *su9*. Параметры спирали белковых структур у мутантов *su9* соответствуют параметрам, обнаруженным на стадии диплотены у нормальных растений. Это даёт нам основание говорить о том, что процессы демонтажа ОЭ/ЛЭ у асинаптических мутантов *su9* и у нормальных

растений протекают идентичным образом. В свою очередь, это свидетельствует о независимом от ЦЭ механизме разборки ЛЭ.

Окрашивание препаратов DAPI показало, что спирализованные структуры по своей природе не имеют отношения к хроматину и ДНК (**Рисунки 22 и 24**): DAPI окрашивает хроматин диффузно, а спирали выявляются антителами к ASY1. Такая картина была характерна для всех МКП как нормальных растений, так и мутантов *sy9*.

Таким образом, мы провели сравнительный иммуоцитохимический анализ распределения ортолога белка AtASY1 в МКП растений ржи с нормальным мейозом и у асинаптических мутантов *sy9* на стадии диплотены профазы I мейоза. Обнаружив картины, полностью соответствующие описанным ранее при электронно-микроскопическом исследовании СК, мы установили, что именно компоненты ЛЭ формируют латеральные петли («выпетливаются» из СК) и впоследствии образуют спирали в кариоплазме диплотенных МКП. Это важное заключение является первым выводом данного раздела нашей работы.

Кроме того, что мы усовершенствовали знания о диплотене у растений ржи дикого типа и у мутантов *sy9*, на основе анализа которых была предложена модель Федотовой и соавторов (1989), мы получили оригинальные данные о преобразовании хромосомных осей в диплотене у мутантов *sy11*, *sy1* и *sy19*. В **Таблице 23** представлены результаты анализа стадии диплотены у изученных в нашей работе форм ржи.

Диплотена у мутантов *sy11* одновременно схожа и с диплотеной у растений ржи дикого типа, и с диплотеной у мутантов *sy9*. Трансформация синаптированных на момент пахитены хромосомных осей происходит по сценарию дикого типа: десинапсис ЛЭ, выпетливание компонентов ЛЭ и их спирализация. Трансформация неспаренных ОЭ происходит аналогично мутантам *sy9* – наблюдается постепенная их спирализация. Можно сказать, что мутанты *sy11* являются связующим звеном между диким типом и мутантами *sy9* в развиваемой нами модели преобразования осей мейотических хромосом.

Таким образом, для растений дикого типа и мутантов *sy9* и *sy11* характерна спирализация компонентов белковых осей хромосом в диплотене. Ранее подобная цитологическая картина была также описана у мутантов *sy3* с незавершённым синапсисом гомологов в пахитене (Fedotova *et al.*, 1989). Поскольку такая особенность диплотены характерна в том числе и для растений дикого типа с нормальным мейозом, и поскольку у растений дикого типа и у мутантов *sy9*, *sy11* и *sy3* диплотена принципиально не отличается, мы считаем, что описанные выше преобразования являются естественными (“нормальными”) для осей мейотических хромосом ржи. В отличие от перечисленных выше форм ржи у мутантов *sy1* и *sy19* выявляется постепенная фрагментация ОЭ до полного их исчезновения. Следов спирализации белковых осей не выявляется. Мы зафиксировали фрагментацию ОЭ у этих

мутантов в ходе иммунофлуоресцентного выявления белков ASY1 и ZYP1 на хромосомных осях. Ранее, Ю.С. Федотова также отмечала фрагментацию ОЭ у мутантов *sy1* в диплотене в ходе электронно-микроскопических исследований (Федотова, 1988). Е.И. Михайлова наблюдала фрагментацию ОЭ в диплотене у мутантов *sy1* при иммуноокрашивании ОЭ антителами к белку ASY1 (Михайлова, 2011). Подробного анализа диплотены у мутантов *sy1* в работах Ю.С. Федотовой и Е.И. Михайловой проведено не было. Однако о фрагментации (а не спирализации) ОЭ у мутантов *sy1*, в итоге, сообщается в трёх независимых работах, и, очевидно, что этот факт достоверен. Диплотена у мутантов *sy19* ранее не была описана.

Таблица 23. Сравнительный цитологический анализ стадии диплотены у растений ржи дикого типа и мутантов *sy11*, *sy9*, *sy1* и *sy19*

	Пахитена	Ранняя диплотена	Средняя диплотена	Поздняя диплотена
Дикий тип	СК	Локальное отталкивание ЛЭ	Выпетливание ЛЭ; спирализация ЛЭ и их компонентов; спирализация фрагментов СК	Парные утолщения на остатках ЛЭ
<i>sy11</i>	СК (в т.ч. переключения и складки), неспаренные ОЭ	Локальное отталкивание ЛЭ, начало спирализации неспаренных ОЭ	– // –	<i>Стадия не исследована</i>
<i>sy9</i>	Неспаренные ОЭ, единичные фрагменты СК	Начало спирализации ОЭ	Спирализация ОЭ	Неспаренные утолщения на остатках ОЭ
<i>sy1</i>	Неспаренные ОЭ	Фрагментация ОЭ		
<i>sy19</i>	Неспаренные ОЭ, СК (в т.ч. переключения и складки)	Фрагментация ОЭ		

Наблюдаемая в диплотене фрагментация ОЭ у мутантов *sy1* и *sy19* может говорить о другом составе (по сравнению с диким типом) белковых осей хромосом в их мейоцитах. Возможно, нехватка именно таких компонентов обуславливают цитологический фенотип этих мутантов в пахитене: асинапсис у мутантов *sy1* и индискриминантный синапсис у *sy19*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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*. Наше исследование было сфокусировано на изучении особенностей строения и динамики функционирования синаптонемных комплексов у этих мейотических мутантов по сравнению с растениями дикого типа. В **Таблице 24** представлена сводная информация об основных изученных в нашей работе характеристиках растений ржи дикого типа и мейотических мутантов.

Таблица 24. Краткая характеристика изученных в работе форм ржи

Форма ржи	Присутствие белков в структуре мейотических хромосом		Характер синапсиса в пахитене	Поведение хромосомных осей в диплотене	Среднее число унивалентов на мейоцит в метафазе I, шт.
	ASY1	ZYP1			
Дикий тип	+	+	Полный синапсис	Спирализация	$0,1 \pm 0,03^1$
<i>sy11</i>	Нет данных		Гетерологичный синапсис	Спирализация	$1,1 \pm 0,01$
<i>sy9</i>	±	Нет данных	Асинапсис	Спирализация (ярко выраженная)	$13,21 \pm 0,096$
<i>sy1</i>	+	+	Полный асинапсис	Фрагментация	$13,98 \pm 0,016$
<i>sy19</i>	+	+	Гетерологичный синапсис	Фрагментация	$13,49 \pm 0,254$

¹ – Средняя величина по растениям дикого типа из линии Мс11 (**Раздел 3.1.2**).

Мы впервые изучили проявление мутации *sy11*. В результате электронно-микроскопического анализа синаптонемных комплексов в мейоцитах мутантов *sy11* нами был

обнаружен гетерологичный синапсис хромосом: наблюдалось как гомологичное, так и негомологичное спаривание хромосом. Результатом таких нарушений было снижение уровня хиазмообразования (в 1,5 раза по сравнению с нормой), широкий спектр аномалий в первом и втором делениях мейоза и, как следствие, пониженная способность завязывать семена (в 5 раз по сравнению с нормой). Мутация *sy11* является восьмой по времени описания мутацией ржи с гетерологичным синапсисом хромосом, при этом она оказалась самой слабой (по силе проявления нарушений) из них. Мутации гетерологичного (негомологичного, индискриминантного) синапсиса являются самым многочисленным типом мутаций среди известных синаптических мутаций у кукурузы и ржи (Cande *et al.*, 2009; Sosnikhina *et al.*, 2005). Мутации гетерологичного синапсиса (наряду с мутациями других типов) 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 и гетерологичный синапсис. Гетерологичный синапсис хромосом был обнаружен у мутантов *rad51* и *dmc1* арабидопсиса и кукурузы. Таким образом, 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 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 (в отличие от большинства других мутаций гетерологичного синапсиса ржи и других растений). Первичный дефект мутации *sy11*, как и других мутаций гетерологичного синапсиса ржи, остаётся неизвестным.

С целью приблизиться к пониманию первичных дефектов, вызываемых другой мутацией гетерологичного синапсиса *sy19* и асинаптической мутацией *sy1*, мы использовали иммунофлуоресцентный подход 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. 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* 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.

Изучение совместного распределения белков ASY1 и ZYP1 является неотъемлемой частью прогрессивных исследований мейоза у растений. Распределение этих белков ранее было изучено у растений дикого типа и ряда мейотических мутантов кукурузы, арабидопсиса, риса, пшеницы, ячменя. Наше исследование является вторым успешным подобным исследованием для ржи. Ранее совместное распределение белков ASY1 и ZYP1 было изучено у растений ржи с нормальным мейозом и у мутантов *sy10* (Михайлова *и др.*, 2010; Mikhailova *et al.*, 2006). В нашей работе мы получили данные, которые хорошо согласуются с этим исследованием и подтверждают предложенную модель загрузки двух белков на оси мейотических хромосом ржи, обогащая её данными по мутантам *sy1* и *sy19*. В отличие от других растений, у которых загрузка ZYP1 происходит в спаренные участки мейотических бивалентов, у ржи присутствие линейных сигналов ZYP1 уже в лептотене-зиготене свидетельствуют о загрузке этого белка накануне процессов спаривания. Кроме того, мы пришли к выводу, что наличие белков ASY1 и ZYP1 не является достаточным фактором для успешного осуществления синапсиса: оба белка присутствуют на осевых элементах хромосом мутантов *sy10*, *sy1* и *sy19*, но синапсис у этих мутантов отсутствует (асинапсис у *sy1*), либо сильно нарушен (гетерологичный синапсис у *sy10* и *sy19*).

Загрузка белка ASY1 нарушена у другой изученной в нашей работе формы ржи – у 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; Ловцос *и др.*, 2009). Результатом их исследования было заключение о нарушенной загрузке белка ASY1 на оси мейотических хромосом мутантов *sy9*. В предыдущих исследованиях сообщалось также о полном асинапсисе хромосом в мейоцитах мутантов *sy9* (Федотова *и др.*, 1988; Соснихина *и др.*, 1998). В нашей работе мы получили подтверждение заключения о нехватке белка ASY1 у мутантов *sy9*. Таким образом, дефицит ASY1 на хромосомных осях – наиболее ранний из известных на данный момент дефектов, вызываемых мутацией *sy9*. Однако сила проявления мутации варьировала 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 (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 трети 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. Во-вторых, мы провели сравнительный анализ стадии диплотены у мейотических мутантов и выявили 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.

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, отвечает за структурирование хроматина и взаимодействие с другими белками у дрожжей, животных и растений (Rosenberg, Corbett, 2015; Muniyappa *et al.*, 2014). Подтверждением нашего предположения является факт того, что выявляемые с помощью FISH-зондов прицентромерные районы хромосом мутантов *sy9* при вступлении в мейоз приобретают деконденсированный вид (Mikhailova *et al.*, 2001). 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 большое число 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 наблюдается 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 СОКРАЩЕНИЙ

AI – анафаза I

КО (COs – crossovers) – кроссоверные продукты рекомбинации

НКО (NCOs – non-crossovers) – некроссоверные продукты рекомбинации

ЛЭ – латеральные элементы синаптонемного комплекса

MI – метафаза I

МКП – материнские клетки пыльцы

ОЭ – осевые элементы хромосом

п.н. – пары нуклеотидов

ПФ – поперечные филаменты синаптонемного комплекса

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СК – синаптонемный комплекс

СХ – сестринские хроматиды

ЦЭ – центральный элемент

DSB(s) (double-strand breaks) – двунитевые разрывы ДНК

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

dHJ (double Holliday junction) – двойная структура Холлидея

FISH (fluorescence in situ hybridization) - флуоресцентная гибридизация *in situ*

FITC (fluorescein isothiocyanate) – флуоресцеин изотиоцианат

SSR(s) (simple sequence repeats) – простые единичные повторы ДНК

PBS (phosphate buffered saline) – фосфатно-солевой буфер

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богданов, Ю. Ф. Цитогенетические закономерности синапсиса мейотических хромосом у животных и растений / Ю. Ф. Богданов, Т. М. Гришаева, О. Л. Коломиец, Ю. С. Федотова // Генетика – 1996. – Т. 32. – № 11. – С. 1474–1463.
2. Богданов, Ю.Ф. Новый тип аномалий мейоза – перегородки в синаптонемных комплексах у растений инбредной линии Ms6 ржи *Secale cereale* L. / Ю. Ф. Богданов, Ю. С. Федотова, С. П. Соснихина, В. Г. Смирнов, С. Я. Дадашев, Е. И. Михайлова, Я. Х. де Йонг // Генетика – 1997. – Т. 33 – № 9. – С. 1236–1243.
3. Богданов, Ю. Ф. Изменчивость и эволюция мейоза / Ю. Ф. Богданов // Генетика – 2003. – Т. 39. – № 4. – С. 453–473.
4. Богданов, Ю. Ф. Синаптонемный комплекс – индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом / Ю. Ф. Богданов, О. Л. Коломиец – М.: КМК, 2007.– 358с.
5. Гаджиева, С. А. Цитогенетический анализ семей ржи с выщепляющимися мейотическими мутантами: дис. ... канд. биол. наук / С. А. Гаджиева – М., 1992.
6. 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.
7. Гришаева, Т. М. Компьютерный поиск и анализ белков синаптонемного комплекса у нематоды *Caenorhabditis elegans* / Т. М. Гришаева, С. Я. Дадашев, Ю. Ф. Богданов // Биомедицинская химия – 2004. – Т. 50.
8. Долматович Т.В. Картирование мейотических генов ржи (*Secale cereale* L.): локализация мутации *sy19*, нарушающей гомологичный синапсис, с помощью изозимных и микросателлитных маркеров / Т. В. Долматович, С. В. Малышев, С. П. Соснихина, Н. В. Цветкова, Н. А. Картель, А. В. Войлоков // Генетика – 2013а. – Т. 49. – № 5. – С. 595–601.
9. Долматович, Т. В. Картирование мейотических генов ржи (*Secale cereale* L.): локализация мутации *sy18*, нарушающей гомологичность синапсиса, с использованием микросателлитных маркеров / Т. В. Долматович, С. В. Малышев, С. П. Соснихина, Н. В. Цветкова, Н. А. Картель, А. В. Войлоков // Генетика – 2013б. – Т. 49. – № 4. – С. 472–478.
10. Коломиец, О.Л. Естественная деградация синаптонемных комплексов на стадии диплотены мейоза позволяет анализировать организацию его ультраструктурных компонентов / О. Л. Коломиец, Ю. С. Федотова, Ю. Ф. Богданов // Биологические мембраны – 2001. – Т. 18. – № 3. – С. 230–249.
11. Ловцюс, А. В. Получение двойных мутантов по синаптическим генам *sy1* и *sy9* у ржи и их изучение методами молекулярной цитогенетики / А. В. Ловцюс, Т. В. Долматович, Е.

И. Михайлова, С. В. Малышев, А. В. Войлоков, С. П. Соснихина // Вестник Санкт-Петербургского Университета – 2009. – Т. 3. – № 4. – С. 47–56.

12. Малышев, С.В. Молекулярно-генетическое картирование асинаптических генов *sy1* и *sy9* ржи (*Secale cereale* L.) с использованием микросателлитных и изозимных маркеров / С. В. Малышев, Т. В. Долматович, А. В. Войлоков, С. П. Соснихина, Н. В. Цветкова, А. В. Ловцюс, Н. А. Картель // Генетика – 2009. – Т. 45. – № 12. – С. 1634–1640.

13. Михайлова, Е. И. Некоторые особенности реализации ключевых событий мейоза у ржи и ее синаптических мутантов / Е. И. Михайлова, А. В. Ловцюс, С. П. Соснихина // Генетика – 2010. – Т. 46. – № 10. – С. 1371–1375.

14. Михайлова, Е. И. Молекулярно-цитогенетический анализ ключевых событий мейоза у ржи *Secale cereale* L. : дис. ... д-ра. биол. наук : 03.02.07 / Михайлова Елена Игоревна – СПб., 2011. – 288 с.

15. Михайлова, Е. И. Поиск мейоз-специфичных белков у ржи *Secale cereale* L. и мутантов “Петергофской” генетической коллекции / Е. И. Михайлова, А. В. Толкачева, А. Л. Мальцева, К. В. Волков, А. А. Нижников, П. А. Зыкин // Материалы международной конференции “Хромосома 2015”, 24-28 августа 2015 г. – Новосибирск, 2015.

16. Паушева, З. П. Практикум по цитологии растений / З. П. Паушева – М.: Агропромиздат, 1988.

17. Пухальский, В. А. Практикум по цитологии и цитогенетике растений / В. А. Пухальский, А. А. Соловьёв, Е. Д. Бадаева, В. Н. Юрцев – М.: КолосС, 2007.– 198 с.

18. 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. 1250–1254.

19. Соснихина, С. П. Изучение генетического контроля мейоза у ржи / С. П. Соснихина, Ю. С. Федотова, В. Г. Смирнов, Е. И. Михайлова, Ю. Ф. Богданов // Генетика – 1994. – Т. 30. – № 8. – С. 1043–1056.

20. Соснихина, С. П. Мутация частичного асинапсиса у ржи / С. П. Соснихина, Е. И. Михайлова, В. Г. Смирнов, Л. Ф. Егорова // Генетика – 1992. – Т. 28. – № 3. – С. 128–136.

21. Соснихина, С. П. Рecessивная мутация *mei10* у ржи, нарушающая мейотический цикл / С. П. Соснихина, Г. А. Кириллова, Н. Н. Чакова, Е. И. Михайлова, В. Г. Смирнов // Генетика – 1996. – Т. 32. – № 9. – С. 1248–1255.

22. Соснихина, С. П. Генетический контроль синапсиса у ржи *Secale cereale* L.: асинаптический ген *sy9* / С. П. Соснихина, Г. А. Кириллова, Е. И. Михайлова, В. Г. Смирнов, Ю. С. Федотова, Ю. Ф. Богданов // Генетика – 1998. – Т. 34. – № 1. – С. 1504–1512.

23. Соснихина, С. П. Генетический контроль синапсиса хромосом у ржи *Secale cereale* L.: ген *sy19*, вызывающий гетерологичный синапсис / С. П. Соснихина, Г. А. Кириллова, Е. И. Михайлова, О. А. Тихолиз, В. Г. Смирнов, Ю. С. Федотова, О. Л. Коломиец, Ю. Ф. Богданов // Генетика – 2001. – Т. 37. – № 1. – С. 81–90.
24. Соснихина, С. П. Проявление мутации *sy2*, вызывающей негомологичный синапсис в мейозе у диплоидной ржи *Secale cereale* L. / С. П. Соснихина, Г. А. Кириллова, О. А. Тихолиз, Е. И. Михайлова, С. Н. Прияткина, В. Г. Смирнов // Генетика – 2002. – Т. 38. – № 2. – С. 216–226.
25. Соснихина, С. П. Нарушение конденсации мейотических хромосом, вызываемое мутацией *mei8* у ржи *Secale cereale* L. / С. П. Соснихина, Г. А. Кириллова, Е. И. Михайлова, О. А. Тихолиз, В. Г. Смирнов, Н. С. Немцова // Генетика – 2003а. – Т. 39. – № 3. – С. 362–369.
26. Соснихина, С. П. Изучение совместного наследования мутаций, нарушающих структуру мейотических хромосом у ржи *Secale cereale* L. / С. П. Соснихина, Г. А. Кириллова, С. Н. Прияткина, Е. И. Михайлова, О. А. Тихолиз, В. Г. Смирнов // Генетика – 2003б. – Т. 39 – № 6 – 783–790с.
27. Соснихина, С. П. Генетический анализ наследования мутаций *mei8*, *sy1* и *sy10*, нарушающих правильный ход мейоза у ржи *Secale cereale* L. / С. П. Соснихина, Г. А. Кириллова, С. Н. Прияткина, О. А. Тихолиз, Е. И. Михайлова, В. Г. Смирнов // Генетика – 2003в. – Т. 39. – № 6. – С. 775–782.
28. Соснихина, С. П. Генетическая коллекция мейотических мутантов ржи *Secale cereale* L. / С. П. Соснихина, Е. И. Михайлова, О. А. Тихолиз, С. Н. Прияткина, В. Г. Смирнов, А. В. Войлоков, Ю. С. Федотова, О. Л. Коломиец, Ю. Ф. Богданов // Генетика – 2005. – Т. 41. – № 10. – С. 1310–1321.
29. Соснихина, С. П. Проявление и наследование десинаптической формы ржи с нарушением гомологичности синапсиса / С. П. Соснихина, Е. И. Михайлова, О. А. Тихолиз, Н. В. Цветкова, А. В. Ловцюс, О. С. Сапронова, Ю. С. Федотова, О. Л. Коломиец, Ю. Ф. Богданов // Генетика – 2007. – Т. 43. – № 10. – С. 1424–1433.
30. Соснихина, С. П. Нарушение гомологичности синапсиса хромосом в мейозе у ржи *Secale cereale* L., вызываемое рецессивной мутацией гена *sy18* / С. П. Соснихина, Е. И. Михайлова, Н. В. Цветкова, А. В. Войлоков, А. В. Ловцюс, И. В. Иорданская, О. Л. Коломиец, Ю. Ф. Богданов // Генетика – 2009. – Т. 45. – № 11. – С. 1565–1574.
31. Федотова, Ю. С. Цитогенетический анализ профазы I мейоза у синаптических мутантов ржи : дис. ... канд. биол. наук / Федотова Юлия Сергеевна – М., 1988.
32. Федотова, Ю. С. Ультраструктурный анализ профазы I мейоза у десинаптического мутанта *sy3* / Ю. С. Федотова, О. Л. Коломиец, Ю. Ф. Богданов // Генетика – 1992. – Т. 28. – №

3. – С. 120–127.

33. Федотова, Ю. С. Проявление на ультраструктурном уровне мейотической мутации *mei10*, “компактные хромосомы” у растений ржи / Ю. С. Федотова, С. А. Гаджиева, Ю. Ф. Богданов // Доклады АН СССР – 1995. – Т. 243. – № 4. – С. 570–572.

34. Шамина, Н. В. Нарушение структуры веретена деления у мутации *mei10* в мужском мейозе у ржи / Н. В. Шамина, Я. С. Рузанкина, С. П. Соснихина // Цитология – 1994. – Т. 36. – № 2. – С. 189–193.

35. Sym, M. ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis / M. Sym, J. Engebrecht, G. S. Roeder // Cell – 1993. – V. 72. – № 3. – P. 365–378.

36. Jones, G. H. Meiotic chromosome synapsis and recombination in *Arabidopsis thaliana*; an integration of cytological and molecular approaches / G. H. Jones, S. J. Armstrong, A. P. Caryl, F. C. H. Franklin // Chromosom. Res. – 2003. – V. 11. – № 3. – P. 205–215.

37. Heckmann, S. Alternative meiotic chromatid segregation in the holocentric plant *Luzula elegans* / S. Heckmann, M. Jankowska, V. Schubert, K. Kumke, W. Ma, A. Houben // Nat. Commun. – 2014. – V. 5.

38. Agashe, B. Identification and analysis of *DYAD*: a gene required for meiotic chromosome organisation and female meiotic progression in *Arabidopsis*. / B. Agashe, C. K. Prasad, I. Siddiqi // Development – 2002. – V. 129. – № 16. – P. 3935–3943.

39. Stack, S. M. A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles / S. M. Stack, L. K. Anderson // Chromosom. Res. – 2001. – V. 9. – № 3. – P. 175–198.

40. Anderson, L. K. Recombination nodules in plants. / L. K. Anderson, S. M. Stack // Cytogenet. Genome Res. – 2005. – V. 109. – № 1-3. – P. 198–204.

41. Anderson, L. K. Combined fluorescent and electron microscopic imaging unveils the specific properties of two classes of meiotic crossovers. / L. K. Anderson, L. D. Lohmiller, X. Tang, D. B. Hammond, L. Javernick, L. Shearer, S. Basu-Roy, O. C. Martin, M. Falque // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2014. – V. 111. – № 37. – P. 13415–13420.

42. Armstrong, S. J. Asy1, a protein required for meiotic chromosome synapsis, localizes to axis-associated chromatin in *Arabidopsis* and *Brassica* / S. J. Armstrong, A. P. Caryl, G. H. Jones, F. C. H. Franklin // J. Cell Sci. – 2002. – V. 115. – № 18. – P. 3645–3655.

43. Armstrong, S. J. A meiotic time-course for *Arabidopsis thaliana* / S. J. Armstrong, F. C. H. Franklin, G. H. Jones // Sex. Plant Reprod. – 2003. – V. 16. – № 3. – P. 141–149.

44. Azumi, Y. Homolog interaction during meiotic prophase I in *Arabidopsis* requires the *SOLO DANCERS* gene encoding a novel cyclin-like protein / Y. Azumi, D. Liu, D. Zhao, W. Li, G. Wang, Y. Hu, H. Ma // EMBO J. – 2002. – V. 21. – № 12. – P. 3081–3095.

45. Bai, X. Isolation and characterization of *SYN1*, a *RAD21*-like gene essential for meiosis

in Arabidopsis. / X. Bai, B. N. Peirson, F. Dong, C. Xue, C. A. Makaroff // Plant Cell – 1999. – V. 11. – № 3. – P. 417–30.

46. Barakate, A. The synaptonemal complex protein ZYP1 is required for imposition of meiotic crossovers in barley / A. Barakate, J. D. Higgins, S. Vivera, J. Stephens, R. M. Perry, L. Ramsay, I. Colas, H. Oakey, R. Waugh, F. C. H. Franklin, S. J. Armstrong, C. Halpin // Plant Cell – 2014. – V. 26. – № 2. – P. 729–740.

47. Bass, H. W. The *desynaptic (dy)* and *desynaptic1 (dsy1)* mutations in maize (*Zea mays* L.) cause distinct telomere-misplacement phenotypes during meiotic prophase / H. W. Bass, S. J. Bordoli, E. M. Foss // J. Exp. Bot. – 2003. – V. 54. – № 380. – P. 39–46.

48. Berchowitz, L. E. The role of *AtMUS81* in interference-insensitive crossovers in *A. thaliana* / L. E. Berchowitz, K. E. Francis, A. L. Bey, G. P. Copenhaver // PLoS Genet. – 2007. – V. 3. – № 8.

49. Bernatzky, R. Genetics of actin-related sequences in tomato / R. Bernatzky, S. D. Tanksley // Theor. Appl. Genet. – 1986. – V. 72. – № 3. – P. 314–21.

50. Bhatt, A. M. Plant meiosis: the means to 1N. / A. M. Bhatt, C. Canales, H. G. Dickinson // Trends Plant Sci. – 2001. – V. 6. – № 3. – P. 114–21.

51. Bleuyard, J. – Y. Meiotic defects in the Arabidopsis *rad50* mutant point to conservation of the MRX complex function in early stages of meiotic recombination. / J. – Y. Bleuyard, M. E. Gallego, C. I. White // Chromosoma – 2004. – V. 113. – № 4. – P. 197–203.

52. Boden, S. A. Expression and functional analysis of *TaASY1* during meiosis of bread wheat (*Triticum aestivum*) / S. A. Boden, N. Shadiac, E. J. Tucker, P. Langridge, J. A. Able // BMC Mol. Biol. – 2007. – V. 8.

53. Boden, S. A. *TaASY1* promotes homologous chromosome interactions and is affected by deletion of *Ph1* / S. A. Boden, P. Langridge, G. Spangenberg, J. A. Able // Plant J. – 2009. – V. 57. – P. 487–497.

54. Bogdanov, Y. F. Bar- and thorn-like abnormalities in synaptonemal complex of a mutant rye / Y. F. Bogdanov, Y. S. Fedotova, S. P. Sosnikhina, V. G. Smirnov, S. Y. Dadashev, E. I. Mikhailova, J. H. de Jong // Genome – 1998. – V. 41 – № 2. – P. 284–288.

55. Borde, V. The multiple roles of the Mre11 complex for meiotic recombination. / V. Borde // Chromosome Res. – 2007. – V. 15. – № 5. – P. 551–63.

56. Börner, G. V. Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis / G. V. Börner, N. Kleckner, N. Hunter // Cell – 2004. – V. 117 – № 1. – P. 29–45.

57. Cai, X. The Arabidopsis SYN1 cohesin protein is required for sister chromatid arm cohesion and homologous chromosome pairing. / X. Cai, F. Dong, R. E. Edelman, C. A. Makaroff //

J. Cell Sci. – 2003. – V. 116. – P. 2999–3007.

58. Canales, C. EXS, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in Arabidopsis / C. Canales, A. M. Bhatt, R. Scott, H. Dickinson // Curr. Biol. – 2002. – V. 12 – № 20. – P. 1718–1727.

59. Cande, W. Z. Meiotic Genes and Meiosis in Maize. In: Handbook of maize / W. Z. Cande, I. Golubovskaya, C. J. R. Wang, L. Harper // New York: Springer, 2009. – P. 353–375.

60. Caryl, A. P. A homologue of the yeast HOP1 gene is inactivated in the Arabidopsis meiotic mutant *asy1* / A. P. Caryl, S. J. Armstrong, G. H. Jones, F. C. Franklin // Chromosoma – 2000. – V. 109. – № 1-2. – P. 62–71.

61. Chelysheva, L. *AtREC8* and *AtSCC3* are essential to the monopolar orientation of the kinetochores during meiosis / L. Chelysheva, S. Diallo, D. Vezon, G. Gendrot, N. Vrielynck, K. Belcram, N. Rocques, A. Márquez-Lema, A. M. Bhatt, C. Horlow, R. Mercier, C. Mezard, M. Grelon // J. Cell Sci. – 2005. – V. 118. – № 20. – P. 4621–4632.

62. Copenhaver, G. P. Crossover interference in Arabidopsis. / G. P. Copenhaver, E. A. Housworth, F. W. Stahl // Genetics – 2002. – V. 160. – № 4. – P. 1631–1639.

63. Couteau, F. Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a *dmc1* mutant of Arabidopsis. / F. Couteau, F. Belzile, C. Horlow, O. Grandjean, D. Vezon, M. P. Doutriaux // Plant Cell – 1999. – V. 11. – № 9. – P. 1623–34.

64. Cromer, L. Centromeric cohesion is protected twice at meiosis, by SHUGOSHINs at anaphase I and by PATRONUS at interkinesis. / L. Cromer, S. Jolivet, C. Horlow, L. Chelysheva, J. Heyman, G. De Jaeger, C. Koncz, L. De Veylder, R. Mercier // Curr. Biol. – 2013. – V. 23. – № 21. – P. 2090–2099.

65. Dirks, R. Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis. / R. Dirks, K. van Dun, C. B. de Snoo, M. van den Berg, C. L. C. Lelivelt, W. Voermans, L. Woudenberg, J. P. C. de Wit, K. Reinink, J. W. Schut, E. van der Zeeuw, A. Vogelaar, G. Freymark, E. W. Gutteling, M. N. Keppel, P. van Drongelen, M. Kieny, P. Ellul, A. Touraev, H. Ma, H. de Jong, E. Wijnker // Plant Biotechnol. J. – 2009. – V. 7. – № 9. – P. 837–45.

66. Fawcett, D. W. The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. / D. W. Fawcett // J. Biophys. Biochem. Cytol. – 1956. – V. 2. – № 4. – P. 403–406.

67. Fedotova, Y. S. Synaptonemal complex transformations in rye microsporocytes at the diplotene stage of meiosis / Y. S. Fedotova, O. L. Kolomiets, Y. F. Bogdanov // Genome – 1989. – V. 32 – P. 816–823.

68. Fedotova, Y. S. Meiotic mutants of rye *Secale cereale* L. II. The nonhomologous synapsis in desynaptic mutants *sy7* and *sy10* / Y. S. Fedotova, Y. F. Bogdanov, S. A. Gadzhiev, S. A. Sosnikhina, V. G. Smirnov, E. I. Mikhailova // Theor. Appl. Genet. – 1994. – V. 88. – № 8. – P.

1029–1036.

69. Feng, X. Packaging the male germline in plants. / X. Feng, H. G. Dickinson // Trends Genet. – 2007. – V. 23. – № 10. – P. 503–10.
70. Franklin, A. E. Three-dimensional microscopy of the Rad51 recombination protein during meiotic prophase. / A. E. Franklin, J. McElver, I. Sunjevaric, R. Rothstein, B. Bowen, W. Z. Cande // Plant Cell – 1999. – V. 11. – № 5. – P. 809–24.
71. Gillies, C. B. Electron Microscopy of Spread Maize Pachytene Synaptonemal Complexes / C. B. Gillies // Chromosoma – 1981. – V. 83. – P. 575–591.
72. Gillies, C. B. An electron microscopic study of synaptonemal complex formation at zygotene in rye / C. B. Gillies // Chromosoma – 1985. – V. 92 – P. 165–175.
73. Glover, J. Cloning and characterization of *MS5* from Arabidopsis: a gene critical in male meiosis. / J. Glover, M. Grelon, S. Craig, A. Chaudhury, E. Dennis // Plant J. – 1998. – V. 15. – № 3. – P. 345–56.
74. Golubovskaya, I. N. Genetic control of meiosis. / I. N. Golubovskaya // Int. Rev. Cytol. – 1979. – V. 58 – P. 247–290.
75. Golubovskaya, I. New insights into the role of the maize *ameiotic1* locus. / I. Golubovskaya, N. Avalkina, W. F. Sheridan // Genetics – 1997a. – V. 147. – № 3. – P. 1339–50.
76. Golubovskaya, I. N. The Maize *desynaptic1* Mutation Disrupts Meiotic Chromosome Synapsis / I. N. Golubovskaya, Z. K. Grebennikova, D. L. Auger, W. F. Sheridan // Dev. Genet. – 1997b. – V. 21. – № 2, – P. 146–159.
77. Golubovskaya, I. N. The *pam1* Gene Is Required for Meiotic Bouquet Formation and Efficient Homologous Synapsis in Maize (*Zea mays* L.) / I. N. Golubovskaya, L. C. Harper, W. P. Pawlowski, D. Schichnes, W. Z. Cande // Genetics – 2002. – V. 162. – P. 1979–1993.
78. Golubovskaya, I. N. Alleles of *afd1* dissect REC8 functions during meiotic prophase I. / I. N. Golubovskaya, O. Hamant, L. Timofejeva, C. – J. R. Wang, D. Braun, R. Meeley, W. Z. Cande // J. Cell Sci. – 2006. – V. 119. – P. 3306–3315.
79. Golubovskaya, I. N. Maize meiotic mutants with improper or non-homologous synapsis due to problems in pairing or synaptonemal complex formation / I. N. Golubovskaya, C. J. R. Wang, L. Timofejeva, W. Z. Cande // J. Exp. Bot. – 2011. – V. 62. – № 5. – P. 1533–1544.
80. Grelon, M. *AtSPO11-1* is necessary for efficient meiotic recombination in plants / M. Grelon, D. Vezon, G. Gendrot, G. Pelletier // EMBO J. – 2001. – V. 20. – № 3. – P. 589–600.
81. Haering, C. H. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex / C. H. Haering, J. Löwe, A. Hochwagen, K. Nasmyth // Mol. Cell – 2002. – V. 9. – № 4. – P. 773–88.
82. Hamant, O. A REC8-dependent plant Shugoshin is required for maintenance of centromeric cohesion during meiosis and has no mitotic functions. / O. Hamant, I. Golubovskaya, R.

Meeley, E. Fiume, L. Timofejeva, A. Schleiffer, K. Nasmyth, W. Z. Cande // *Curr. Biol.* – 2005. – V. 15. – № 10. – P. 948–54.

83. Hamant, O. Genetics of meiotic prophase I in plants / O. Hamant, H. Ma, W. Z. Cande // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2006. – V. 57. – P. 267–302.

84. Hamer, G. Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. / G. Hamer, K. Gell, A. Kouznetsova, I. Novak, R. Benavente, C. Höög // *J. Cell Sci.* – 2006. – V. 119. – P. 4025–4032.

85. Handel, M. A. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. / M. A. Handel, J. C. Schimenti // *Nat. Rev. Genet.* – 2010. – V. 11. – № 2. – P. 124–36.

86. Hartung, F. Molecular characterisation of two paralogous SPO11 homologues in *Arabidopsis thaliana* / F. Hartung, H. Puchta // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – V. 28. – № 7. – P. 1548–54.

87. Hartung, F. Molecular characterization of homologues of both subunits A (SPO11) and B of the archaeobacterial topoisomerase 6 in plants. / F. Hartung, H. Puchta // *Gene* – 2001. – V. 271. – № 1. – P. 81–86.

88. Hartung, F. The role of AtMUS81 in DNA repair and its genetic interaction with the helicase AtRecQ4A. / F. Hartung, S. Suer, T. Bergmann, H. Puchta // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – V. 34. – № 16. – P. 4438–48.

89. Havekes, F. W. J. Synapsis and chiasma formation in four meiotic mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum*) / F. W. J. Havekes, J. H. De Jong, C. Heyting, M. S. Ramanna // *Chromosom. Res.* – 1994. – V. 2. – № 4. – P. 315–325.

90. Hawley, R. S. Solving a meiotic LEGO puzzle: Transverse filaments and the assembly of the synaptonemal complex in *Caenorhabditis elegans* / R. S. Hawley // *Genetics* – 2011. – V. 189. – P. 405–409.

91. Higgins, J. D. The Arabidopsis synaptonemal complex protein ZYP1 is required for chromosome synapsis and normal fidelity of crossing over / J. D. Higgins, E. Sanchez-Moran, S. J. Armstrong, G. H. Jones, F. C. H. Franklin // *Genes Dev.* – 2005. – V. 19 – P. 2488–2500.

92. Hirano, T. Condensins: universal organizers of chromosomes with diverse functions. / T. Hirano // *Genes Dev.* – 2012. – V. 26. – № 15. – P. 1659–1678.

93. Hollingsworth, N. M. The *HOP1* gene encodes a meiosis-specific component of yeast chromosomes. / N. M. Hollingsworth, L. Goetsch, B. Byers // *Cell* – 1990. – V. 61. – № 1. – P. 73–84.

94. Holmes, R. J. Small RNAs and RNAi pathways in meiotic prophase I. / R. J. Holmes, P. E. Cohen // *Chromosome Res.* – 2007. – V. 15. – № 5. – P. 653–665.

95. Ishiguro, K. Chromosome cohesion in mitosis and meiosis. / K. Ishiguro, Y. Watanabe // *J. Cell Sci.* – 2007. – V. 120. – P. 367–369.

96. Jenkins, G. Strategies for the study of meiosis in rye. / G. Jenkins, E. I. Mikhailova, T. Langdon, O. A. Tikhoniz, S. P. Sosnikhina, R. N. Jones // *Cytogenet. Genome Res.* – 2005. – V. 109. – P. 221–227.
97. Jenkins, G. Indiscriminate synapsis in achiasmate *Allium fistulosum* L. (Liliaceae) / G. Jenkins, A. Okumus // *J. Cell Sci.* – 1992. – V. 103. – № 2. – P. 415–422.
98. Jolivet, S. Non conservation of the meiotic function of the Ski8/Rec103 homolog in *Arabidopsis* / S. Jolivet, D. Vezon, N. Froger, R. Mercier // *Genes Cells* – 2006. – V. 11. – № 6. – P. 615–622.
99. Kaur, J. The *Arabidopsis-mei2-like* genes play a role in meiosis and vegetative growth in *Arabidopsis* / J. Kaur, J. Sebastian, I. Siddiqi // *Plant Cell* – 2006. – V. 18. – № 3. – P. 545–59.
100. Keeney, S. Mechanism and control of meiotic recombination initiation. / S. Keeney // *Curr. Top. Dev. Biol.* – 2001. – V. 52. – P. 1–53.
101. Kerzendorfer, C. The *Arabidopsis thaliana* MND1 homologue plays a key role in meiotic homologous pairing, synapsis and recombination. / C. Kerzendorfer, J. Vignard, A. Pedrosa-Harand, T. Siwiec, S. Akimcheva, S. Jolivet, R. Sablowski, S. Armstrong, D. Schweizer, R. Mercier, P. Schlögelhofer // *J. Cell Sci.* – 2006. – V. 119. – P. 2486–2496.
102. Khlestkina, E. K. Mapping of 99 new microsatellite-derived loci in rye (*Secale cereale* L.) including 39 expressed sequence tags / E. K. Khlestkina, M. H. M. Than, E. G. Pestsova, M. S. Röder, S. V Malyshev, V. Korzun, A. Börner // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – V. 109. – № 4. – P. 725–732.
103. Khoo, K. H. P. The isolation and characterisation of the wheat molecular ZIPper I homologue, *TaZYP1* / K. H. P. Khoo, A. J. Able, J. a Able // *BMC Res. Notes* – 2012. – V. 5.
104. Li, J. Functional analysis of maize *RAD51* in meiosis and double-strand break repair. / J. Li, L. C. Harper, I. Golubovskaya, C. R. Wang, D. Weber, R. B. Meeley, J. McElver, B. Bowen, W. Z. Cande, P. S. Schnable // *Genetics* – 2007. – V. 176. – № 3. – P. 1469–82.
105. Li, W. The *Arabidopsis AtRAD51* gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis / W. Li, C. Chen, U. Markmann-Mulisch, L. Timofejeva, E. Schmelzer, H. Ma, B. Reiss // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2004. – V. 101. – № 29. – P. 10596–10601.
106. Loidl, J. The initiation of meiotic chromosome pairing: the cytological view. / J. Loidl // *Genome* – 1990. – V. 33. – № 6. – P. 759–778.
107. Luo, Q. Ten Years of Gene Discovery for Meiotic Event Control in Rice // *J. Genet. Genomics.* – 2014. – V. 41. – № 3. – P. 125–137.
108. Lynn, A. ZMM proteins during meiosis: crossover artists at work. / A. Lynn, R. Soucek, G. V. Börner // *Chromosome Res.* – 2007. – V. 15. – № 5. – P. 591–605.
109. Ma, H. Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in

flowering plants. / H. Ma // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2005. – V. 56. – P. 393–434.

110. MacQueen, A. J. Synapsis-dependent and -independent mechanisms stabilize homolog pairing during meiotic prophase in *C. elegans* / A. J. MacQueen, M. P. Colaiácovo, K. McDonald, A. M. Villeneuve // *Genes Dev.* – 2002. – V. 16. – № 18. – P. 2428–2442.

111. Mainiero, S. Meiotic chromosome structure and function in plants / S. Mainiero, W. P. Pawlowski // *Cytogenet. Genome Res.* – 2014. – V. 143. – № 1-3. – P. 6–17.

112. Martinez-Perez, E. The *Phl* locus is needed to ensure specific somatic and meiotic centromere association / E. Martinez-Perez, P. Shaw, G. Moore // *Nature* – 2001. – V. 411. – P. 204–207.

113. Mercier, R. SWITCH1 (SWI1): a novel protein required for the establishment of sister chromatid cohesion and for bivalent formation at meiosis. / R. Mercier, D. Vezon, E. Bullier, J. C. Motamayor, A. Sellier, F. Lefèvre, G. Pelletier, C. Horlow // *Genes Dev.* – 2001. – V. 15. – № 14. – P. 1859–71.

114. Mercier, R. The meiotic protein SWI1 is required for axial element formation and recombination initiation in *Arabidopsis* / R. Mercier, S. J. Armstrong, C. Horlow, N. P. Jackson, C. A. Makaroff, D. Vezon, G. Pelletier, G. H. Jones, F. C. H. Franklin // *Development* – 2003. – V. 130. – № 14. – P. 3309–3018.

115. Mercier, R. Meiosis in plants: ten years of gene discovery / R. Mercier, M. Grelon // *Cytogenet. Genome Res.* – 2008. – V. 120 – № 3-4. – P. 281–90.

116. Meuwissen, R. L. A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes / R. L. Meuwissen, H. H. Offenbergh, A. J. Dietrich, A. Riesewijk, M. van Iersel, C. Heyting // *Embo J* – 1992. – V. 11. – № 13. – P. 5091–5100.

117. Meuwissen, R. L. Human synaptonemal complex protein 1 (SCP1): isolation and characterization of the cDNA and chromosomal localization of the gene / R. L. Meuwissen, I. Meerts, J. M. Hoovers, N. J. Leschot, C. Heyting // *Genomics* – 1997. – V. 39. – № 3. – P. 377–384.

118. Mezard C. The road to crossovers: plants have their say. / C. Mezard, J. Vignard, J. Drouaud, R. Mercier // *Trends Genet.* – 2007. – V. 23 – № 2. – P. 91–99.

119. Mikhailova, E. I. Nuclear dispositions of subtelomeric and pericentromeric chromosomal domains during meiosis in asynaptic mutants of rye (*Secale cereale* L.) / E. I. Mikhailova, S. P. Sosnikhina, G. A. Kirillova, O. A. Tikholiz, V. G. Smirnov, R. N. Jones, G. Jenkins // *J. Cell Sci.* – 2001. – V. 114. № 10. – P. 1875-1882

120. Mikhailova, E. I. Molecular assembly of meiotic proteins *Asy1* and *Zyp1* and pairing promiscuity in rye (*Secale cereale* L.) and its synaptic mutant *sy10* / E. I. Mikhailova, D. Phillips, S. P. Sosnikhina, A. V. Lovtsyus, R. N. Jones, G. Jenkins // *Genetics* – 2006. – V. 174. – № 3. – P. 1247–58.

121. Moore, G. Meiosis in allopolyploids – the importance of “Teflon” chromosomes. / G. Moore // Trends Genet. – 2002. – V. 18. – № 9. – P. 456–463.
122. Moses, M. J. Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. / M. J. Moses // J. Biophys. Biochem. Cytol. – 1956. – V. 2. – № 2. – P. 215–218.
123. Muniyappa, K. The HORMA domain: an evolutionarily conserved domain discovered in chromatin-associated proteins, has unanticipated diverse functions / K. Muniyappa, R. Kshirsagar, I. Ghodke // Gene – 2014. – V. 545 – № 2. – P. 194–197.
124. De Muyt, A. AtPRD1 is required for meiotic double strand break formation in *Arabidopsis thaliana* / A. De Muyt, D. Vezon, G. Gendrot, J. – L. Gallois, R. Stevens, M. Grelon // EMBO J. – 2007. – V. 26. – № 18. – P. 4126–4137.
125. Nairz, K. *mre11S* – a yeast mutation that blocks double-strand-break processing and permits nonhomologous synapsis in meiosis / K. Nairz, F. Klein // Genes Dev. – 1997. – V. 11. – № 17. – P. 2272–2290.
126. Nonomura, K. – I. The *MSP1* gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice. / K. – I. Nonomura, K. Miyoshi, M. Eiguchi, T. Suzuki, A. Miyao, H. Hirochika, N. Kurata // Plant Cell – 2003. – V. 15. – № 8. – P. 1728–1739.
127. Nonomura, K. I. An insertional mutation in the rice *PAIR2* gene, the ortholog of *Arabidopsis ASY1*, results in a defect in homologous chromosome pairing during meiosis / K. I. Nonomura, M. Nakano, K. Murata, K. Miyoshi, M. Eiguchi, A. Miyao, H. Hirochika, N. Kurata // Mol. Genet. Genomics – 2004. – V. 271. – № 2. – P. 121–129.
128. Nonomura, K. *PAIR2* is essential for homologous chromosome synapsis in rice meiosis I / K. Nonomura, M. Nakano, M. Eiguchi, T. Suzuki, N. Kurata // J. Cell Sci. – 2006. – V. 119. – P. 217–225.
129. Nonomura, K. A Germ Cell – Specific Gene of the ARGONAUTE Family Is Essential for the Progression of Premeiotic Mitosis and Meiosis during Sporogenesis in Rice / K. Nonomura, A. Morohoshi, M. Nakano, M. Eiguchi, A. Miyao, H. Hirochika, N. Kurata // Plant Cell – 2007. – V. 19. – P. 2583–2594.
130. Osakabe, K. Molecular cloning and characterization of *RAD51-like* genes from *Arabidopsis thaliana* / K. Osakabe, T. Yoshioka, H. Ichikawa, S. Toki // Plant Mol. Biol. – 2002. – V. 50. – P. 71–81.
131. Page, S. L. *c(3)G* encodes a *Drosophila* synaptonemal complex protein / S. L. Page, R. S. Hawley // Genes Dev. – 2001. – V. 15. – P. 3130–3143.
132. Pawlowski, W. P. Altered Nuclear Distribution of Recombination Protein RAD51 in Maize Mutants Suggests the Involvement of RAD51 in Meiotic Homology Recognition / W. P.

Pawlowski, I. N. Golubovskaya, W. Z. Cande // *Plant Cell* – 2003. – V. 15 – № 8. – P. 1807–1816.

133. Pawlowski, W. P. Coordination of meiotic recombination, pairing, and synapsis by *PHS1* / W. P. Pawlowski, I. N. Golubovskaya, L. Timofejeva, R. B. Meeley, W. F. Sheridan, W. Z. Cande // *Science* – 2004. – V. 303. – P. 89–92.

134. Pawlowski, W. P. Maize *AMEIOTIC1* is essential for multiple early meiotic processes and likely required for the initiation of meiosis. / W. P. Pawlowski, C. – J. R. Wang, I. N. Golubovskaya, J. M. Szymaniak, L. Shi, O. Hamant, T. Zhu, L. Harper, W. F. Sheridan, W. Z. Cande // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2009. – V. 106. – № 9. – P. 3603–3608.

135. Phillips, D. Dissecting meiosis of rye using translational proteomics. / D. Phillips, E. I. Mikhailova, L. Timofejeva, J. L. Mitchell, O. Osina, S. P. Sosnikhina, R. N. Jones, G. Jenkins // *Ann. Bot.* – 2008. – V. 101. – № 6. – P. 873–880.

136. Phillips, D. High Resolution Analysis of Meiotic Chromosome Structure and Behaviour in Barley (*Hordeum vulgare* L.) / D. Phillips, C. Nibau, J. Wnetrzak, G. Jenkins // *PLoS One* – 2012. – V. 7. – № 6.

137. Pradillo, M. On the role of *AtDMC1*, *AtRAD51* and its paralogs during *Arabidopsis* meiosis / M. Pradillo, J. Varas, C. Oliver, J. L. Santos // *Front. Plant Sci.* – 2014. – V. 5.

138. Puizina, J. Mre11 deficiency in *Arabidopsis* is associated with chromosomal instability in somatic cells and Spo11-dependent genome fragmentation during meiosis / J. Puizina, J. Siroky, P. Mokros, D. Schweizer, K. Riha // *Plant Cell* – 2004. – V. 16. – № 8. – P. 1968–1978.

139. Reed, K. M. Chromosomal synapsis and the meiotic process in male mesquite lizards, *Sceloporus grammicus* complex / K. M. Reed, J. W. Sites, I. F. Greenbaum // *Genome* – 1992. – V. 35. – P. 398–408.

140. Rey, M. – D. The use of the *ph1b* mutant to induce recombination between the chromosomes of wheat and barley / M. – D. Rey, M. C. Calderón, P. Prieto // *Front. Plant Sci.* – 2015. – V. 6.

141. Rosenberg, S. C. The multifaceted roles of the HORMA domain in cellular signaling / S. C. Rosenberg, K. D. Corbett // *J. Cell Biol.* – 2015. – V. 211. – № 4. – P. 745–755.

142. Rufas, J. S. Meiotic chromosome structure Relationship between the synaptonemal complex and the chromatid cores / J. S. Rufas, J. L. Santos, M. A. Diez, J. A. Suja // *Genome* – 1992. – V. 35. – P. 1054–1061.

143. Schild-Prüfert, K. Organization of the synaptonemal complex during meiosis in *Caenorhabditis elegans* / K. Schild-Prüfert, T. T. Saito, S. Smolikov, Y. Gu, M. Hincapie, D. E. Hill, M. Vidal, K. McDonald, M. P. Colaiácovo // *Genetics* – 2011. – V. 189. – P. 411–421.

144. Schramm, S. A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility / S. Schramm, J. Fraune, R. Naumann, A.

Hernandez-Hernandez, C. Höög, H. J. Cooke, M. Alsheimer, R. Benavente // PLoS Genet. – 2011. – V. 7. – № 5.

145. Sheridan, W. F. The *mac1* Gene: Controlling the Commitment to the Meiotic Pathway in Maize / W. F. Sheridan, N. A. Avalkina, I. I. Shamrov, T. B. Batyea, I. N. Golubovskaya // Genetics – 1996. – V. 142. – P. 1009–1020.

146. Sheridan, W. F. The *mac1* Mutation Alters the Developmental Fate of the Hypodermal Cells and Their Cellular Progeny in the Maize Anther / W. F. Sheridan, E. A. Golubeva, L. I. Abrhamova, I. N. Golubovskaya // Genetics – 1999. – V. 153 – P. 993–941.

147. Shinohara, A. Roles of RecA homologues Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination / A. Shinohara, M. Shinohara // Cytogenet. Genome Res. – 2004. – V. 107. – № 3-4. – P. 201–207.

148. Siaud, N. Brca2 is involved in meiosis in *Arabidopsis thaliana* as suggested by its interaction with Dmc1 / N. Siaud, E. Dray, I. Gy, E. Gérard, N. Takvorian, M. – P. Doutriaux // EMBO J. – 2004. – V. 23. – № 6. – P. 1392–401.

149. Sosnikhina, S. P. Meiotic mutants of rye *Secale cereale* L.: I. Synaptic mutant *sy1* / S. P. Sosnikhina, Y. S. Fedotova, V. G. Smirnov, E. I. Mikhailova, O. L. Kolomiets, Y. F. Bogdanov // Theor. Appl. Genet. – 1992. – V. 84 – № 7-8. – P. 979–985.

150. Sosnikhina, S. P. Meiotic mutations in rye *Secale cereale* L. / S. P. Sosnikhina, E. I. Mikhailova, O. A. Tikheliz, S. N. Priyatkina, V. G. Smirnov, S. Y. Dadashev, O. L. Kolomiets, Y. F. Bogdanov // Cytogenet. Genome Res. – 2005. – V. 109. – № 1-3. – P. 215–220.

151. Stacey, N. J. *Arabidopsis* SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination / N. J. Stacey, T. Kuromori, Y. Azumi, G. Roberts, C. Breuer, T. Wada, A. Maxwell, K. Roberts, K. Sugimoto-Shirasu // Plant J. – 2006. – V. 48. – № 2. – P. 206–216.

152. Stack, S. M. Staining plant cells with silver. II. Chromosome cores / S. M. Stack // Genome – 1991. – V. 34 – P. 900–908.

153. Stevens, R. A CDC45 homolog in *Arabidopsis* is essential for meiosis, as shown by RNA interference-induced gene silencing. / R. Stevens, M. Grelon, D. Vezon, J. Oh, P. Meyer, C. Perennes, S. Domenichini, C. Bergounioux // Plant Cell – 2004. – V. 16. – № 1. – P. 99–113.

154. Strich, R. Meiotic DNA replication. / R. Strich // Curr. Top. Dev. Biol. – 2004. – V. 61. – P. 29–60.

155. Wang, C. J. R. Interlock formation and coiling of meiotic chromosome axes during synapsis / C. J. R. Wang, P. M. Carlton, I. N. Golubovskaya, W. Z. Cande // Genetics – 2009. – V. 183. – P. 905–915.

156. Wang, C. – J. R. Maize *multiple archesporial cells 1 (mac1)*, an ortholog of rice *TDLIA*, modulates cell proliferation and identity in early anther development / C. – J. R. Wang, G. –

L. Nan, T. Kelliher, L. Timofejeva, V. Vernoud, I. N. Golubovskaya, L. Harper, R. Egger, V. Walbot, W. Z. Cande // *Development* – 2012. – V. 139. – № 14. – P. 2594–2603.

157. Wang, K. Increasing the Genetic Recombination Frequency by Partial Loss of Function of the Synaptonemal Complex in Rice / K. Wang, C. Wang, Q. Liu, W. Liu, Y. Fu // *Mol. Plant* – 2015. – V. 8. – № 8. – P. 1295–1298.

158. Wang, M. The central element protein ZEP1 of the synaptonemal complex regulates the number of crossovers during meiosis in rice / M. Wang, K. Wang, D. Tang, C. Wei, M. Li, Y. Shen, Z. Chi, M. Gu, Z. Cheng // *Plant Cell* – 2010. – V. 22. – № 2. – P. 417–430.

159. Wang, M. OsSGO1 maintains synaptonemal complex stabilization in addition to protecting centromeric cohesion during rice meiosis / M. Wang, D. Tang, K. Wang, Y. Shen, B. Qin, C. Miao, M. Li, Z. Cheng // *Plant J.* – 2011. – V. 67. – № 4. – P. 583–594.

160. Wang, Y. Progression through meiosis I and meiosis II in *Arabidopsis* anthers is regulated by an A-type cyclin predominately expressed in prophase I / Y. Wang, J. – L. Magnard, S. McCormick, M. Yang // *Plant Physiol.* – 2004. – V. 136. – № 4. – P. 4127–4135.

161. Zamariola, L. SHUGOSHINs and PATRONUS protect meiotic centromere cohesion in *Arabidopsis thaliana* / L. Zamariola, N. De Storme, K. Vannerum, K. Vandepoele, S. J. Armstrong, F. C. H. Franklin, D. Geelen // *Plant J.* – 2014. – V. 77. – № 5. – P. 782–794.

162. Zetka, M. C. Synapsis and chiasma formation in *Caenorhabditis elegans* require HIM-3, a meiotic chromosome core component that functions in chromosome segregation / M. C. Zetka, I. Kawasaki, S. Strome, F. Müller // *Genes Dev.* – 1999. – V. 13. – № 17. – P. 2258–2270.

163. Zhang, L. The rice OsRad21-4, an orthologue of yeast Rec8 protein, is required for efficient meiosis / L. Zhang, J. Tao, S. Wang, K. Chong, T. Wang // *Plant Mol. Biol.* – 2006. – V. 60. – № 4. – P. 533–554.

164. Zhao, D. Z. The *excess microsporocytes1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther / D. Z. Zhao, G. F. Wang, B. Speal, H. Ma // *Genes Dev.* – 2002. – V. 16. – № 15. – P. 2021–2031.

165. Zickler, D. Meiotic chromosomes: integrating structure and function / D. Zickler, N. Kleckner // *Annu. Rev. Genet.* – 1999. – V. 33. – P. 603–754.

166. <http://www.fao.org>

167. <http://wheat.pw.usda.gov/GG3>