

На правах рукописи

**Логинова
Дина Борисовна**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕЙОТИЧЕСКИХ
МЕХАНИЗМОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ У
ПШЕНИЧНО-РЖАНЫХ ГИБРИДОВ (ABDR, $4x=28$)**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», в секторе цитогенетики злаков, г. Новосибирск

Научный руководитель: кандидат биологических наук, заведующий сектором цитогенетики злаков
Силкова Ольга Геннадьевна

Официальные оппоненты: **Бадаева Екатерина Дмитриевна,**
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

Муратова Елена Николаевна,
доктор биологических наук, зав. лаборатории лесной генетики и селекции, ФГБУН Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, г. Красноярск

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский Государственный университет", г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «__» _____ 2016 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в конференц-зале Института по адресу: 630090 г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 10, тел. (383) 363-49-06, факс: (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc. ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <http://www.bionet.nsc.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Отдаленная гибридизация широко представлена среди цветковых растений и является основным эволюционным механизмом видообразования. В результате межвидовой и межродовой гибридизации и последующего удвоения числа хромосом возникают аллополиплоиды – представители полиплоидного ряда растений. Главным механизмом полиплоидизации является слияние нередуцированных гамет [Bretagnolle, Thompson, 1995; Ramsey, Schemske, 1998]. Такие гаметы возникают в процессе мейотической реституции. Изучение механизмов мейотической реституции является актуальным не только для понимания фундаментальных аспектов эволюции, но также необходимо в селекционных программах для восстановления частичной фертильности после отдаленной гибридизации, используемой для получения новых сортов с/х ценных растений.

Изучение реституции продолжается почти 90 лет, начиная с описания механизмов образования межродовых гибридных растений рафанобрассики [Карпеченко, 1927] и партеногенетических форм *Euhieracium* [Rosenberg, 1927]. К настоящему моменту описано множество примеров мейотической реституции, большинство из которых относят к реституции первого (FDR, first division restitution) или второго (SDR, second division restitution) деления [Ramanna, Jacobsen, 2003; Cai, Xu, 2007]. Однако данная терминология и описание механизмов образования FDR- и SDR-гамет характерны, в основном, для двудольных растений, для которых показан симультанный цитокинез.

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) – однодольное растение, типичный представитель аллополиплоидов, образовалось в результате естественной гибридизации *T. turgidum* L. и *Aegilops tauschii* Coss. [Matsuoka, 2011; Feldman, Levy, 2012]. Значительная часть работ по реконструкции генома мягкой пшеницы включает поиск механизмов реституции [Wagenaar, 1968; Matsuoka, Nasuda, 2004; Zhang et al., 2007, 2008; Cai et al., 2010; Matsuoka et al., 2013; Hao et al., 2014]. Основным цитогенетическим механизмом образования нередуцированных гамет при возникновении вида *T. aestivum* L. считается отсутствие расхождения хромосом в первом делении мейоза [Cai et al., 2010; Matsuoka et al., 2013]. Последующее нормальное второе деление завершается образованием диад. Этот тип деления был определен как реституция первого деления (FDR) [Xu, Joppa, 1995], и в работах других авторов получил название «нередукционное мейотическое деление клетки» (UMCD, unreductional meiotic cell division) [Cai et al., 2010]. Этот механизм контролируется взаимодействием генов родительских видов [Wagenaar, 1968; Xu, Joppa, 1995; Matsuoka, Nasuda, 2004; Zhang et al., 2007, 2008; Matsuoka et al., 2013; Hao et al., 2014]. На хромосоме пшеницы 3В локализован QTL, QTug.sau-3B [Hao et al.,

2014], являющийся геном ортологом *suca1;2/tam*, который участвует в формировании нередуцированных гамет у *Arabidopsis thaliana* [d'Erfurth et al., 2010].

У гибридов *T. turgidum* L. x *Ae. tauschii* Coss. описан и другой цитогенетический механизм формирования нередуцированных гамет - эквационное расхождение хромосом в первом и единственном делении мейоза [Zhang et al., 2007, 2008; Hao et al., 2014], однако не охарактеризован его цитогенетический механизм и нет данных о его генетической регуляции. Данный тип деления получил название «единственного мейотического деления» (SDM) [Matsuoka, Nasuda, 2004]. Предполагается, что как FDR, так и SDM могут приводить к образованию функциональных нередуцированных гамет у гибридов *T. turgidum* L. x *Ae. tauschii* Coss. [Zhang et al., 2007, 2008; Hao et al., 2014].

Однако, несмотря на исследования реституции у мягкой пшеницы и ее гибридов, не сложилось четкой картины механизма/механизмов формирования нередуцированных гамет у амфигаплоидных растений [обзор Силкова и др., 2011].

Ранее изучено и систематизировано поведение хромосом у пшенично-ржаных гибридов F₁ *T. aestivum* L. x *Secale cereale* L., показано, что поведение хромосом генетически регулируется [Силкова и др., 2003; Silkova et al., 2011]. Эквационное расхождение хромосом в первом и единственном делении мейоза предполагается в качестве механизма формирования нередуцированных гамет. Пшенично-ржаные замещения 1Rv/1A, 5R/5D и 6R/6A детерминируют этот тип поведения [Silkova et al., 2011]. Данный цитотип реституции был обнаружен у андрогаплоидов пшенично-ржаной замещенной линий 6R(6A) [Силкова и др., 2009].

В расхождении хромосом во время мейотического деления клетки значимую роль играют организация и поведение центромерного района, формирование веретена деления и когезия сестринских хроматид. Следовательно, прямая визуализация поведения хромосом и формирование аппарата деления в мейозе у пшенично-ржаных гибридов F₁ с помощью комплекса современных молекулярно-цитогенетических методов может внести вклад в понимание механизмов мейотической реституции. Использование линий пшеницы с замещениями 1Rv/1A, 2R/2D, 5R/5D и 6R/6A в качестве родительских форм позволит определить хромосомную локализацию генов, регулирующих цитогенетические механизмы формирования нередуцированных гамет у пшенично-ржаных амфигаплоидов

Целью настоящей работы являлось изучение мейотических механизмов восстановления фертильности у гибридов F₁ *Triticum aestivum* L. x *Secale cereale* L., в геномах которых хромосомы пшеницы 1A, 2D, 5D и 6A замещены гомеологами ржи, и анализ фертильности потомства у амфидиплоидов F₁ и F₂ поколений.

Задачи:

1) Провести анализ влияния пшенично-ржаного замещения хромосом 2R/2D, 1Rv/1A, 5R/5D, 6R/6A на поведение хромосом в мейозе у гибридов и характер формирования аппарата деления.

2) Изучить организацию ДНК центромерных районов хромосом, выявляемую флуоресцентной *in situ* гибридизацией.

3) Проанализировать архитектуру кинетохоров хромосом по характеру локализации гистона СЕНН3.

4) Изучить динамику микротрубочек цитоскелета в мейозе гибридов.

5) Проанализировать характер распределения и сохранения когезии на хромосомах с помощью модифицированного гистона pH3Ser10.

6) Выявить механизмы мейоза, участвующие в формировании нередуцированных гамет.

7) Охарактеризовать фертильность потомства F_1 и F_2 , полученного при самоопылении пшенично-ржаных амфигаплоидов.

Научная новизна работы. Впервые проведено комплексное молекулярно-цитогенетическое исследование регуляции мейоза у амфигаплоидов *T. aestivum* L. x *S. cereale* L., в геномах которых хромосомы пшеницы 1A, 2D, 5D и 6A замещены гомеологами ржи. Впервые с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации и иммуноокрашивания получены доказательства влияния замещения 2R/2D на прохождение редукционного типа деления, а замещений 1Rv/1A, 5R/5D, 6R/6A - на проявление четырех типов поведения хромосом в мейозе частично-фертильных гибридов F_1 . У первого типа - деления, подобного митозу, впервые выявлены митотическая организация центромерного района, одноэтапное исчезновение когезии с плечей и центромер хромосом, а также расхождение сестринских хроматид в первом и единственном делении мейоза. У второго типа - формирование монополярного веретена стало причиной блокирования расхождения хромосом и отсутствия цитокинеза в первом делении, тогда как сестринские хроматиды расходились во втором делении. Впервые показано, что формирование нередуцированных гамет происходит в результате реализации этих двух механизмов. С помощью прямой визуализации организации центромерного района и динамики микротрубочек веретена показано, что другие два типа деления, редукционный и редукционно+эквационный, являются самостоятельными типами поведения хромосом, а не промежуточными стадиями первого деления мейоза. Показано, что замещение 2R/2D определяет монополярную организацию центромерного района, сохранение когезии сестринских хроматид и распределение унивалентных хромосом между полюсами с помощью кинетохорных микротрубочек в первом делении мейоза амфигаплоидов.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Фундаментальными являются полученные в представленной работе знания о возможности реализации программы, подобной митозу, в мейозе полигаплоидных организмов. Результаты работы расширяют наши представления о регуляции таких механизмов мейоза у растений как контроль клеточного цикла, организация центромерного района, формирование веретена и когезия сестринских хроматид.

Использование пшенично-ржаных замещенных линий в гибридизации с рожью посевной позволяет частично восстанавливать фертильность гибридов F_1 , что является необходимым шагом для интрогрессии генетического материала ржи в геном пшеницы. Материалы диссертационной работы используются в курсе лекций «Хромосомно-инженерные технологии в селекции растений» в программе магистратуры Новосибирского государственного аграрного университета.

Положения, выносимые на защиту

Механизмами образования нередуцированных гамет в мейозе у пшенично-ржаных гибридов F_1 с замещениями хромосом 1R/1A, 5R/5D и 6R/6A являются:

- расхождение сестринских хроматид в первом и единственном делении мейоза, характеризующееся митотической организацией центрального района и одноэтапным исчезновением когезии с плечей и центрального района унивалентных хромосом;
- блокирование первого деления при образовании монополярного веретена с последующим расхождением сестринских хроматид во втором делении.

Личный вклад автора. Основные результаты, изложенные в диссертации, получены и проанализированы автором самостоятельно. Работа по созданию и анализу фертильности гибридов F_1 и F_2 была проведена совместно с сотрудниками сектора цитогенетики злаков Барсук Л.Г. и Суминой Л.И.

Апробация работы. Работа была представлена на российских и международных научных конференциях: 19th International chromosome conference, Dipartimento BiGeA Complesso Belmeloro, Bologna, Italia, 2013; VI Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров и ассоциированные генетические симпозиумы, Ростов-на-Дону, 2014; XII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук», Томск, 2015; 3-я Международная конференция «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений», Новосибирск, 2015; Международная научная конференция «Хромосома 2015», Новосибирск, 2015.

Публикации. По теме диссертации было опубликовано 10 работ, из них 5 статей в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, описания используемых материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 153 страницах машинописного текста, содержит 29 рисунков и 11 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы: яровая рожь *S. cereale* L. сорт Онохойская (RR, 2n=14), пшеница *T. aestivum* L. сорт Саратовская 29 (AABBDD, 2n=42), пшенично-ржаные дисомно замещенные линии (2n=42): 1Rv(1A) (*T. aestivum* L. сорт Саратовская 29/*S. cereale* L. сорт Вятка), 5R(5D), 6R(6A) (*T. aestivum* L. сорт Саратовская 29/*S. cereale* L. сорт Онохойская), 2R(2D)₁ (*T. aestivum* L. сорт Саратовская 29/Новосибирская 67/*S. cereale* L. сорт Онохойская), полученные и охарактеризованные в лаборатории ранее [Щапова, Кравцова, 1990; Силкова и др., 2006, 2007]. Гибриды F₁ получены при скрещивании линий с рожью: 1Rv(1A)xR; 2R(2D)₁xR; 5R(5D)xR; 6R(6A)xR (геномная формула ABDR, 4x=28).

Растения выращивались на экспериментальном поле СГК ИЦиГ СО РАН (летняя вегетация 2013, 2014 гг), а также в гидропонной теплице (осенние и весенние вегетации 2012, 2013, 2014 гг) ЦКП ЛИВР ИЦиГ СО РАН. Разными методами проанализировано от 77 до 1582 клеток на гибридную комбинацию.

Организацию центромерной ДНК изучали с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации с использованием повторов *Ae. tauschii* pAet 6-09, специфичного для центромер хромосом ржи, пшеницы [Zhang et al., 2004] и pAwRc, специфичного для центромеры ржи [Franki, 2001]. Зонды метили с помощью системы ник-трансляции (Invitrogen). Плазмиды pAet6-09 и pAwRc были любезно предоставлены доктором А. Лукашевским (University of California, Riverside, USA).

Для амплификации плазмидной ДНК проводили трансформацию компетентных клеток *E.coli* штамма XL10 методом теплового шока с последующим выделением плазмидной ДНК методом щелочного лизиса. Компетентные клетки были любезно предоставлены д.б.н. Салиной Е.А.

Формирование аппарата деления в клетках апикальной корневой меристемы и в материнских клетках пыльцы (МКП) изучали с помощью иммуноокрашивания с антителами к α -тубулину (Sigma), которые гибридизуются с микротрубочками веретена, и с антителами к CENH3 [Houben et al., 2006], которые детектируют активный кинетохор. Антитела к гистону CENH3 были любезно предоставлены доктором А. Хоубеном (IPK, Gatersleben, Germany). Модификацию гистона H3 изучали с использованием иммуноокрашивания с антителами к фосфорилированному H3Ser10 (Active motif). Анализ флуоресцентных сигналов проводили на микроскопе проходящего и отраженного света Axio Imager.M1 (Zeiss), с камерой ProgRes MF camera (Meta Systems, Jenoptic) и лазерном сканирующем микроскопе LSM 780 NLO (Zeiss) на базе AxioObserver Z1 (Zeiss) в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Анализ влияния пшенично-ржаного замещения хромосом на характер мейоза у гибридов F₁.

В мейозе гибридов F₁ с различным генетическим фоном выявлены четыре типа мейоцитов с различающимся поведением хромосом: эквационным, редукционным, редукционно+эквационным и блокированием первого деления (рис. 1). Анализ окрашенных ацетокармином препаратов показал, что у растений 2R(2D)₁xR в преобладающем большинстве мейоцитов обнаружен редукционный тип деления, 12.3% материнских клеток пыльцы характеризовались редукционно+эквационным типом, а 4.2% эквационным; мейоцитов с блокированием первого деления не обнаружено. Гибриды с линиями 1Rv(1A), 5R(5D), 6R(6A) характеризовались схожим процентным распределением мейоцитов с разными типами деления (рис. 1). От 30 до 40% мейоцитов были с эквационным типом, около 20% с редукционно+эквационным, от 35 до 50% с редукционным. Средняя частота мейоцитов с блокированием первого деления была невысокой. Однако в некоторых пыльниках у гибридов 5R(5D)xR почти в 40% мейоцитов первое деление было блокировано.

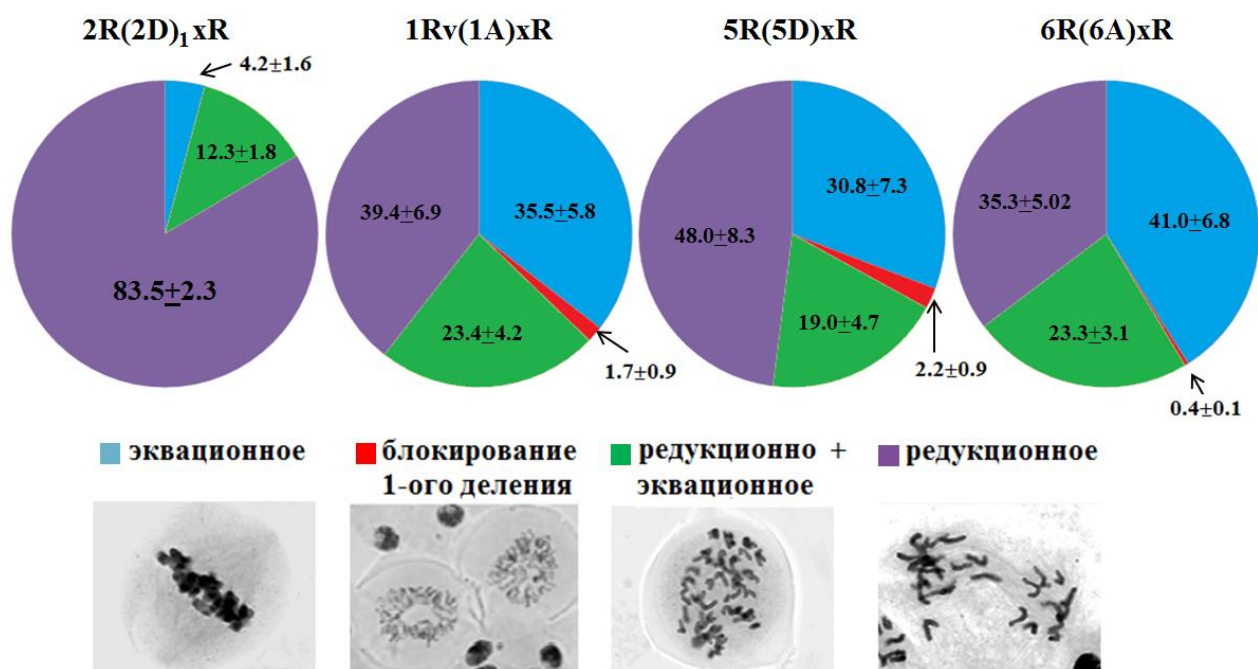


Рисунок 1. Распределение по частоте встречаемости четырех типов мейоцитов в первом делении у пшенично-ржаных амфигиплоидов.

Таким образом, была показана повторяемость мейотического фенотипа у пшенично-ржаных гибридов F₁ (Silkova et al., 2011). Замещение 2R/2D детерминирует редукционный тип деления, замещения 1Rv/1A, 5R/5D и 6R/6A определяют

эквационный тип деления, в то время как 5R/5D замещение может в отдельных случаях приводить к высокой частоте образования фигуры «круга» в МI. Проявление мейотического фенотипа гибридов 2R(2D)xR является контрастным по отношению к фенотипу гибридов 1Rv(1A)xR, 5R(5D)xR и 6R(6A)xR, что дает возможность лучше понять поведение хромосом в МI и процесс прохождения деления мейоцитами с редуцированным, редуционно+эквационным и эквационным поведением хромосом.

2. Характеристика поведения хромосом с прямой визуализацией динамики микротрубочек, организации хромосом и их центромерных районов.

Митоз и мейоз родительских форм. Для правильного понимания процессов формирования аппарата деления и поведения хромосом у амфигаплоидов был проведен молекулярно-цитогенетический анализ митотического и мейотического делений у родительских форм – растений ржи и пшеницы (рис. 2). Динамика микротрубочек (МТ) в митозе и мейозе не отличалась от уже известных в литературе данных [Keijzer et al., 2014]. Основной особенностью динамики МТ в митозе было формирование в метафазе биполярного дивергентного веретена деления с несколькими центрами конвергенции микротрубочек – миниполусами (рис. 2 а). В отличие от митоза, в мейозе формируется конвергентное биполярное веретено деления (рис. 2 б,в).

К метафазе митоза когезия сестринских хроматид сохранялась только в области центромеры, что детектировалось по наличию сигнала pH3Ser10 в данной области (рис. 2 а). Хромосомы выстраивались в эквационной плоскости, 2 точечных сигнала локализации антител к СЕНН3 в области центромеры каждой из хромосом (рис. 2 г) соответствовали биполярно-ориентированным сестринским кинетохорам, от которых отходили пучки МТ к противоположным полюсам (амфителлическое прикрепление МТ). Натяжение ДНК в области центромеры биполярно-ориентированных хромосом в метафазе детектировалось по наличию диффузных сигналов гибридизации pAet6-09, растянутых поперек первичной перетяжки (рис. 2 ж).

В микроспорогенезе когезин диссоциирует в два этапа: с плечей хроматид в АI, позволяя гомологам разойтись к противоположным полюсам, и из области центромеры в АII, способствуя расхождению сестринских хроматид, что цитологически связывается с сигналом локализации антител к модифицированному гистону pH3Ser10. В первом делении сигнал распространяется по всей длине хромосом (рис. 2 б), а во втором - только в области центромеры (рис. 2 в).

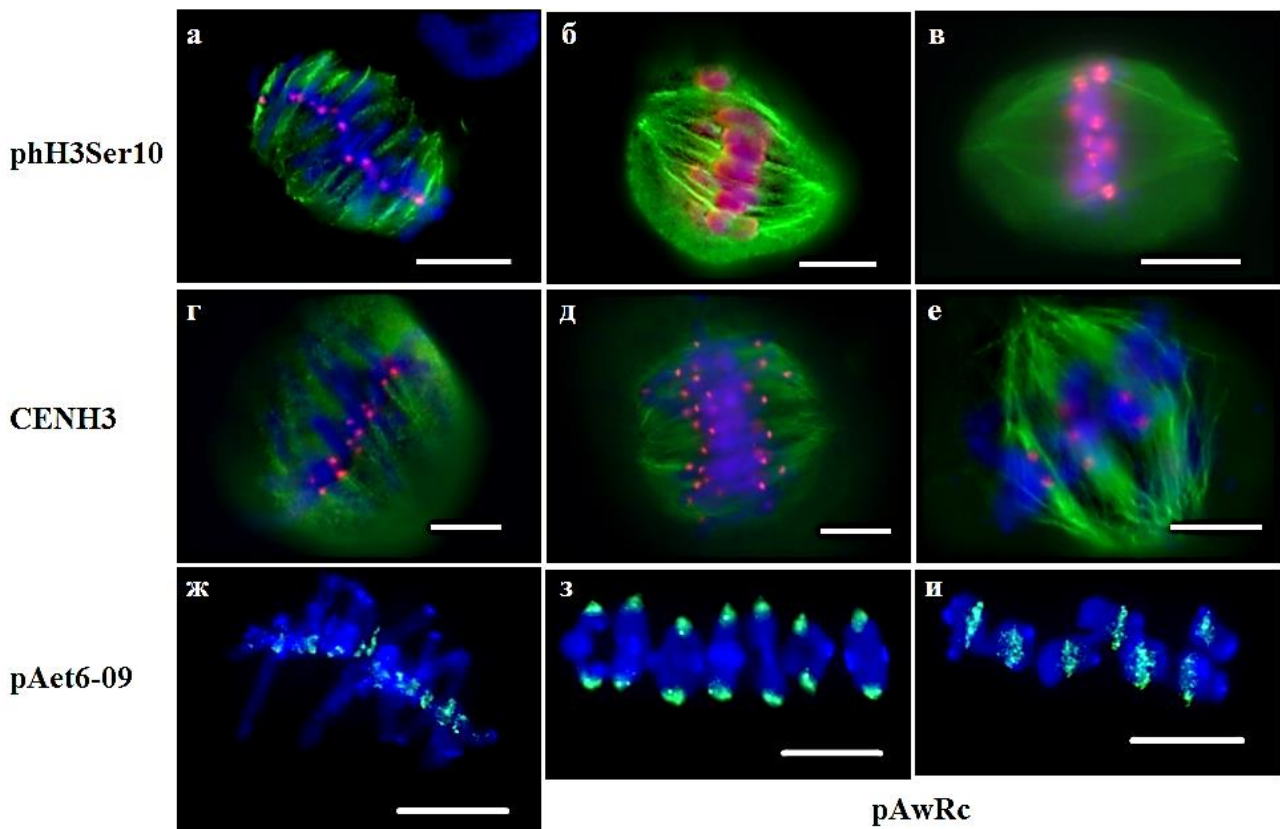


Рисунок 2. Веретено деления, когезия сестринских хроматид и организация центромерной области хромосом на стадиях: метафаза митоза (а, г, ж), МI (б,д,з) и МII (в,е,и) мейоза у родительских форм: Иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый), pH3Ser10 (красный) (а-в), и с антителами к α -тубулину (зеленый), CENH3 (красный) (г-е). FISH с центромеро-специфичными зондами pAet6-09 (зеленый) (ж) и pAwRc (з,и). Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

Также был проведен анализ организации кинетохоров и центромерной ДНК хромосом. Центромеры сестринских хроматид в первом делении мейоза объединены и монополярно ориентированы, что на цитологических препаратах детектируется как наличие одиночных точечных сигналов локализации антител к гистону CENH3 (рис. 2 д) и плотных точечных сигналов гибридизации центромерного зонда pAwRc (рис. 2 з). Во втором делении мейоза центромерные районы расположены бок-о-бок и биполярно ориентированы. Два сигнала локализации CENH3 детектируют разъединенные сестринские кинетохоры (рис. 2 е), а растянутый диффузный сигнал центромерного зонда - натяжение ДНК в области первичной перетяжки (рис. 2 и). Выявленные различия в организации центромерной области хромосом, локализации когезина и в построении веретена деления были использованы при проведении анализа микроспорогенеза у амфигаплоидов.

Формирование аппарата деления в мейозе амфигаплоидов с редуционным типом деления. Анализ поведения хромосом в мейоцитах с редуционным типом деления у гибридов с линией 2R(2D) не выявил классического выстраивания хромосом в эквационной плоскости. Метафаза характеризовалась группой плотно расположенных хромосом в центре клетки (рис. 3 а). Хромосомы были нормально компактизованы, сигнал локализации pH3Ser10 присутствовал по всей длине хромосом, аналогично первому нормальному мейотическому делению (рис. 3 а).

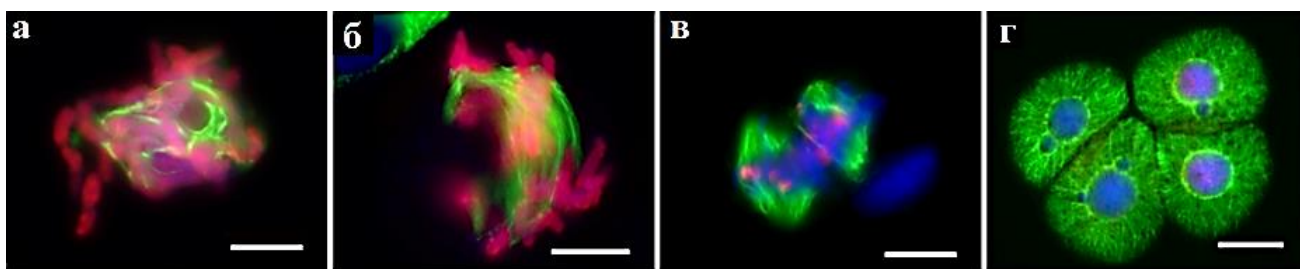


Рисунок 3. Поведение хромосом в мейоцитах с редуционным типом деления, формирование веретена и когезия сестринских хроматид: Иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и pH3Ser10 (красный); а) метафаза I; б) анафаза I; в) метафаза II; г) тетрада. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

Мейоциты, в которых хромосомы были распределены на околополюсные группы, мы идентифицировали как AI (рис. 3 б). Формирования биполярного веретена деления с интерзональными микротрубочками не наблюдалось, из чего мы предположили, что кинетохорные микротрубочки способны распределять хромосомы между полюсами. В МII формировалось нормальное биполярное веретено деления, хромосомы выстраивались в эквационной плоскости, а когезия сестринских хроматид сохранялась в области центромер, что определялось по сигналу локализации антител к pH3Ser10 (рис. 3 в). После расхождения сестринских хроматид в АII, в ТII происходило формирование тетрад (рис. 3 г). Так как в мейоцитах с редуционным типом деления хромосомы распределялись случайным образом, микроспоры были не сбалансированы по числу хромосом.

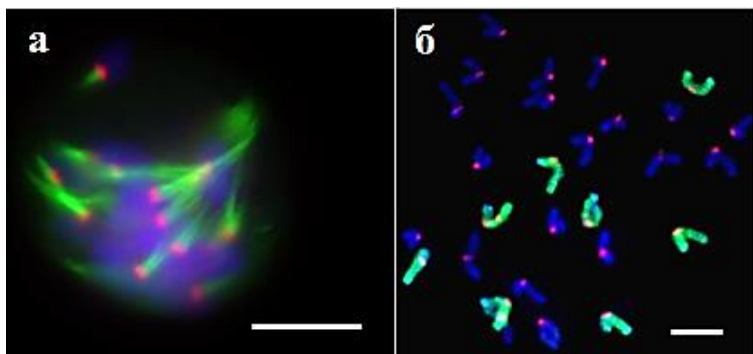


Рисунок 4. Организация центромерной области хромосом в метафазе I в мейоцитах с редуционным типом деления: а) иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый), CENH3 (красный); б) FISH с центромеро-специфичным зондом pAet6-09 (красный) и ДНК ржи (зеленый). Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

Хромосомы произвольно распределялись между полюсами по причине монополярной организации центромерного района, что было обнаружено по наличию одиночных сигналов иммунолокализации CENH3 (рис. 4 а) и одиночных точечных сигналов гибридизации центромерного зонда pAet6-09 (рис. 4 б).

Формирование аппарата деления в мейозе амфиганлоидов с редуционно+эквационным типом деления. Редуционно+эквационный тип деления встречался у всех гибридов и отличался от предыдущего произвольным распределением между полюсами одних хромосом, в то время как другие выстраивались на экваторе в МI (рис. 5 а), а затем в АI разделялись на сестринские хроматиды и расходились к полюсам (рис. 5 б). Обе группы хромосом характеризовались «мейотической» когезией сестринских хроматид по всей длине хромосом (рис. 5 а,б). Во втором делении только те хромосомы, которые не разделились в первом делении, сохраняли когезию сестринских хроматид в области центромеры (рис. 5 в). В конце мейоза формировались полиады и тетрады с микроядрами в результате невозможности одиночных хроматид нормально разойтись (рис. 5 г).

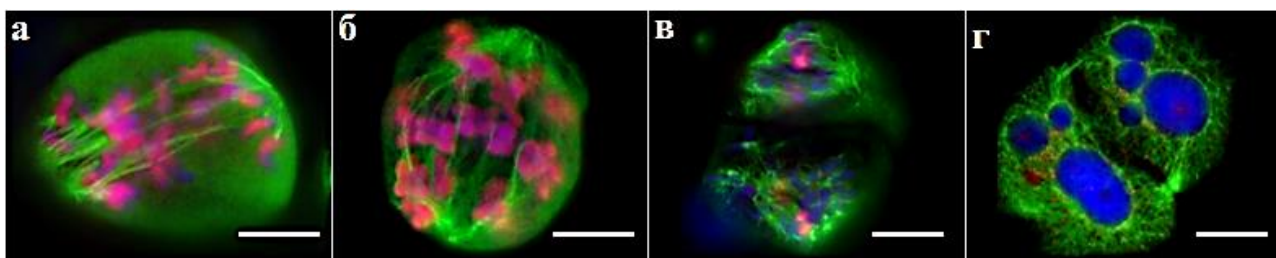


Рисунок 5. Редуционно+эквационный тип деления, формирование веретена и когезия сестринских хроматид: Иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и pH3Ser10 (красный); а) метафаза I; б) анафаза I; в) метафаза II; г) полиада. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

Монополярная ориентация центромерных районов хромосом, находящихся возле полюсов в МI, определялась одиночными точечными сигналами гибридизации центромерного зонда pAet6-09 (рис. 6 б) и гистона CENH3 (рис. 6 а). Биполярно ориентированные центромеры хромосом, расположенные на экваторе клетки, в МI характеризовались натянутыми диффузными сигналами гибридизации зонда (рис. 6 б) и двумя точечными сигналами CENH3 (рис. 6 а).

Таким образом, поскольку оба вышеописанных типа деления приводят к формированию несбалансированных гамет и стерильной пыльцы, следовательно, редуционный и редуционно-эквационный типы деления нельзя отнести к реституции.

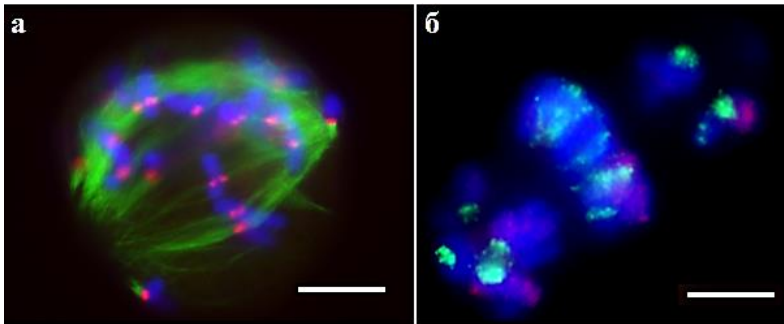


Рисунок 6. Организация центромерной области хромосом в метафазе I в мейоцитах с редуционно + эквационным типом деления:

а) иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый), CENH3 (красный); б) FISH с центромеро-специфичным зондом pAet6-09 (зеленый) и ДНК ржи (красный). Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

зондом pAet6-09 (зеленый) и ДНК ржи (красный). Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

Формирование аппарата деления в мейозе амфигаплоидов с эквационным типом деления.

В прометафазе в мейоцитах с эквационным типом деления унивалентные хромосомы выстраивались в эквационной плоскости (рис. 7 а). В МI формировалось биполярное веретено деления, однако в некоторых случаях формировалось анастральное веретено с дивергентными полюсами, что предполагает реализацию митотической программы в образовании веретена (рис. 7 б). В АI сестринские хроматиды разделялись в области плечей и центромер, и отходили к противоположным полюсам (рис. 7 в).

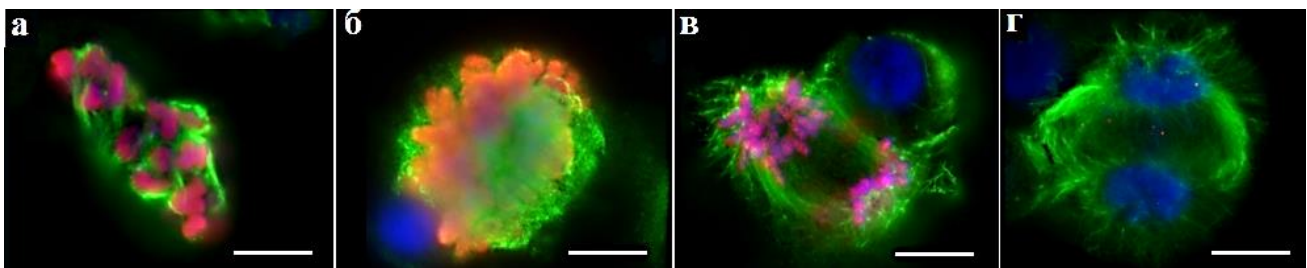


Рисунок 7. Эквационный тип деления. Формирование веретена и когезия сестринских хроматид: Иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и pH3Ser10 (красный); а) профаза I; б) метафаза I; в) анафаза I; г) диада. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

Наличие когезии сестринских хроматид по всей длине в МI (рис. 7 б) и сохранение остаточного сигнала локализации pH3Ser10 в АI (рис. 7 в) подтверждает, что сестринские хроматиды действительно расходятся в первом делении, а не формируют реституционное ядро, как было показано для гибридов *T. turgidum* L. x *Ae. tauschii* Coss. [Cai et al., 2010; Matsuoka et al., 2013]. После расхождения сестринских хроматид деление клетки завершалось образованием диад (рис. 7 г).

Важной характеристикой для эквационного типа деления является специфика организации центромерного района. Два сигнала локализации гистона CENH3 (рис. 8 а) и растянутые диффузные сайты гибридизации зонда в области первичной перетяжки хромосом (рис. 8 б) соответствовали «митотической» организации

центромеры. Таким образом, основные характеристики расхождения хромосом в мейоцитах с эквационным типом деления соответствуют митозу, однако когезия сестринских хроматид соответствует первому делению мейоза.

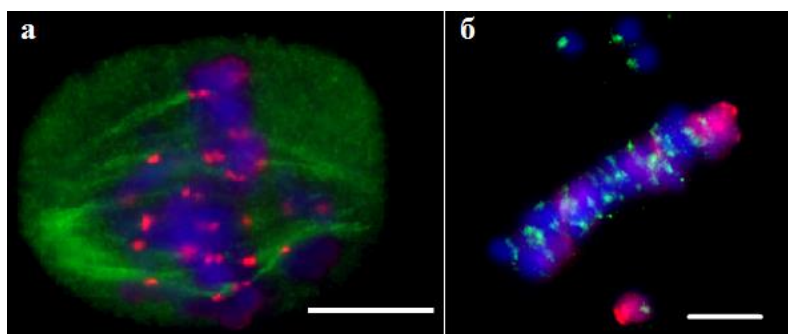


Рисунок 8. Организация центромерной области хромосом в метафазе I у амфигаплоидов с эквационным типом деления:

а) иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый), CENH3 (красный); б) FISH с центромеро-специфичным зондом pAet6-09 (зеленый) и ДНК ржи (красный). Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

Схема возможного механизма деления, подобного митозу, в мейозе амфигаплоидов.

Мы предполагаем следующий механизм митотического поведения хромосом в мейозе амфигаплоидов (рис. 9). Во время S-фазы мейотический когезин, белок Rec8, локализуется на ДНК, связывая сестринские хроматиды [Nasmyth, Haering, 2009]. В профазе рекомбинация хромосом супрессируется *Ph1* [Martin et al., 2014], гомеологи не способны образовывать биваленты. В MI унивалентные хромосомы выстраиваются в эквационной плоскости за счет амфителлического прикрепления МТ веретена к кинетохорам, что возможно при «бок-о-бок» организации хромосомных коров и, соответственно, сестринских кинетохоров [Hauf, Watanabe, 2004], либо в результате подавления функции генов *MIS12* и *NDS80* [Li, Dawe, 2009]. После прохождения точки контроля анафазы, в AI сепараза разрезает когезиновые кольца, разделяя как плечи, так и центромерные районы сестринских хроматид. В мейозе это возможно при отсутствии защиты когезина в прицентромерной области комплексом SGO1-PP2A [Hamant et al., 2005]. Выход из мейоза возможен из-за полной деградации циклина и подавления активности циклин-зависимой киназы CDK1 в TI [d'Erfurth et al., 2010].

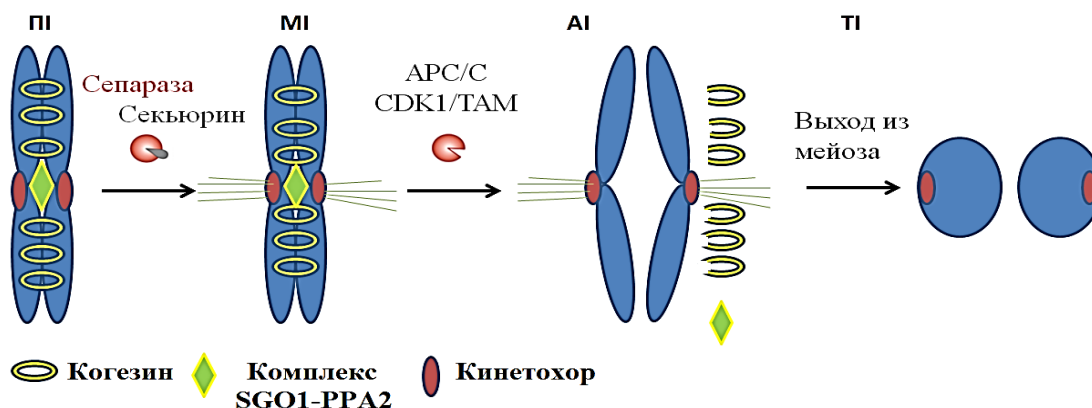


Рисунок 9. Предполагаемая схема реституции у пшенично-ржаных амфигаплоидов с эквационным типом деления

Формирование аппарата деления в мейозе амфигаплоидов с блокированием первого деления мейоза. Второй механизм мейотической реституции – это блокирование первого деления, которое наблюдалось у всех гибридов, кроме $2R(2D)_1 \times R$. По специфике локализации антител к α -тубулину и pH3Ser10 было возможным определение стадии деления клетки (рис. 10).

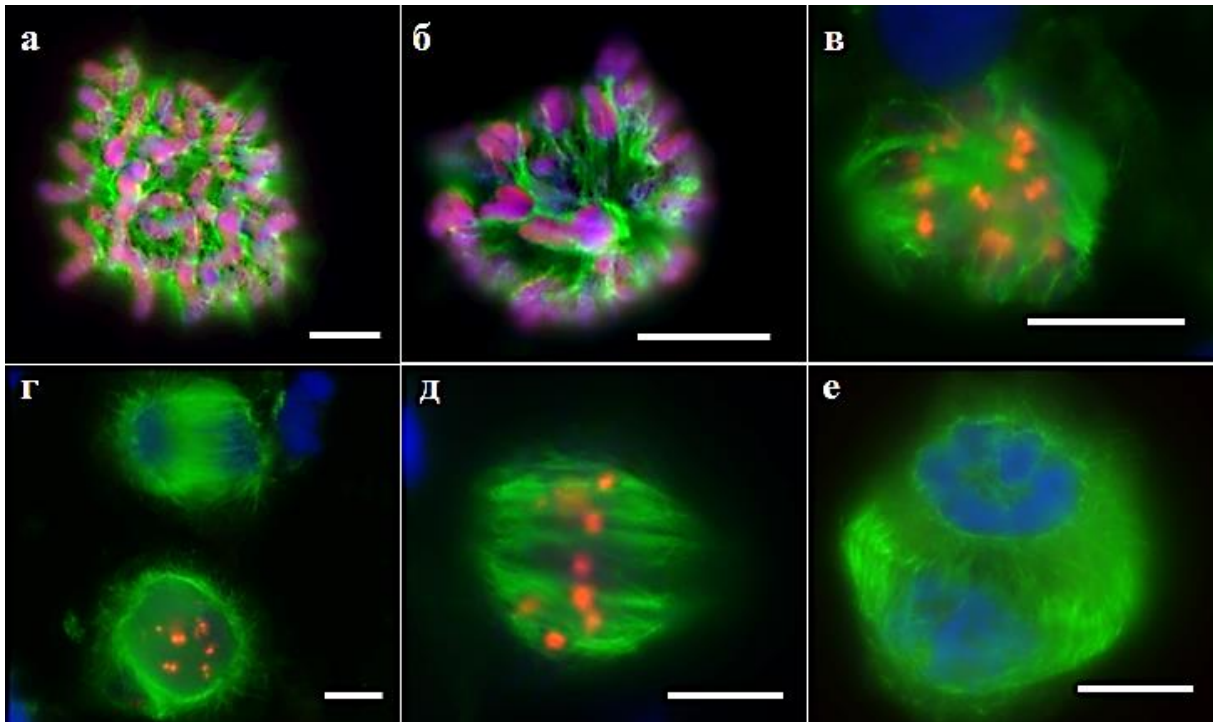


Рисунок 10. Формирование веретена деления и когезия сестринских хроматид в мейозе амфигаплоидов с блокированием первого деления: Иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и pH3Ser10 (красный); а) профаза I; б) метафаза I; в) телофаза I; г) профаза II; д) метафаза II; е) диада. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

В прометафазе I плотно расположенные хромосомы образовывали фигуру круга, нуклеация микротрубочек инициировалась возле хромосом (рис. 10 а). Затем образовывалась конструкция из хромосом, перемещающихся вверх, «шляпа», в которой пучки МТ фокусировались с образованием монополярного веретена (рис. 10 б). В конце первого деления происходила дезорганизация монополярного веретена и декомпактизация хромосом, приводящая к формированию одного нередуцированного ядра (рис. 10 г). Когезия сестринских хроматид в МI соответствовала первому делению мейоза, сохраняясь по всей длине хромосом, затем в ТI ограничивалась центромерным районом (рис. 10 а-в). Во втором делении формировалось нормальное биполярное веретено, когезия сохранялась в области центромеры у всех хромосом (рис. 10 д). Деление завершалось формированием диад после расхождения хроматид (рис. 10 е).

Хромосомы в первом делении имели монополярную ориентацию центромерных районов, что подтверждалось наличием одиночных сигналов иммулокализации CENH3 (рис. 11 а) и плотных точечных сигналов гибридизации центромерного зонда рAet6-09 (рис. 11 б).

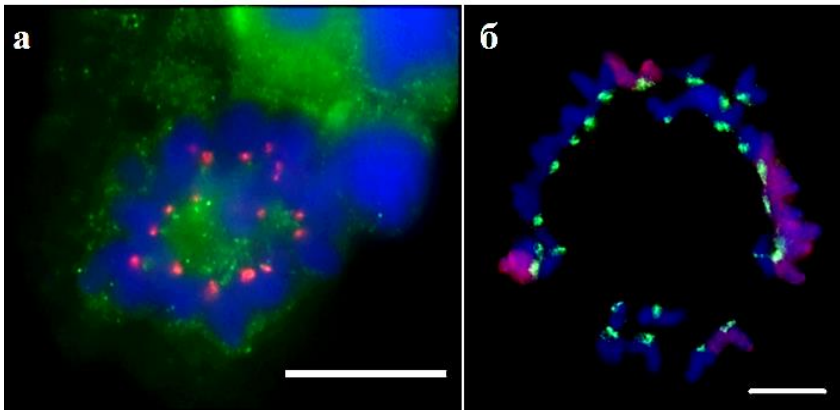


Рисунок 11. Организация центромерной области хромосом в метафазе I у амфигаплоидов с блокированием первого деления:

а) иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый), CENH3 (красный);
 б) FISH с центромеро-специфичным зондом рAet6-09 (зеленый) и ДНК ржи (красный).

Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

Таким образом, данный тип деления отличался и от нормы и от других вышеописанных типов деления, поскольку в первом делении не происходила сегрегация хромосом (в результате образования монополярного веретена). Во втором делении в мейоците формировалось одно веретено деления вместо двух, а в конце мейоза – нередуцированные гаметы.

3. Анализ фертильности гибридов F_1 и F_2 .

Поскольку механизмы реституции частично восстанавливают фертильность отдаленных гибридов, необходимо было определить, какие из гибридных комбинаций способны давать фертильные растения. При самоопылении растений $2R(2D)_1 \times R$, для которых характерен редукционный тип деления, зерна не завязывались, т.е. данные амфигаплоиды были стерильны. У пшенично-ржаных гибридов, полученных с участием замещенных линий 1Rv(1A), 5R(5D), 6R(6A), для которых было показано наличие двух механизмов образования нередуцированных гамет, зерна завязались у двух гибридов 1Rv(1A) \times R, одного - 5R(5D) \times R и четырех - 6R(6A) \times R. Потомки гибридов F_1 различались между собой по числу завязавшихся зерен и их всхожести, а также по фертильности растений F_2 : от полного отсутствия зерен, до 320 зерен с одного растения. Наибольшее число зерен было получено у потомков F_2 от самоопыления гибридов 1Rv(1A) \times R (320 зерен), и 6R(6A) \times R (139 зерен).

Таблица 1. Количество зерен, завязавшихся у пшенично-ржаных гибридов F₁

Гибридная комбинация	№ растения F ₁	количество зерен с растения
C29xR	45-8	8
	45-12	1
5R(5D)xR	95-26	2
1Rv(1A)xR	4-7	6
	4-3	5
6R(6A)xR	9-2	12
	9-1	13
	9-5	1
	9-9	9

ВЫВОДЫ

1. Визуализацией с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации и иммуноокрашивания организации центромерного района, динамики микротрубочек веретена, а также распределения и сохранения когезии на хромосомах получено доказательство тому, что поведение хромосом в мейозе пшенично-ржаных амфигаплоидов соответствует четырем типам деления: редукционному, редукционно+эквационному, эквационному и формированию монополярного веретена в первом делении. Хромосомное замещение 2R/2D определяет преимущественное прохождение редукционного типа деления, а замещения 1Rv/1A, 5R/5D, 6R/6A обуславливают четыре типа поведения хромосом: редукционное деление, редукционно+эквационное, эквационное и формирование монополярного веретена в первом делении.
2. Эквационный тип деления и формирование монополярного веретена являются двумя мейотическими механизмами образования нередуцированных гамет у пшенично-ржаных амфигаплоидов. Эквационный тип характеризуется расхождением сестринских хроматид в первом и единственном делении мейоза. Блокирование первого деления происходит при образовании монополярного веретена, сестринские хроматиды расходятся во втором делении.
3. Замещения хромосом 1Rv/1A, 5R/5D, 6R/6A детерминируют специфические характеристики эквационного расхождения унивалентных хромосом: 1) одноэтапное исчезновение когезии в области плечей и центромерных районов; 2) митотическую организацию центромерных районов, а именно, натяжение ДНК в области первичной перетяжки, а также биполярную ориентацию сестринских кинетохоров.
4. Два варианта поведения хромосом - редукционное и редукционно+эквационное представляют собой автономные типы деления, а не промежуточные стадии первого деления мейоза. Данные типы деления не являются механизмами мейотической реституции.

5. Хромосомное замещение 2R/2D определяет монополярную ориентацию центромерных районов унивалентных хромосом и сохранение когезии сестринских хроматид в первом делении.
6. Эквационный тип деления и формирование монополярного веретена являются мейотическими механизмами восстановления частичной фертильности у пшенично-ржаных гибридов, что было подтверждено завязываемостью зерен у гибридов 1Rv(1A)xR, 5R(5D)xR и 6R(6A)xR.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Логинова Д.Б.**, Силкова О.Г. Митотическое поведение центромер в мейозе как механизм восстановления фертильности у пшенично-ржаных амфигаплоидов // Генетика. - 2014. - Т. 50. - № 8. - С. 930-939.
2. Силкова О.Г., **Логинова Д.Б.** Структурно-функциональная организация центромер у хромосом растений // Генетика. - 2014. - Т. 50. - № 12. - С.1405-1417.
3. Силкова О.Г., **Логинова Д.Б.**, Иванова Ю.Н., Бондаревич Е.Б., Соловей Л.А., Штык Т.И., Дубовец Н.И. Интрогрессия хроматина ржи в геном мягкой пшеницы: цитогенетические аспекты // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2014. - Т. 18. - № 4/1. - С. 630-642.
4. **Логинова Д.Б.**, Силкова О.Г. Фосфорилирование гистона H3Ser10 в клеточном делении у растений // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2016. - Т. 20. - № 1. - С. 87-95.
5. Silkova O.G., **Loginova D.B.** Sister chromatid separation and monopolar spindle organization in the first meiosis as two mechanisms of unreduced gametes formation in wheat-rye hybrids // Plant Reproduction. - 2016. doi: 10.1007/s00497-016-0279-5.
6. **Loginova D.B.**, Kabanenko Yu.N., Silkova O.G. Specific centromere structure of equationally dividing chromosomes in the first meiosis of wheat/rye amphihaploids // 19th international chromosome conference, Dipartimento BiGeA Complesso Belmeloro, Bologna, Italia, 2nd - 6th september 2013, p. 28.
7. **Логинова Д.Б.**, Силкова О.Г. Цитогенетические механизмы формирования стабильного генома у пшенично-ржаных амфидиплоидов // VI Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров и ассоциированные генетические симпозиумы, Россия, Ростов-на-Дону, 15–20 июня 2014, с. 184.
8. **Логинова Д.Б.**, Силкова О.Г. Митоз-подобное деление и мейотическая реституция у пшенично-ржаных амфигаплоидов // XII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук», Россия, Томск, 21-24 апреля 2015, с. 841-843.
9. **Loginova D.B.**, Silkova O.G. Meiosis in wheat-rye hybrids with polyhaploid genomes: the fertility pathway // 3-я Международная конференция "Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений" (PlantGen), Россия, Новосибирск, 17-21 июня 2015, с. 31.
10. **Логинова Д.Б.**, Силкова О.Г. Кинетохорные пучки микротрубочек распределяют хромосомы в мейоцитах в отсутствие центрального веретена // Международная конференция "Хромосома 2015", Россия, Новосибирск, 24-28 августа 2015, с. 118-119.