

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

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

На правах рукописи

ЛОГИНОВА ДИНА БОРИСОВНА

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

Генетика – 03.02.07

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель –
кандидат биологических наук
Силкова О.Г.

Новосибирск – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Полиплоидия как особенность геномов растений.....	12
1.1.1. Типы полиплоидии.....	12
1.1.2. Преимущества полиплоидии	17
1.1.3. Реорганизация генома полиплоидов.....	19
1.2. Мягкая пшеница и ее межвидовые/межродовые гибриды. Расширение генофонда мягкой пшеницы.....	22
1.2.1. Особенности генома пшеницы, связанные с полиплоидизацией.....	22
1.2.2. Контроль спаривания хромосом: локус <i>Ph1</i>	26
1.2.3. Увеличение генетического разнообразия мягкой пшеницы.....	29
1.3. Мейотическая реституция у растений.....	35
1.3.1. Основные механизмы образования нередуцированных гамет.....	35
1.3.2. Механизмы реституции при реконструкции генома пшеницы и ее гибридов.....	47
1.4. Заключение.....	55
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	56
2.1. Материалы.....	56
2.2. Методы.....	57
2.2.1. Трансформация компетентных клеток <i>E.coli</i>	58
2.2.2. Выделение плазмидной ДНК из клеток <i>E.coli</i>	58
2.2.3. Выделение суммарной ДНК растений.....	59
2.2.4. Мечение ДНК-зонда.....	60
2.2.5. Приготовление давленных препаратов митотических хромосом.....	60
2.2.6. Флуоресцентная <i>in situ</i> гибридизация.....	61
2.2.7. Иммуноокрашивание.....	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	65
3.1. Анализ влияния пшенично-ржаного замещения хромосом на характер	

мейоза у гибридов.....	65
3.2. Поведение хромосом с прямой визуализацией динамики микротрубочек, организации хромосом и их центромерных районов.....	69
3.2.1. Митоз и мейоз у родительских форм.....	69
3.2.2. Формирование аппарата деления в мейозе амфигаплоидов с редуционным типом деления.....	78
3.2.3. Формирование аппарата деления в мейозе амфигаплоидов с редуционно+эквационным типом деления.....	82
3.2.4. Формирование аппарата деления в мейозе амфигаплоидов с эквационным типом деления.....	85
3.2.5. Формирование аппарата деления в мейозе амфигаплоидов с блокированием первого деления мейоза.....	90
3.3. Анализ фертильности пшенично-ржаных гибридов F_1 и F_2	94
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	98
4.1. Генетическая регуляция реституции у пшенично-ржаных гибридов.....	98
4.2. Монополярное веретено и эквационное деление могут быть причиной реституции у пшенично-ржаных амфигаплоидов.....	102
4.3. Эквационное деление, приводящее к реституции, сочетает характеристики митотического и мейотического деления.....	107
4.4. Предположительный механизм деления, подобного митозу, у пшенично-ржаных гибридов.....	110
4.5. Формирование монополярного веретена у амфигаплоидов.....	114
4.6. Гибриды $2R(2D)_1 \times R$ являются удобными моделями для изучения динамики МТ в мейозе.....	115
4.7. Формообразование и продуктивность гибридов F_2	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	120
ВЫВОДЫ.....	122
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	124

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- APC/C - англ. Anaphase Promoting Complex – комплекс, стимулирующий анафазу (циклосома)
- BSA - бычий сывороточный альбумин
- CENH3 - англ. Centromere-specific Histone H3 - центромерный вариант гистона H3
- DAPI - англ. 4,6-Diamidino-2-Phenylindole, 4,6-диамидино-2-фенилиндол
- FA – формамид
- FDR - англ. First Division Restitution – реституция в первом делении
- FISH/GISH - англ. Fluorescence/Genomic *In situ* Hybridization – флуоресцентная/геномная *in situ* гибридизация
- PBS - англ. Phosphate Buffered Saline – натрий-фосфатный буфер
- PFA – параформальдегид
- phH3Ser10 - англ. phosphorylated histon H3 on serine 10– фосфорилированный гистон H3 по серину в 10 положении
- QTL – англ. Quantitative Trait Loci - локус количественного признака
- SDR - англ. Second Division Restitution – реституция во втором делении
- SDS – англ. Sodium Dodecyl Sulfate, додецилсульфат натрия
- SSC – англ. Saline-Sodium Citrate buffer – цитратный буфер
- Tris - трис(гидроксиметил)аминометан
- AI/AII – анафаза первого/второго деления мейоза
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- MI/MII – метафаза первого/второго деления мейоза
- ед. акт. – единиц активности
- МКП – материнские клетки пыльцы
- МТ-микротрубочки
- п.о. (т.п.о.) – пар оснований (тысяч пар оснований)
- PI/PII – профазы первого/второго деления мейоза
- ППК - препрофазное кольцо
- с/х - сельскохозяйственный
- TI/TII – телофаза первого/второго деления мейоза
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- ЯО - ядерная оболочка

ВВЕДЕНИЕ

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 изучения фундаментальных аспектов эволюции, но также необходимо в селекционных программах для восстановления частичной фертильности после отдаленной гибридизации, используемой для получения новых сортов с сельскохозяйственно-ценными признаками.

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-3В [Hao et al., 2014], являющийся геном ортологом *cus1;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. мейоза [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 в мейозе у пшенично-ржаных гибридов F_1 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 F_1 *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 F_1 и F_2 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 CENH3.
- 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 F₁. 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 позволяют частично восстанавливать фертильность гибридов F₁, 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 центромерного района и одноэтапным исчезновением когезии с плечей и центромерного 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..

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.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю к.б.н. Силковой О.Г., а также сотрудникам сектора цитогенетики злаков Барсук Л.Г., Суминой Л.И., Ивановой Ю.Н. за помощь в получении гибридов, в работе с растениями и моральную поддержку. Автор благодарит к.б.н. Адонину И.Г. за помощь в освоении метода флуоресцентной *in situ* гибридизации, лабораторию д.б.н. Салиной Е.А. за техническую поддержку и к.б.н. Сидорчука Ю.В. за помощь в освоении метода иммуноокрашивания. Автор благодарит сотрудников Центра

коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН к.б.н. Байбородина С.И., и Алешину Т.Е. за обеспечение технического сопровождения, а также сотрудников центров коллективного пользования Селекционно-Генетического комплекса и Лаборатории искусственного выращивания растений.

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, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах из списка ВАК:

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Полиплоидия как особенность геномов растений

1.1.1. Типы полиплоидии

Автополиплоиды и аллополиплоиды. Полиплоидия (греч. polyploos — многократно повторяющийся, eidos — вид) — это кратное увеличение числа наборов хромосом. В зависимости от происхождения и генетического состава геномов принято разделять полиплоиды на автополиплоиды и аллополиплоиды [Stebbins, 1947; Levin, 2002; Madlung, Wendel, 2013]. Автополиплоидия — это кратное увеличение числа наборов хромосом в клетках растения одного и того же биологического вида. Наличие более двух наборов гомологичных хромосом у автополиплоидов, помимо бивалентов, часто приводит к образованию мультивалентов и/или неспаренных (унивалентных) хромосом, [Morrison, Rajhathy, 1960; Levin, 2002; Ramsey, Schemske, 2002]. Мультиваленты и униваленты неправильно разделяются в первой и второй анафазе, что ведет к формированию гамет с различным числом хромосом (анеуплоидия) [Rommel, 1965; Ramsey, Schemske, 2002]. Такие гаметы не всегда жизнеспособны, что может приводить к стерильности автополиплоидов. Примерами автополиплоидных растений могут служить с/х ценные культурные растения, такие как картофель, банан, сахарная свекла и сахарный тростник [Rommel, 1965; Bretagnolle, Thompson, 1995; Udall, Wendel, 2006; Heslop-Harrison, Schwarzacher, 2007].

Аллополиплоидия — это кратное увеличение числа хромосом у растений, возникающее при межвидовой и межродовой гибридизации. Гомеологичные хромосомы аллополиплоидов, пришедшие от разных видов, не спариваются, что приводит к преимущественному образованию бивалентов только гомологичных хромосом [Stebbins, 1947; Levin, 2002], их дисомному наследованию и фертильности растений. В некоторых аллополиплоидах вместе с бивалентами может наблюдаться гомеологичное спаривание хромосом, или образование мультивалентов, такие «промежуточные формы» называют сегментными

аллополиплоидами [Stebbins, 1947; Levin, 2002; Otto, 2007]. Примерами аллополиплоидных растений могут служить аллотриплоидные и аллотетраплоидные растения банана (род *Musa*), аллотетраплоидные растения пшеницы *Triticum turgidum* и хлопчатника *Gossipium hirsutum*, *G. barbedense*, а также аллогексаплоидная пшеница *Triticum aestivum* [Sears, 1969; Wendel, 1989; Bretagnolle, Thompson, 1995; Udall, Wendel, 2006; Heslop-Harrison, Schwarzacher, 2007]. К аллополиплоидам также относятся аллотетраплоидный вид *Brassica napus*, образованный в результате гибридизации *B. oleracea* и *B. rapa* [Lysak et al., 2005], и *Arabidopsis suecica*, образованный при гибридизации *A. thaliana* и *A. arenosa* [O'Kane et al., 1997; Jakobsson et al., 2006].

Хотя существует несколько механизмов образования полиплоидов, считается, что большинство полиплоидных растений формируется в результате спонтанного образования и слияния диплоидных ($2n$) гамет [Bretagnolle, Thompson, 1995; Ramsey, Schemske, 1998]. Восстановление соматического числа хромосом (образование нередуцированных гамет) при блокировании одного из делений в мейозе получило название мейотической ядерной реституции. Частота формирования нередуцированных гамет у разных видов может изменяться и зависит от условий окружающей среды [Ramsey, Schemske, 1998; Cai, Xu, 2007; Ramanna, Jacobsen, 2003]. По некоторым оценкам, образование нередуцированных гамет в природных популяциях происходит с частотой 0.56% [Ramsey, Schemske, 1998] и 0.1-2% [Ramsey, 2007], в то время как образование таких гамет у межвидовых гибридов F_1 значительно выше и достигает 27.52% [Ramsey, Schemske, 1998]. Частота образования $2n$ гамет может увеличиваться при снижении температур [De Storme et al., 2012], что могло бы объяснить преобладание полиплоидных видов в зонах с холодным климатом [Grant, 1981; Brochmann et al., 2004].

Автополиплоиды возникают в результате спонтанной дупликации генома (рис. 1.1 а) или при гибридизации между различными растениями в пределах одного вида (внутривидовая гибридизация), что предполагает образование и слияние нередуцированных гамет (рис. 1.1 б) [Ranney, 2006; Hegarty, Hiscock, 2008]. В первом случае, в результате соматических мутаций (например, нарушения митоза), может происходить удвоение числа хромосом в клетках меристемы, что

приводит к формированию полиплоидного побега. Если на данном побеге развиваются репродуктивные органы, геном полученных гамет будет полиплоидным (рис. 1.1 а) [Ranney, 2006; Tayalé, Parisod, 2013]. Во втором случае, при скрещивании диплоидных растений одного вида могут образоваться автотриплоиды, при слиянии нормальной гаплоидной и нередуцированной $2n$ гаметы, или автотетраплоиды, при слиянии двух нередуцированных гамет (рис. 1.1 б). Тетраплоидные растения также могут быть получены скрещиванием триплоидных и диплоидных растений, в случае образования у триплоидного растения жизнеспособных гамет (рис. 1.1 б) [Hegarty, Hiscock, 2008; Tayalé, Parisod, 2013]. Более высокие уровни плоидности могут быть получены при скрещивании автополиплоидных растений одного или разного уровня плоидности при условии их фертильности и возможности образования нередуцированных гамет.

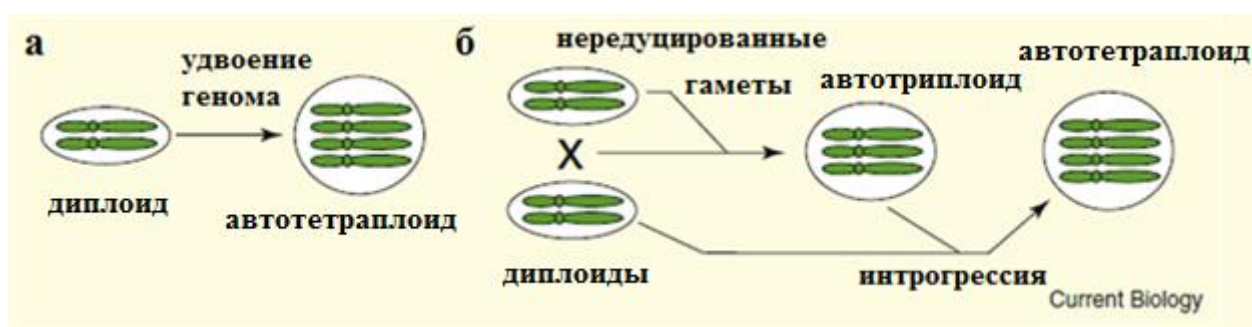


Рисунок 1.1. Возможные пути получения автополиплоидов [по Hegarty, Hiscock, 2008].

Образование аллополиплоидов, как правило, происходит при гибридизации двух (или более) видов, состоящих в дальнем родстве. В настоящее время описаны несколько путей возникновения аллополиплоидного генома [Ramsey, Schemske, 2002; Hegarty, Hiscock, 2008]. Такие растения могут возникнуть в результате удвоения генома в потомстве жизнеспособных гибридов F_1 (рис. 1.2 а). В некоторых случаях образование аллополиплоидов может происходить в результате слияния нередуцированных гамет или соматического удвоения генома в зиготе при скрещивании растений диплоидных видов (рис. 1.2 г) [Ramsey, Schemske, 2002; Hegarty, Hiscock, 2008]. Кроме того, аллополиплоиды могут быть получены скрещиванием полиплоидных видов между собой или с диплоидными видами (рис. 1.2 б,в,д).

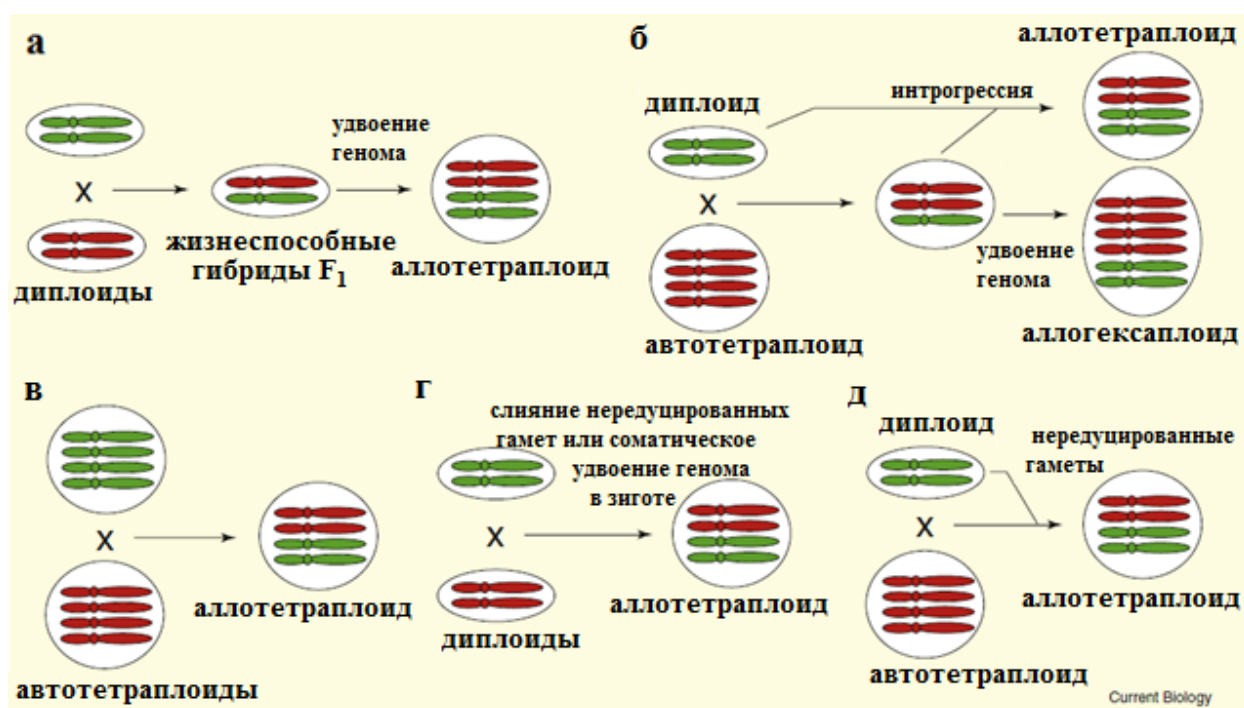


Рисунок 1.2. Возможные пути получения аллополиплоидов [по Hegarty, Hiscock, 2008].

Неополиплоиды и палеополиплоиды. Недавно образованные (не более 150 лет назад) полиплоиды принято называть неополиплоидами. Примером таких растений могут служить аллотетраплоидные виды *Tragopogon miscellus* и *T. mirus*, образованные в результате гибридизации нескольких завезенных в Америку из Европы видов козлородника [Tate et al., 2006]. Образование *T. miscellus* произошло приблизительно 100 лет назад в результате гибридизации диплоидных *T. dubius* и *T. pratensis*, примерно в то же время произошло образование *T. mirus* в результате гибридизации *T. dubius* и *T. porrifolius* [Tate et al., 2006]. Среди наиболее известных неополиплоидов можно также отметить виды крестовника *Senecio cambrensis*, *S. eboracensis* [Abbott et al., 2005, 2007] и Спарты изящной *Spartina anglica* [Ainouche et al., 2004]. Геном неополиплоидов претерпевает изменения, связанные с генетической и цитологической диплоидизацией, такие как хромосомные перестройки, изменения экспрессии генов и другие [Ramsey, Schemske, 2002]. Так, в геноме *T. miscellus* и *T. mirus* наблюдаются моносомия и трисомия по некоторым хромосомам (анеуплоидия), показаны транслокации гомеологичных хромосом, а также эпигенетические изменения [Lim et al., 2008; Chester et al., 2012]. Разные популяции вида козлородника имеют свой набор генетических и эпигенетических отклонений от предковых видов [Ramsey,

Schemske, 2002; Lim et al., 2008; Chester et al., 2012]. Для гексаплоидного *S. cambrensis* также была показана значительная реорганизация генома и изменение экспрессии генов [Hegarty et al., 2006; Abbott et al., 2007]. Однако у вида *S. anglica* не наблюдалось значительных изменений генома в результате полиплоидизации [Baumel et al., 2002; Renny-Byfield et al., 2010]. Фенотипические отличия от предковых видов и между растениями в разных популяциях *S. anglica* обеспечивались, главным образом, эпигенетическими изменениями (метилирование ДНК), которые приводили к изменению экспрессии генов [Parisod et al., 2009; Chelaifa et al., 2010].

Первые работы, посвященные оценке частоты встречаемости полиплоидов среди покрытосеменных растений, были основаны на исследованиях кариотипов. Согласно этим оценкам, от 30 до 70% цветковых растений являются полиплоидными [Darlington, 1937; Stebbins, 1950; Grant, 1963; Goldblatt, 1980]. Позднее было показано, что большинство, если не все современные покрытосеменные растения - палеополиплоиды [Otto, Whitton 2000; Cui et al., 2006; Leitch, Leitch, 2008]. Палеоплоидия — это полиплоидизация, которая произошла, по крайней мере, несколько миллионов лет назад. С развитием молекулярных методов были найдены доказательства существования одного или более древних событий дупликации генома у всех покрытосеменных [Amborella Genome Project, 2013; Renny-Byfield, Wendel, 2014]. Анализ генома и транскриптома у 8 палеополиплоидов показал, что события палеоплоидизации включают как автополиплоидию (показано для банана, сои и тополя), так и аллополиплоидию (арабидопсис, люцерна, капуста, сорго и кукуруза) [Garsmeur et al., 2013]. В результате реорганизации генома большинство палеополиплоидных растений в процессе эволюции теряют свой полиплоидный статус и в настоящее время считаются диплоидами. Для семейства *Poaceae* (*Gramineae*, злаки) предполагается несколько независимых событий дупликации генома [Soltis et al., 2009], однако многие растения, относящиеся к данному семейству, диплоидны. Ярким примером диплоидизации могут служить растения цингерии (*Zingeria biebersteiniana*) и колподиума (*Colpodium versicolor*) (сем *Poaceae*), геномы которых состоят всего из 4 хромосом ($2n=4$) [Kim et al., 2009]. Сокращение числа хромосом произошло, предположительно, несколько миллионов лет назад в результате многочисленных

тандемных слияний хромосом [Kim et al., 2009]. К палеополиплоидам также относятся такие диплоидные растения как хлопчатник [Muravenko et al., 1998], кукуруза [Gaut, 2001], рис [Zhang et al., 2005] и арабидопсис [Grant et al., 2000; Blanc et al., 2003; Bowers et al., 2003].

Таким образом, на сегодняшний день полагается, что дупликация целого генома является основной движущей силой в эволюции растений [Chen, 2010; Mayfield et al., 2011]. Так, удвоение генома привело к резкому увеличению видового разнообразия в нескольких семействах покрытосеменных, в том числе *Poaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, и *Brassicaceae* [Soltis et al., 2009]. Согласно Родионову [2013], в истории всех таксонов современных цветковых растений неоднократно повторялся цикл, включающий межвидовую гибридизацию, сопровождающуюся множественными генетическими и эпигенетическими изменениями с последующей стабилизацией гибрида вследствие постепенной утраты части генов и хромосом, и постепенной диплоидизацией аллополиплоидного генома. Исследования, направленные на изучение генетических и эпигенетических изменений у неополиплоидов, палеополиплоидов и искусственно воссозданных (синтетических) полиплоидных видов (пшеница, арабидопсис, капуста), позволяют установить основные закономерности эволюции и видообразования растений [Soltis, Soltis, 2009; Madlung, Wendel, 2013].

1.1.2. Преимущества полиплоидии

Основными преимуществами полиплоидов считают гетерозис, способность восстановления фертильности или возможность появления бесполого размножения, и генетическую избыточность [Comai, 2005; Birchler et al., 2010; te Beest et al., 2012]. Гетерозис, наблюдаемый при скрещивании разных сортов одного вида или разных видов между собой, приводит к увеличению биомассы, скорости развития, и/или других ценных признаков у гибридов по сравнению с тем и другим родителями [Lippman, Zamir, 2007; Birchler et al., 2010]. Объединение максимально различающихся родительских геномов у аллополиплоидных растений вызывает «прогрессивный гетерозис», т.е. гетерозис с большей силой [Birchler et al., 2010]. Например, триплоидные формы сахарной свеклы превосходят диплоидные

растения по весу корнеплодов, а также по выходу сахара и по количеству сухого вещества [Peto, Boyes, 1940]. В отличие от диплоидных гибридов, где гетерозис теряется в последующих поколениях из-за гомологичной рекомбинации, гетерозис у аллополиплоидов стабилен из-за преобладающего дисомного спаривания гомологичных хромосом и отсутствия спаривания гомеологов [Comai, 2005]. Гибридный гетерозис является очень важным для с/х, так как 65% или более культур выращиваются в гибридной форме, и увеличение урожайности в гибридах, относительно родительских видов, составляет от 15 до 50% [Lippman, Zamir, 2007].

У полиплоидных растений может наблюдаться снижение инбредной депрессии [Rausch, Morgan, 2005]. Также, полиплоидия тесно связана с апомиксисом (вид бесполого размножения при котором образование семян происходит, минуя нормальный мейоз и слияние яйцеклетки и сперматозоида) [Comai, 2005]. Кратковременный апомиксис может обеспечить селективное преимущество, способствующее выживанию и распространению вида. Кроме того, в некоторых случаях полиплоиды переходят к бесполому размножению. Например, триплоидные растения зачастую стерильны, поскольку несут несбалансированное число хромосом (3 гаплоидных набора). Такие растения не способны размножаться половым путем, однако, они способны к вегетативному размножению, как, например, некоторые культивируемые автотриплоидные растения, такие как банан [Heslop-Harrison, Schwarzacher, 2007].

Избыточность генетического материала (наличие нескольких наборов хромосом), возникающая при полиплоидизации, увеличивает пластичность генома и повышает конкурентоспособность полиплоида по сравнению с диплоидными предшественниками [Adams, Wendel, 2005a,б; Leitch, Leitch, 2008]. Увеличение числа аллелей генов позволяет маскировать вредные рецессивные мутации [Gu et al., 2003]. Под маскировкой мутаций в геноме полиплоидов подразумевается то, что мутация в одной копии гена может быть полностью нивелирована нормальной работой гомеологичных копий [Matzke, Matzke 1998; Otto, Whitton, 2000]. Кроме того, дублицированные копии генов могут приобретать новые функции (нео- или субфункционализация), что позволяет полиплоидам занимать новые экологические ниши или обладать большей устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессам [Adams, Wendel, 2005б; Moore, Purugganan, 2005; Lynch, 2007;

Madlung, 2013]. Пластичность генома обеспечивается эпигенетическими изменениями в экспрессии гомеологов, неофункционализацией гомеологичных копий и появлением новых генов в результате реорганизации генома [Hegarty, Hiscock, 2008]. Так, гексаплоидная пшеница *T. aestivum* L. более устойчива к засолению почв, чем тетраплоидная и диплоидная, вследствие работы гена *HKT1;5* D-генома (High-Affinity K⁺ Transporter 1;5), пришедшего от *Ae. tauschii* Coss. [Yang et al., 2014]. Кроме того, увеличение экспрессии гена *TaRSL4* (*T. aestivum* Root Hair Defective6-like 4) в тетраплоидной пшенице, относительно диплоидных растений, привело к увеличению длины корневых волосков и, вероятно, его большей устойчивости к условиям недостатка питательных веществ [Han et al., 2015].

1.1.3. Реорганизация генома полиплоидов

Наличие нескольких наборов хромосом и, следовательно, копий генов у авто- и аллополиплоидов приводит к реорганизации генома, связанной с генетической и цитологической диплоидизацией. Еще Барбара МакКлинтон предполагала, что гибридизация или удвоение хромосом вызывают «геномный шок», приводящий к быстрой реорганизации генома, способствующей выживанию и образованию нового вида [McClintock, 1984]. Исследования реорганизации генома чаще всего проводятся на синтетических полиплоидах, а также на нео- и палеополиплоидах, у которых сохранились современные представители предковых родительских видов [Renny-Byfield et al., 2012; Madlung, Wendel, 2013]. Аллополиплоиды сталкиваются с множеством проблем, связанных с различиями в размере хромосом, асинхронностью их конденсации и ошибками/неспособностью спаривания, что приводит к более серьезной реорганизации генома, чем у автополиплоидов [Chen, 2007; Jones, Hegarty, 2009].

Как у авто-, так и у аллополиплоидов во время и сразу после полиплоидизации наблюдается быстрая потеря последовательностей ДНК и сокращение размера генома [Leitch, Bennett, 2004; Eilam et al., 2010; Parisod et al., 2010]. Однако данные изменения наиболее характерны для аллополиплоидов и являются результатом элиминации повторяющихся последовательностей ДНК [Liu et al., 1998а,б; Ozkan et al., 2001, 2003; Han et al., 2005; Tate et al., 2009; Renny-Byfield et al., 2013].

Реорганизация хромосом при полиплоидизации включает также хромосомные перестройки, потерю или дупликацию отдельных хромосом (анеуплоидия) [Gaeta et al., 2007, Xiong et al., 2011; Zhang et al., 2013а,б]. Множественные хромосомные перестройки и анеуплоидия были показаны у синтетических аллотетраплоидных линий *Brassica napus* [Gaeta et al., 2007, Xiong et al., 2011]. Для синтетических пшениц *T. aestivum* S₀-S₂₀ была показана анеуплоидия, но хромосомные перестройки отсутствовали, предположительно, благодаря подавлению гомеологичной рекомбинации (локус *Ph1*) [Zhang et al., 2013б]. Выявленная анеуплоидия была охарактеризована как «скрытая», с сохранением эуплоидного числа хромосом $2n = 42$ при одновременной потере одних и дупликации других, не гомеологичных хромосом. Чаще всего элиминация хромосом происходила у субгенома В, а D субгеном оставался стабильным в большинстве изученных линий [Zhang et al., 2013б]. Интересно отметить, что синтетическая аллотетраплоидная пшеница (аналог *T. turgidum*) характеризовалась более стабильным кариотипом и отличалась от родительских растений преимущественно по количеству повторяющихся ДНК и вариабельностью числа копий гомеологичных генов (CNVs, gene copy-number variations), вызванных незначительными хромосомными перестройками в геноме [Zhang et al., 2013а].

Полиплоидизация часто сопровождается активацией мобильных элементов (МЭ) [Chen, 2007], которая может приводить к реорганизации хромосом [McClintock, 1984] и изменению в структуре и экспрессии близких к ним генов [Chen, 2007; Parisod et al., 2009]. Однако активация МЭ не всегда сопровождается их перемещением, как было показано для синтетических аллополиплоидов арабидопсиса [Beaulieu et al., 2009], или в природной популяции аллополиплоидного *S. anglica* [Ainouche et al., 2009].

Полиплоидизация может приводить к изменениям в уровне экспрессии генов, при этом может наблюдаться не-аддитивная экспрессия (значительно отличающиеся от средне-родительского значения), проявляющаяся в сверхэкспрессии или инактивации генов, и субфункционализация - дивергенция функции или уровня экспрессии дублированных генов в различных органах и тканях [Adams, Wendel, 2005а; Chen, 2007; Jones, Hegarty, 2009; Buggs et al., 2014; Song, Chen, 2015]. В некоторых случаях уровень экспрессии дублированных

генов аллополиплоида эквивалентен одному из видов-предшественников, данный феномен был назван доминантной экспрессией [Grover et al., 2012].

Не аддитивные изменения экспрессии генов при полиплоидизации не являются случайными. Для крестовника, кукурузы и арабидопсиса было показано, что они затрагивают, в основном, гены, которые участвуют в 1) регуляции и инактивации генов, 2) метаболизме, 3) развитии органов цветка и 4) в генах, определяющих устойчивость к вредителям [Wang et al., 2006; Stupar et al., 2007; Hegarty et al., 2008]. У пшеницы инактивации подвергались, в основном, гены рибосомальных РНК, устойчивости к болезням, а также участвующие в метаболизме и регуляции клеточного цикла [Kashkush et al., 2002].

Эпигенетические изменения могут быть связаны с изменением картины метилирования ДНК [Liu, Wendel, 2003; Hegarty et al., 2011; Lavania et al., 2012], активацией мобильных элементов [Kashkush et al., 2003; Madlung et al., 2005; Parisod et al., 2009] и ремоделированием хроматина [Liu, Wendel, 2003]. В некоторых случаях транскрипционная инактивация приводит к преимущественному сайленсингу генов рРНК в одном из субгеномов вследствие ядрышкового доминирования [Senecio - Hegarty et al., 2005, 2006; *Arabidopsis* – Chen et al., 1998].

Причиной эпигенетических изменений при полиплоидизации, кроме транскрипционной инактивации, могут быть альтернативный сплайсинг [Madlung et al., 2005; Zhou et al., 2011] и генная конверсия [McClintock, 1984; Jones, Hegarty, 2009; Salmon et al., 2010; Flagel et al., 2012]. Под генной конверсией понимается изменение в последовательности ДНК вследствие не реципрокного обмена генетической информации (одна из гомологичных хромосом служит донором, а другая реципиентом генетической информации) [McClintock, 1984]. Анализ транскрипта в аллополиплоидах хлопчатника показал генную конверсию 5% всех генов, которая могла приводить к образованию новых или химерных генов, которые не обнаруживаются у диплоидных родителей [Salmon et al., 2010; Flagel et al., 2012]. Генная конверсия может больше затрагивать один из субгеномов [Paterson et al., 2012]. Накопление событий генной конверсии, наряду с обменом повторяющейся ДНК и транслокациями может способствовать гомогенизации субгеномов и диплоидизации [Lim et al., 2007; Renny-Byfield et al., 2013].

1.2. Мягкая пшеница и ее межвидовые/межродовые гибриды. Расширение генофонда мягкой пшеницы

1.2.1. Особенности генома пшеницы, связанные с полиплоидизацией

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L., AABBDD геном) - аллогексаплоидное растение, которое образовалось в результате естественной гибридизации тетраплоидной пшеницы *Triticum turgidum* L. ($2n = 4x = 28$, AABB геном) и диплоидного эгилопса *Aegilops tauschii* Coss. ($2n = 2x = 14$; DD геном), выступающих как женский и мужской предшественник соответственно [Matsuoka, 2011; Feldman, Levy, 2012]. Предполагается, что гексаплоидная пшеница является результатом множественных событий аллополиплоидизации культивируемой domesticiрованной тетраплоидной пшеницы, искусственно занесенной людьми в область естественного ареала произрастания *Ae. tauschii* [Matsuoka, 2011]. Первые упоминания о гексаплоидной пшенице датируются 8.6-7.8 тыс. лет назад на юго-востоке Турции [Matsuoka, 2011]. Донором генома А считается диплоидная пшеница *T. urartu* ($2n = 2x = 14$; геном AA), в то время, как прародитель В генома, остается неопределенным, так как дикие виды с высокой степенью гомологии к В геному пшеницы не были найдены. Идентификация предкового растения-донора генома В затрудняется тем, что образование тетраплоидной пшеницы произошло в интервале 500-300 тыс лет назад [Huang et al., 2002]. Существует две основные точки зрения относительно происхождения В-генома: монофилетическое (от одного предкового вида *Aegilops*) и полифилетическое (в результате интрогрессии нескольких видов *Aegilops*) происхождения [Salse et al., 2008]. Согласно последним молекулярным данным, геном В может быть связан с *Ae. speltooides* секции *Sitopsis* [Salina et al., 2006; Kilian et al., 2007].

Геном пшеницы *Triticum aestivum* L. является одним из самых больших среди Poaceae: $2n = 6x = 42$, $1C = 17.33$ (количество ДНК в гаплоидном наборе хромосом), что составляет 14 пикограмм или 211 т.п.о., что в 36 раз больше, чем геном *Brachypodium sylvaticum* ($2n = 4x = 28$, $1C = 0.48$), в 7.3 раза больше *Zea mays* ($2n = 2x = 20$, $1C = 2.73$), и в 2 раза больше *Secale cereale* ($2n = 2x = 14$ $1C = 8.28$) [Jones, Pasakinskien, 2005]. Он состоит из 3 субгеномов: А, В, D и на основании

генетического сходства, 21 пара гомологичных хромосом разделена на 7 гомеологичных групп, каждая из которых содержит по 1 паре хромосом от А, В и D геномов (рис. 1.3) [Sears, 1969]. В каждой группе, гомеологичные хромосомы, пришедшие от родственных диплоидных предшественников, имеют схожий состав генов (синтению) и гомологичные последовательности ДНК, но различаются по некодирующим последовательностям, высокоповторенным ДНК последовательностям и функциональным генным комплексам [Levy, Feldman, 2004; Wicker et al., 2011].

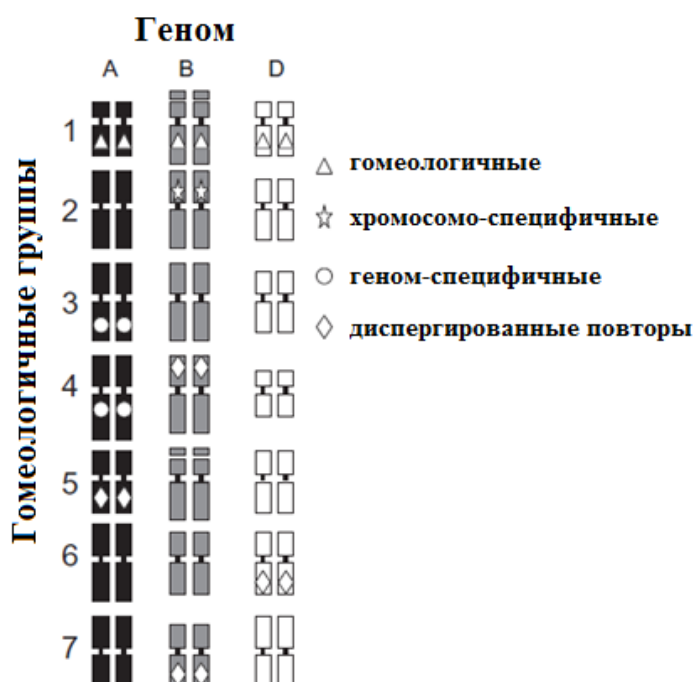


Рисунок 1.3. Схема кариотипа гексаплоидной пшеницы *Triticum aestivum* L., разделенного на семь гомеологичных групп [Levy, Feldman, 2004]. Геометрическими фигурами обозначены: гомеологичные последовательности, хромосома-специфичные последовательности (CSSs), геном-специфичные последовательности (GSSs), и диспергированные повторы (мобильные элементы).

Feldman и Levy разделили последовательности ДНК в геноме пшеницы *T. aestivum* L. на 4 группы (рис. 1.3): 1) неспецифичные (диспергированные повторы), 2) группно-специфичные (гомеологичные), 3) геном-специфичные (GSSs), и 4) хромосома-специфичные последовательности (CSSs) [Feldman et al., 1997; Feldman, Levy, 2012]. К неспецифичным относятся последовательности, которые присутствуют на большинстве или всех хромосомах, представленные главным образом мобильными элементами. К группно-специфичным последовательностям

относятся, в основном, кодирующие последовательности, которые присутствуют на гомеологичных хромосомах. Большинство геном-специфичных и хромосомо-специфичных последовательностей - это некодирующие последовательности, которые могут встречаться более чем на одной паре хромосом, но только в одном из геномов (GSSs) или присутствуют только в одной гомологичной паре хромосом (CSSs). Показано, что GSSs и CSSs встречаются во всех диплоидных видах *Aegilops* и *Triticum*, но присутствуют только в одном геноме или в 1 паре хромосом, соответственно [Feldman et al., 1997; Feldman, Levy, 2012]. Специфичность распределения GSSs и CSSs в геноме пшеницы вызвана элиминацией некодирующих высоко- и низкокопийных последовательностей во время или после полиплоидизации [Feldman et al., 1997; Ozkan et al., 2001, 2003; Han et al., 2003; Salina et al., 2004; Eilam et al., 2008; Feldman, Levy, 2012]. Как следствие такой элиминации, CSSs обнаруживаются на каждой гомологичной паре, но разные гомеологичные пары имеют свой уникальный набор CSSs, это обеспечивает физические различия, делающие затруднительным их спаривание в мейозе, что приводит к цитологической диплоидизации [Feldman et al., 1997; Feldman, Levy, 2012; Renny-Byfield, Wendel, 2014]. Различия в GSSs между тремя субгеномами гексаплоидной пшеницы, определяемые в литературе как геномная асимметрия, также обеспечивают цитологическую диплоидизацию генома пшеницы [Feldman, Levy, 2009; Feldman, Levy, 2012].

Важно также отметить, что кроме сокращения числа некодирующих последовательностей, для современных представителей гексаплоидной пшеницы показана также реорганизация хромосом, включающая хромосомные перестройки, такие как инверсии и транслокации [Badaeva et al., 2007], что может быть причиной сортовых (фенотипических) различий. Так, при цитогенетическом анализе геномов 252 различных линий гексаплоидной пшеницы, в 69 линиях была выявлена реорганизация одной или нескольких хромосом [Badaeva et al., 2007]. Наличие данных изменений в геноме может быть связано с селекцией, направленной на приспособление к различным факторам, и являться результатом спонтанных мутаций, поскольку при получении синтетической гексаплоидной пшеницы хромосомные перестройки не наблюдались, предположительно в результате активности локуса *Ph1* [Zhang et al., 2013б].

Однако, как было показано с помощью анализа полиморфизма рестрикционных фрагментов (RFLPs, restriction fragment length polymorphism), микросателлитов (SSRs, simple sequence repeats), однонуклеотидных замен (SNPs) и цитогенетического анализа, реорганизация генома гексаплоидной пшеницы в разной степени затрагивает три субгенома: наиболее реорганизован В-субгеном, затем А-субгеном, а D-субгеном меньше всего подвергся реорганизации [Roder et al., 1998; Badaeva et al., 2007; Akhunov et al., 2010; Allen et al., 2011]. Существует три основных гипотезы, объясняющих структурную асимметрию трех субгеномов пшеницы [Murat et al., 2014]. Согласно первой гипотезе, структурная асимметрия между субгеномом В и субгеномами А и D могла возникнуть до полиплоидизации. Предполагается, что преимущественная реорганизация В-субгенома может быть связана с его полифилетическим происхождением от нескольких видов *Aegilops* по сравнению с донорами А и D геномов. После полиплоидизации пути реорганизации трех субгеномов похожи. Вторая гипотеза основана на предположении о разной степени чувствительности геномов к реорганизации при образовании тетра- и гексаплоидных пшениц. Согласно данной гипотезе, В-геном являлся более чувствительным к реорганизации (пластичным, plastic), чем геном А (стабильный, stable) при образовании тетраплоидной пшеницы, а затем, тетраплоидный геном (AABB) оказался более чувствительным, чем геном D (основной, pivotal) при образовании гексаплоидной пшеницы. Согласно третьей гипотезе, асимметрия субгеномов пшеницы объясняется уникальным гомоплоидным происхождением D-генома - в результате древнего события гибридизации растений с А и В геномами [Murat et al., 2014].

Кроме реорганизации хромосом, по результатам секвенирования генома, для *T. aestivum* показано значительное сокращение функциональных генов и обилие генных фрагментов во всех трех геномах, однако данные изменения не затрагивали гены транскрипционных факторов [Brenchley et al., 2012]. Сокращение числа генов в большей степени затронуло субгеномы А и В и в меньшей степени - субгеном D [Brenchley et al., 2012; Berkman et al., 2013]. Однако, несмотря на значительную потерю генов во многих функциональных классах, несколько классов генов, отвечающих за защиту, метаболизм и рост, а также за питательные свойства (nutrition), численно увеличились в *Triticeae*, возможно, в результате селективного

отбора при доместикации пшеницы [Brenchley et al., 2012]. Сохранение генов транскрипционных факторов во всех трех геномах может обеспечивать пластичность полиплоидного генома пшеницы и способствовать неаддитивной экспрессии генов, которая показана как для растений в природных популяциях пшеницы [Bottley, Koeber, 2008; Ge et al., 2013; Leach et al., 2014; Pfeifer et al., 2014], так и для синтетической гексаплоидной пшеницы (16 % генов по сравнению с родительскими видами *Ae. tauschii* и *T. turgidum*) [Pumphrey et al., 2009]. По результатам анализа транскриптома эндосперма зерен пшеницы Chinese Spring, была показана преимущественная тканеспецифичная (в некоторых типах клеток) и стадия-специфичная (на определенных этапах развития) экспрессия генов одного из геномов (A, B или D) относительно двух других [Pfeifer et al., 2014]. Для генов, определяющих хлебопекарные свойства муки, таких как гены глютеинов (*HMW-Glu*, *LMW-Glu*) и глиадинов (*Gli*), гены, отвечающие за твердость зерна (*pin-A*, *pin-B*), и активаторы запасания белка (*SPAs*), показана преимущественная экспрессия гомеологов B и D геномов [Pfeifer et al., 2014]. Преимущественная экспрессия гомеологов B-генома показана также для генов ядрышкообразующего района, располагающихся на хромосомах 1B и 6B [Ge et al., 2013]. Кроме того, экспрессия рибосомальных генов 1B более активная, чем у 6B, несмотря на то, что число таких генов на 6B хромосоме более чем в 2 раза превышает их количество на 1B [Ge et al., 2013].

Присутствие трех пар гомеологичных копий генов в геноме пшеницы в некоторых случаях может приводить к их функциональной избыточности. Например, функциональная избыточность показана для гена *Mlo*, кодирующего белок, участвующий в подавлении защиты против мучнистой росы [Wang et al., 2014]. Инактивация двух пар гомеологичных копий *Mlo* не приводит к восстановлению устойчивости к мучнистой росе, устойчивость показана только для растений с инактивацией всех трех гомеологов [Wang et al., 2014].

1.2.2. Контроль спаривания хромосом: локус *Ph1*

Цитологическая диплоидизация у мягкой пшеницы обеспечивается локусом *Ph1*, который участвует в регуляции спаривания гомологичных хромосом

и контролирует диплоидное поведение хромосом в мейозе [Sears, 1977; Moore, Shaw, 2009]. В присутствии *Ph1* происходит синапсис только гомологичных хромосом, а в случае его отсутствия, может происходить синапсис и рекомбинация между гомологичными хромосомами [Luo, 1996]. *Ph1* локус был локализован на длинном плече хромосомы 5В пшеницы, в области перекрытия двух делеций *ph1b* и *ph1c* [Sears, 1977; Giorgi, 1978]. Несмотря на схожий порядок генов на гомологичных хромосомах 5 группы, активность *Ph1* является уникальной для 5В. Уже в ранних работах было определено, что на длинных плечах хромосом 5А и 5D располагаются гены (локусы) с противоположным локусу *Ph1* эффектом [Sears, 1969, 1976; Feldman, 1966; Riley et al., 1966]. В отличие от 5В, хромосомы 5А и 5D несут активаторы спаривания хромосом, более сильный на 5D и минорный на 5А [Feldman, 1966; Riley et al., 1966]. Геном-кандидатом на выполнение роли промотора спаривания считают ген *TaASY1*, картированный на длинном плече 5А хромосомы *T. aestivum*, и имеющий копии на 5В и 5D хромосомах [Boden et al., 2007, 2009]. Предполагается, что *Ph1* может регулировать уровень его экспрессии [Boden et al., 2009]. Кроме того, существует ряд других локусов (на других хромосомах: 3А, 3В, 3D, 2А, 4D), позитивно или негативно влияющих на спаривание хромосом, механизм действия которых может отличаться от механизма действия *Ph1*-локуса [Sears, 1976].

С развитием новых методов, было проведено более точное картирование *Ph1*-локуса на участке 5ВL протяженностью 2.5 т.п.о. [Griffiths et al., 2006]. Данный участок ДНК характеризовался наличием мультигенного кластера, с гомологией к генам *CDK2* киназ (cyclin-dependent kinase 2) человека, регулирующих экспрессию мейотических генов, образование двуцепочечных разрывов и структуру хроматина [Griffiths et al., 2006; Yousafzai et al., 2010]. Также было установлено, что 5ВL *cdk*-подобные гены негативно регулируют активность *cdk*-подобных генов, находящихся на хромосомах 5А и 5D, и в отсутствии локуса *Ph1*, их активность повышается [Al-Kaff et al., 2008]. Предполагалось, что 5В *cdk*-подобные гены пшеницы могут выполнять функцию локуса *Ph1* (контролировать спаривание хромосом), посредством регуляции фосфорилирования гистона H1 хроматина [Greer et al., 2012]. Другой группой исследователей в области *Ph1*-локуса был идентифицирован ген *C-Ph1*, инактивация которого также приводила к спариванию

гомеологичных хромосом [Sidhu et al., 2008; Bhullar et al., 2014]. При уровне экспрессии гена *C-Ph1* ниже 44% кроме описанных ранее для мутантов *Ph1* aberrаций спаривания хромосом, Bhullar с соавторами [2014] наблюдали слипание хромосом и нарушение выравнивания в метафазе I. Авторы предположили, что *C-Ph1* может функционировать через регуляцию взаимодействия центромер с микротрубочками.

В ранних работах существовали две основные гипотезы относительно механизма действия *Ph1*: пресинаптическая и синаптическая [Feldman, 1966; Vega, Feldman, 1998a]. Согласно пресинаптической гипотезе, механизм действия *Ph1*-локуса основан на контроле предмейотической ассоциации и выравнивания хромосом с помощью пространственного разделения гомеологов [Feldman, 1966; Vega, Feldman, 1998a]. *Ph1*- контроль пространственной организации хромосом в ядре, предположительно, связан с влиянием данного локуса на динамику микротрубочек и их взаимодействие с центромерными районами хромосом [Shimada et al., 1974; Vega, Feldman, 1998a,б]. Согласно синаптической гипотезе, *Ph1* не связан с выравниванием хромосом, а влияет на синапсис и кроссинговер в мейотической профазе [Luo, 1996]. В присутствии *Ph1* происходит синапсис только гомологичных хромосом, а в случае его отсутствия, может происходить синапсис и рекомбинация между гомеологичными хромосомами [Luo, 1996]. Однако позднее было показано, что спаривание хромосом тесно связано с рекомбинацией у растений [Li et al., 2004, 2007; Pawlowski et al., 2004; Ronceret et al., 2009]. Связь спаривания и рекомбинации хромосом, опосредованная действием *Ph1* локуса, также была установлена и для пшеницы [Greer et al., 2012; Martin et al., 2014]. Martin с соавторами [2014] показали, что *Ph1* не влияет ни на установление синаптонемного комплекса, ни на образование MLH1-сайтов репарации, а только на конечный результат репаративного процесса (кроссоверы/некроссоверы). Таким образом, *Ph1* способствует спариванию гомологов, нежели подавлению гомеологичного спаривания, которое наблюдается в пахитене у гибридов даже в его присутствии [Martin et al., 2014].

1.3. Увеличение генетического разнообразия мягкой пшеницы

Поскольку пшеница является стратегической с/х культурой, во многих странах ведутся работы по изучению генома пшеницы и увеличению его генетического разнообразия. Гибридизация культурных сортов пшеницы с дикими сородичами и другими родами злаков позволяет расширить ее генофонд, который был значительно сужен в ходе длительного искусственного отбора, направленного на адаптацию к достаточно узкому набору факторов определенной экологической зоны. Источником генетического материала для пшеницы (*T. aestivum* L.) служат дикие виды и культурные сорта растений трибы *Triticeae*, которые принято разделять на первичный, вторичный и третичный генофонды, в зависимости от филогенетического родства и особенностей скрещивания. К первичному генофонду мягкой пшеницы относят виды *T. turgidum* L. ($2n = 4x = 28$, AABB геном) и *Ae. tauschii* Coss. ($2n = 2x = 14$; геном DD), при гибридизации которых и образовалась гексаплоидная пшеница. К вторичному генофонду относят виды, имеющие хотя бы один общий геном с пшеницей, такие как диплоидные *T. monococcum* L. и *T. urartu* Tumanian ex Gaudily., несущие A-геном; тетраплоидная пшеница *T. timopheevii* Zhuk. ($2n = 4x = 28$, AAGG); а также дикие формы пшеницы *T. dicoccoides*, донор D генома *Ae. squarrosa* (син. *Ae. tauschii*) и *Ae. speltoides* Tausch. ($2n = 2x = 14$, SS). Третичный генофонд включает диплоидные и полиплоидные виды, содержащие негомологичные пшенице геномы (рожь, ячмень, пырей, другие виды эгилопса) [Qi et al., 2007]. Гены первичного и вторичного генофондов могут быть переданы путем прямой гибридизации, гомологичной рекомбинации хромосом или возвратным скрещиванием с последующим отбором [Sears, 1969; Qi et al., 2007]. Чужеродный генетический материал третичного генофонда может быть интрогрессирован в пшеницу с помощью замещенных или транслоцированных линий [Sears, 1969; Friebe et al., 1996; Qi et al., 2007]. Первым этапом при переносе чужеродной информации является получение частично фертильного гибрида между пшеницей и чужеродным видом. При этом получение отдаленных гибридов и перенос генов из третичного генофонда могут быть затруднены, вследствие сильно выраженных механизмов несовместимости, которые могут приводить к нежизнеспособности и стерильности гибридов [Islam,

Shepherd, 1990; Pershina et al., 1988, 1998]. Восстановление фертильности может происходить в результате полиплоидизации при слиянии нередуцированных гамет. Однако, несмотря на очевидные сложности, отдаленная гибридизация остается важнейшим методом получения селекционного материала.

Транслокации. Спонтанное получение агрономически ценных форм при гибридизации пшеницы показало эффективность внедрения чужеродного генетического материала (различные транслокации). К 1996 году насчитывалось 57 транслокаций (индуцированных и полученных спонтанно), несущих устойчивость к вредителям и заболеваниям, среди которых было 2 интеркалярные, 10 центрических и 45 терминальных транслокаций с дистальными сегментами чужеродных хромосом [Friebe et al., 1996]. Однако, независимо от способа получения, не все из них стабильно наследовались, поскольку плохо компенсировали отсутствующие участки хромосом пшеницы.

Введение генетического материала третичного генофонда может происходить при спонтанной негомологичной рекомбинации хромосом у гибридов, но с очень низкой частотой (варьируется от 1% до 15%) [Islam, Shepherd, 1992; Lukaszewski et al., 2004]. Одним из известных примеров переноса генетической информации с помощью спонтанной рекомбинации является пшенично-пырейная транслокация T3D/3Ae, которая содержит ген устойчивости к листовой ржавчине *Lr24* [Smith et al., 1968]. Частоту гомеологичной рекомбинации можно увеличить с помощью инактивации локуса *Ph1* пшеницы, что широко используется для переноса гомеологичных хромосом или получения транслокаций [Okamoto, 1957; Riley, Chapman, 1958; Sears, Okamoto, 1958; Sears, 1977]. Инактивация или супрессия локуса *Ph1* достигается элиминацией хромосомы 5B [Sears, 1972], использованием мутантных по *phlb* растений пшеницы [Sears, 1981; Koeber, Shepherd, 1985], внесением доминантного гена *Ph¹* (high pairing gene) из *Ae. speltoides* [Chen et al., 1994]. Для подавления *Ph1* достаточно присутствия одной дозы *Ph¹* в геноме, но его эффективность гораздо ниже, чем при элиминации 5B или при *phlb* [Chen et al., 1994].

Помимо подавления локуса *Ph1*, для успешной передачи гомеологичных хромосом/генов в геном пшеницы используют ионизирующее излучение или проведение через клеточную культуру [Sears, 1956; Lapitan et al., 1984; Jiang et al.,

1994; Qi et al., 2007]. Например, с помощью ионизирующей радиации (ИР) Sears [1956] внес в пшеницу ген устойчивости к листовой ржавчине *Lr9* из *Ae. Umbellulata* Zhuk. Для фрагментации чужеродного генетического материала также могут быть использованы гаметоцидные гены из некоторых видов *Aegilops*, которые вызывают хромосомные разрывы и индуцируют хромосомные aberrации [Jiang et al., 1994; Masoudi-Nejiad et al., 2002]. Однако перенос генетической информации при рекомбинации и индукции aberrаций осложняется «нежелательным сопутствующим генетическим материалом», который переносится вместе с близкорасположенным целевым геном. Перенесенный фрагмент наследуется как неделимая генетическая единица, такая ассоциация называется «сопутствующий груз» (linkage drag) [Jiang et al., 1994]. Индуцированные транслокации, в отличие от транслокаций, полученных рекомбинацией, происходят на не гомеологичные хромосомы, а также, в большинстве случаев, сопровождаются делециями небольшого участка хромосомы пшеницы и дубликацией сегмента в транслоцированном фрагменте, что приводит к геномной несбалансированности этих транслокаций. Полученные линии с нужной транслокацией могут нести и другие aberrации, требующие нескольких обратных скрещиваний для компенсации [Jiang et al., 1994]. Кроме того, при переносе генетического материала с помощью рекомбинации возникают и другие ограничения. Например, для транслокации чужеродного материала не подходят плечи хромосом 2AS, 4BS и 6BS, несущие гены, отвечающие за фертильность растений, так же, как и 3DS и 5BL с *Ph*-локусами не могут быть заменены чужеродными фрагментами, поскольку это может привести к нестабильности генома и стерильности растений [Jiang et al., 1994]. Хромосомы 4A, 5A, и 7B, которые вовлечены в циклические транслокации, также не могут быть заменены [Naranjo et al., 1987; Liu et al., 1992].

Наиболее успешной и широко-используемой модификацией генома пшеницы можно считать пшенично-ржаную транслокацию T1BL/1RS (замена короткого плеча 1BS на короткое плечо 1RS). Для растений, несущих транслокацию T1BL/1RS была показана устойчивость к мучнистой росе, желтой ржавчине, бурой ржавчине и стеблевой ржавчине [Zeller, 1973]. Короткое плечо ржаной хромосомы 1R содержит гены устойчивости к нескольким заболеваниям: гены *Pm8* и *Pm17*

устойчивости к мучнистой росе, ген *Yr9* устойчивости к желтой ржавчине, *Sr31* – к стеблевой ржавчине, и *Lr26* – к листовой ржавчине [McIntosh, 1988; Heun et al., 1990]; вместе с генами, обеспечивающими адаптацию и высокую урожайность [Rajaram et al., 1983]. Однако позднее, в некоторых районах возделывания было показано преодоление устойчивости, обеспечиваемой этими генами [Bennett, 1984; Zeller, Hsam, 1984]. Кроме того, в некоторых случаях для растений с транслокацией T1BL/1RS было показано ухудшение качества муки (твердость зерна и качество теста были ниже) и снижение веса 1000 зерен, хотя такие характеристики как число зерен в колосе, и число колосков на колос были численно выше [Zhao et al., 2012]. Однако, для растений пшеницы, полученных на основе линий, несущих с T1BL/1RS, может наблюдаться и улучшение хлебопекарных свойств зерна. Например, для созданных в Западной Сибири сортов яровой мягкой пшеницы Омская 37 и Омская 38, несущих транслокацию 1RS.1BL, показаны увеличение (или не снижение) содержания белка и сырой клейковины в зерне, повышение полевой устойчивости к бурой ржавчине, но устойчивость к мучнистой росе была различной [Трубачеева и др., 2011]. Кроме того, для линии Лютесценс 242/97-2-10 мягкой пшеницы, полученной на основе сорта Омская 37, несущей пшенично-ржаную 1RS.1BL и пшенично-пырейную 7DL-7A_i транслокации, показана устойчивость к листовым патогенам, повышенная урожайность, а также высокое качество зерна и высокие хлебопекарные свойства [Белан и др., 2012].

Еще одним примером эффективности чужеродного хроматина является транслокация длинного плеча хромосомы ржи 2R (2BS/2RL), которая несет ген или комплекс генов устойчивости к Гессенской мухе [Friebe, 1990]. Устойчивость пшеницы к недостатку меди в почве, показанная для растений пшеницы с транслокацией 4BS.4BL/5RL, обеспечивается геном *Ce* (copper efficiency), расположенным на длинном плече хромосомы 5RL [Leach, Dundas, 2006]. Среди данных о переносе генетического материала из других родственных растений одной из самых успешных является транслокация T6AS/6AL-6AeL длинного плеча хромосомы 6Ae *Agropyron elongatum* на длинное плечо 6A пшеницы [Knott, 1987]. Транслоцированный участок хромосомы 6Ae несет ген устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr26* [Knott, 1987].

Замещения. Изучение замещенных линий пшеницы началось еще в середине прошлого века с открытия Sears [1953] и Kuspira, Unrau [1957] первых межсортовых замещений и открытия Kattermann [1938] линии с замещением одной из хромосом пшеницы хромосомой ржи. В некоторых случаях замещения хромосом пшеницы чужеродными хромосомами может происходить спонтанно при гибридизации пшеницы с другими злаковыми [Sears, 1969]. Один из первых предложенных методов получения замещенных линий состоял из двух этапов: получения дополненной линии пшеницы ($2n = 42+2$) и скрещивания данной линии с моносомной линией пшеницы ($2n = 41$) [Sears, 1969]. Другой способ заключался в использовании нуллисомиков по одной из хромосом пшеницы, при гибридизации которых с другими родственными видами, гомеологичная чужеродная хромосома могла компенсировать недостающую пшеничную хромосому [Anderson, Driscoll, 1967]. Пшенично-ячменные замещенные линии и линии с пшенично-ячменными транслокациями были получены при скрещивании мягкой пшеницы и видов ячменя *H. vulgare* L., *H. vulgare* ssp. *spontaneum* (C. Koch) Thell. с последующими беккроссированиями (2-3 раза) и отбором нужных растений среди потомков от самоопыления беккроссированных растений [Islam, Shepherd, 1990, Koba et al., 1997].

Для получения пшенично-ржаных замещений Щаповой и Кравцовой была предложена следующая схема (рис. 1.4): на первом этапе необходимо было получить гибрид первого поколения, затем полученный гибрид беккроссировали пшеницей с последующим отбором с помощью С-окрашивания необходимых генотипов среди потомков от самоопыления беккроссированных растений [Щапова, Кравцова, 1990]. С помощью данной схемы были получены линии с замещением пшеничных хромосом - хромосомами ржи 1R, 2R, 5R, 6R [Щапова, Кравцова, 1990]. У пшенично-ржаных гибридов F_1 наблюдается образование анеуплоидных гамет, что при последующем беккроссировании пшеницей, приводит к формированию пшенично-ржаных замещенных форм, у которых одна и реже две гомологичные пары хромосом пшеницы замещены гомеологичными хромосомами ржи. При этом для стабилизации геномов таких гибридов необходимо 5–7 поколений [Силкова и др., 2008].

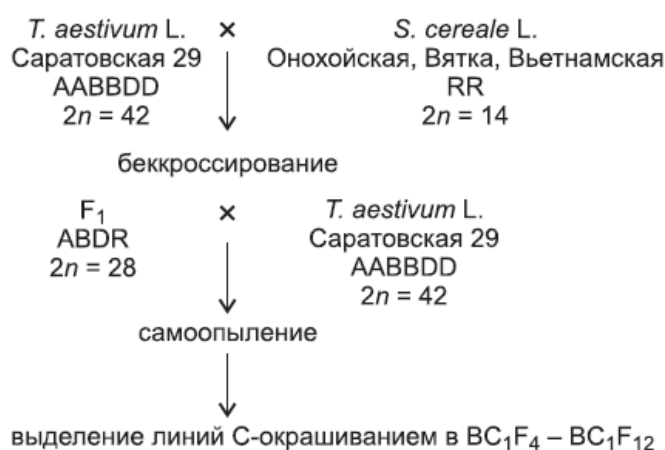


Рисунок 1.4. Схема создания пшенично-ржаных замещенных линий [из: Щапова, Кравцова, 1990].

Высокая цитологическая стабильность была показана для пшенично-ржаных замещенных линий 1Rv(1A), 1R(1A), 1R(1D), 2R(2D)₁, 2R(2D)₂, 2R(2D)₃, 3R(3B), 5Rviet(5A), 5R(5A), 5R(5D), 6R(6A)₁ и 6R(6A)₂, созданных на основе *T. aestivum* L. сорта Саратовская 29 (C29) [Силкова и др., 2006, 2007]. Для гексаплоидной пшеницы с замещением 2R/2D₁ и 2R/2D₃ показана более высокая продуктивность (увеличение массы 1000 зерен) по сравнению с сортом C29, кроме того, 2R(2D)₁ умеренно устойчива к NaCl [Силкова и др., 2008]. Еще одним примером модификации генома пшеницы является замещение хромосомы 5A хромосомой 5R у пшеницы сортов Rang и Мироновская крупнозерная [Efremova et al., 2006]. Замена доминантного гена *Vrn-A1* рецессивным аллелем *vrn-R1* ржи у растений с замещением 5R/5A приводила к переключению на озимый тип развития и увеличению зимостойкости пшеницы на 20-47% (Rang) и 27-34% (Мироновская крупнозерная) [Efremova et al., 2006]. Кроме того, при замещении хромосомы 6D мягкой пшеницы гомеологичной хромосомой 6Ai пырея *Thinopyrum intermedium* (Host) (2n = 42; EEEstEstStSt) наблюдалась высокая устойчивость растений к бурой ржавчине и мучнистой росе и умеренная устойчивость к стволовой и желтой ржавчине [Salina et al., 2015].

Кроме введения новых генов, замещенные линии могут быть использованы для установления генетической связи отдельных хромосом с ценными признаками [Law, Worland, 1973]. Так, замещенные и дополненные пшенично-ячменные линии *H. chilense* Roem. et Schult. были использованы для определения локализации гена устойчивости к *Septoria tritici* [Rubiales et al., 2000].

1.3. Мейотическая реституция у растений

1.3.1. Основные механизмы образования нередуцированных гамет

Феномен мейотической ядерной реституции был охарактеризован еще в 1927 году у растений *Euhieracium* [Rosenberg, 1927], а также у межродовых гибридов F_1 *Raphanus sativus* L. ($2n = 2x = 18$) x *Brassica oleracea* L. ($2n = 2x = 18$) [Карпеченко, 1927]. Согласно Карпеченко [1927], 18 унивалентных хромосом располагались по кругу в центре клетки в анафазе I, образуя «однойдерные телофазы первого деления», а во втором делении мейоза происходило разделение унивалентов на сестринские хроматиды с образованием двух нередуцированных ядер. У партеногенетических форм *Euhieracium* Rosenberg [1927] наблюдал образование реституционных ядер при блокировании гетеротипичного (редукционного) деления с последующим гомотипичным разделением унивалентных хромосом (эквационный тип деления).

В 1970-х годах при исследовании образования $2n$ гамет в материнских клетках пыльцы межвидовых гибридов картофеля было описано три других механизма реституции: нередукция 1) при образовании параллельных веретен во втором делении мейоза (Parallel Spindles); 2) преждевременного цитокинеза в T_I, после аномального первого деления (Premature Cytokinesis 1), и 3) преждевременного цитокинеза в T_{II}, после нормального первого деления (Premature Cytokinesis 2) [Mok, Peloquin, 1975]. Позднее, для описания цитологических механизмов образования нередуцированных гамет у картофеля были введены два термина: реституция первого (FDR, first division restitution) и второго (SDR, second division restitution) деления [Ramanna, 1979]. Как следует из названия, реституция первого деления являлась результатом аномального ядерного поведения во время первого деления мейоза, а реституция второго – результатом аномалий, происходящих после нормального первого деления. Считалось, что при FDR образуются гаметы, которые несут несестринские хроматиды и сохраняют близкий «родительскому» уровень гетерозиготности (FDR-гаметы), а при SDR - гаметы, характеризующиеся высоким уровнем гомозиготности, которые несут сестринские хроматиды (SDR-гаметы). Данная терминология впоследствии стала широко использоваться

для описания реституции и у других объектов, таких как лилии, арабидопсис, пшеница [Bretagnolle, Thompson, 1995; Ramanna, Jacobsen, 2003; Oleszczuk, Lukaszewski, 2014]. Однако стоит отметить, что при использовании данного термина авторы, зачастую, опираются на генетический состав образующихся гамет, а не на процесс, приводящий к образованию нередуцированных гамет, и, соответственно, существует несколько механизмов образования FDR-гамет и SDR-гамет.

FDR. В первых работах и более поздних обзорных обобщениях Ramanna и некоторые другие авторы определяют «классическую» FDR, как митоз-подобное деление, в котором отсутствует спаривание хромосом, а выстраивающиеся в метафазе униваленты разделяются с образованием двух идентичных ядер с последующим блокированием второго деления (рис. 1.5 б) [Ramanna, 1979; Ramanna, Jacobsen, 2003; Cai, Xu, 2007]. В качестве примеров данной реституции авторы приводят реституцию у синаптических мутантов и гибридных растений, таких как внутривидовые гибриды лилии [Lim et al., 2001; Ramanna, Jacobsen, 2003]. Основной характеристикой данного деления является неспособность хромосом образовывать биваленты.

Также к FDR относят случаи образования неидентичных $2n$ гамет, полученных в результате эквационного деления хромосом после негомологичной рекомбинации у межродовых гибридов лилий (рис. 1.5 в) [Lim et al., 2001; Ramanna, Jacobsen, 2003]. В данном случае авторы описывают механизм образования FDR-гамет, как разделение сестринских хроматид унивалентных и полу-бивалентных хромосом в первом делении мейоза с образованием диад и последующим блокированием второго деления. Под полу-бивалентами авторы понимают гомеологичные хромосомы, которые в начале мейоза образуют биваленты, но к метафазе I разделяются и выстраиваются в эквационной плоскости (десинапсис). В анафазе I данные хромосомы, как и унивалентные, разделяются на сестринские хроматиды, отходящие к разным полюсам [Lim et al., 2001]. Результатом такого деления являются $2n$ гаметы, несущие несестринские в области центромеры хроматиды (от центромеры до первой хиазмы). Такие гаметы не являются полностью идентичными родительским или друг другу, но считаются гаметами FDR типа.

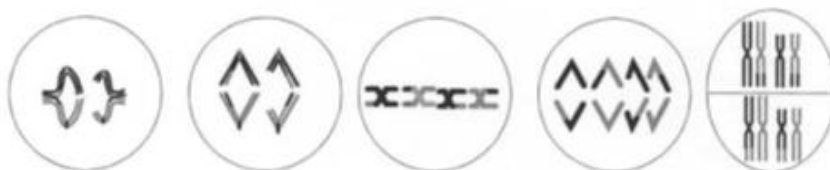
а. Кариотип ($2n=2x=4$)**б. FDR (реституция в первом делении)****в. FDR с рекомбинацией****г. Эквивалент FDR (происходит во втором делении)**

Рисунок 1.5. Схематическое изображение получения нередуцированных FDR-гамет [по Ramanna, Jacobsen, 2003].

Кроме того, к реституции первого деления относят случаи появления нередуцированных гамет во втором делении мейоза у растений картофеля и арабидопсиса с симультанным (одновременным) цитокинезом (рис. 1.5 г) [Mok, Peloquin, 1975; Ramanna, 1979; Bretagnolle, Thompson, 1995; Peloquin et al., 1999; Ramanna, Jacobsen, 2003; d'Erfurth et al., 2008; De Storme, Geelen, 2011]. Симультанный мейотический цитокинез происходит на стадии телофазы II. МТ веретена деления перестраиваются с образованием радиальной системы микротрубочек (RMS) вокруг каждого ядра, и вдоль плоскостей взаимодействия микротрубочек от противоположных RMSs формируются (центростремительно от периферии мейоцита) новые клеточные стенки [Brown, Lemmon, 2001]. В первом делении при данном типе FDR происходит образование бивалентов и их редукционное расхождение, как при нормальном мейозе. После первого деления у

данных растений наблюдается образование параллельных и/или слитых веретен деления в метафазе II. В анафазе II хромосомы разделяются на сестринские хроматиды с образованием двух $2n$ ядер в телофазе II. Из-за параллельных веретен одновременное построение двух перегородок невозможно, вследствие чего формируется только одна с образованием диад вместо тетрад. Образованные FDR гаметы несут несестринские хроматиды. В данном случае гаметы способны передать следующему поколению 80% «родительской» гетерозиготности [Bretagnolle, Thompson, 1995; Peloquin et al., 1999].

Примеры реституции первого деления (FDR) и мутации, приводящие к образованию FDR – гамет.

К эквационному первому делению могут приводить такие нарушения, как асинапсис или отсутствие когезии сестринских хромосом. Например, для 2 диких образцов *Paspalum jesuiticum*, собранных в различных регионах Бразилии, цитологическое исследование показало полный асинапсис во время микроспорогенеза, что приводило к образованию нередуцированных гамет [Filho et al., 2014]. Оба растения были гексаплоидными ($2n = 6x = 60$) и в диакинезе наблюдалось 60 унивалентов. После выравнивания унивалентов на экваторе в метафазе I, хроматиды расходились к полюсам (эквационное деление). После цитокинеза формировалась диада с $2n$ микроспорами. Второе деление отсутствовало. Кроме того, в прометафазе только 40 унивалентов располагались на экваторе, в то время как 20 (10+10) унивалентов были разбросаны между полюсами или образовывали группы, перемещаясь на экватор позже. Авторы отметили, что такое поведение хромосом может быть результатом разнородности мейотических ритмов родительских геномов при естественной гибридизации [Filho et al., 2014].

В таблице 1.1 представлены основные известные мутации, приводящие к формированию нередуцированных FDR-гамет. К эквационному делению хромосом в первом делении мейоза у *A. thaliana* может привести отсутствие белков SWI1 / DYAD [Mercier et al., 2001; Agashe et al., 2002; Ravi et al., 2008]. У мутантов сестринские хроматиды разделяются в первом делении мейоза и происходит блокирование второго деления, при этом аллель *dyad* является одной из нескольких мутаций в гене *SWITCH1 (SWI1)/DYAD*, которые приводят к дефектам только в макроспорогенезе [*swi1-1* и *dyad*; Motamayor et al., 2000; Siddiqi et al., 2000], в то

время как для мутантов *swi1-2* показаны дефекты мейоза как в макроспорогенезе, так и в микроспорогенезе [Mercier et al., 2001, 2003].

Таблица 1.1. Мутации, приводящие к образованию нередуцированных FDR-гамет.

Мутация	Растение	Тип нарушения	Ссылка
<i>parallel spindles (ps)</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Слитые/трехполюсные веретена	Мок, Peloquin, 1975
<i>elongate1(ell)</i>	<i>Zea mays</i>	Отсутствие 2 деления ♀ мейоз	Rhoades, Dempsey, 1966; Barrell, Grossniklaus, 2005
<i>ameiotic1(am1)</i>	<i>Zea mays</i>	Митоз-подобное деление вместо мейоза ♀ / ♂ мейоз	Golubovskaya et al., 1993, 1997; Pawlowski et al., 2009
<i>argonaute104 (ago104)</i>	<i>Zea mays</i>	Митоз-подобное деление вместо мейоза ♀ мейоз	Singh et al., 2011
<i>Arabidopsis thaliana parallel spindle 1 (Atps1)</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Параллельные/слитые веретена ♂ мейоз	d'Erfurth et al., 2008
<i>Jason</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Параллельные/слитые веретена ♂ мейоз	Erilova et al., 2009; De Storme, Geelen, 2011
<i>swi1-1</i> и <i>swi1-2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Блок 2 деления ♀ мейоз	Motamayor et al., 2000; Mercier et al., 2001, 2003;
<i>Dyad</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Блок 2 деления ♀ / ♂ мейоз	Siddiqi et al., 2000; Agashe et al., 2002; Ravi et al., 2008
<i>MiMe</i> <i>MiMe-2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Митоз-подобное деление вместо мейоза ♀ мейоз	d'Erfurth et al., 2009, 2010

Мутации кукурузы *am1* и *argonaute104 (ago104)* также приводят к эквационному разделению хромосом в первом делении и преобразуют мейотический клеточный цикл в митотический [Pawlowski et al., 2009; Singh et al., 2011]. Преобразование мейотического деления в митотическое было также показано у тройных мутантов *osd1/Atrec8/Atspo11-1* *A. thaliana*, получивших название *MiMe* (митоз вместо мейоза) [d'Erfurth et al., 2009]. Сочетание мутаций *Atspo11-1* и *Atrec8* приводило к митоз-подобному разделению сестринских хроматид уже в первом делении мейоза, а мутация *osd1* предотвращала второе деление. Образование унивалентов происходило вследствие инактивации гена *Spo11*, участвующего в спаривании и рекомбинации хромосом, а расхождение сестринских хроматид в AI происходило в результате нарушения когезии при подавлении гена *Rec8* (мейоз-специфичный белок когезинового комплекса).

Схожие результаты были получены у мутантов *MiMe-2 A. thaliana* при объединении мутаций генов *Atrec8*, *Atspo11-1* и *CYCA1;2/TAM* [d'Erfurth et al., 2010].

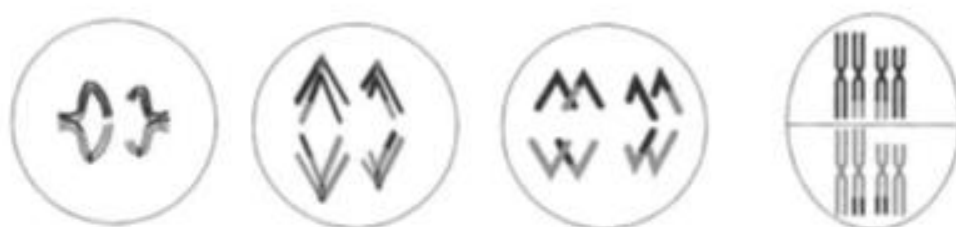
Нередуцированные гаметы, которые относят к FDR (не классический путь) могут быть образованы в результате нарушений второго деления мейоза. Примером реституции первого деления может служить образование $2n$ пыльцы у батата *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (4x) и растений *Ipomoea triloba* (2x) [Becerra Lopez-Lavalle, Orjeda, 2002]. Формирование $2n$ пыльцы происходило в результате ошибок веретена деления - параллельных или трехполюсных веретен (Y форма) в анафазе II, вместо обычной ориентации веретена (пересечение под углом в 60 градусов). Эти две аномальные конфигурации веретена, приводили к образованию диад и триад с разными частотами (13-67%). Иногда изменение веретена в метафазе II наблюдалось как одно слитое веретено, что также приводило к формированию диад [Becerra Lopez-Lavalle, Orjeda, 2002]. Образование нередуцированных гамет в результате построения трехполюсных веретен показано также для растений *Moringa oleifera* [Silva et al., 2011].

Образование диад и триад может происходить при формировании параллельных и слитых веретен в МII при нарушениях в работе генов *AtPSI* (*Arabidopsis thaliana* Parallel Spindle 1) и *JASON* [d'Erfurth et al., 2008; De Storme, Geelen, 2011]. У мутантов *Atps1 A. thaliana*, в конце второго деления мейоза наблюдается образование диад и триад (содержащие две гаплоидные и одну диплоидную клетки), а также некоторое количество тетрад [d'Erfurth et al., 2008]. Анализ микротрубочек веретена деления во время мейоза II показал наличие параллельных, слитых и трехполюсных веретен. Такой механизм включает в себя перегруппировку хромосом, разделенных в первом делении, таким образом, что каждая диплоидная клетка, предположительно, содержит несестринские хроматиды [d'Erfurth et al., 2008]. Хотя функция белков, экспрессирующихся с генов *AtPSI* и *JASON*, до сих пор не ясна. Последние исследования показали, что белок *JASON* регулирует экспрессию *AtPSI*. Для определения взаимосвязи данных генов был проведен транскриптомный анализ, было установлено, что у мутантов *jason* фиксировался сниженный уровень транскриптов с гена *AtPSI*, из чего авторы сделали вывод, что *JASON* либо позитивно регулирует экспрессию *AtPSI*, либо

предотвращает деградацию его транскриптов. Также было предположено, что мейотические дефекты веретена в *jason* вызваны снижением уровня транскриптов с гена *AtPS1*, для которого была показана корреляция между снижением уровня экспрессии гена и увеличением числа диад [De Storme, Geelen, 2011].

SDR. Механизм образования SDR-гамет описывают следующим образом: пары гомологичных или гомеологичных хромосом образуют биваленты или полу-биваленты, которые разделяются редукционно в анафазе I мейоза с образованием двух гаплоидных ядер, однако дальнейшее деление блокируется (рис. 1.6 а).

а. SDR (реституция во втором делении)



б. IMR (неопределенная реституция)



в. PMC (пост-мейотическая реституция)

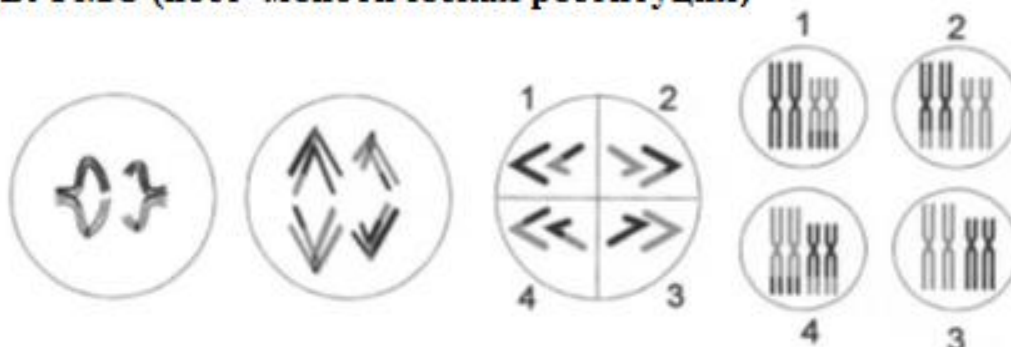


Рисунок 1.6. Схематическое изображение получения нередуцированных гамет в результате реституции второго деления (а), неопределенной реституции (б), пост-мейотической реституции (в) [по Ramanna, Jacobsen, 2003].

В результате образуются $2n$ гаметы, несущие сестринские хроматиды (в центромерной области до первого кроссинговера) [Ramanna, 1979; Ramanna, Jacobsen, 2003]. В данном случае, в следующее поколение передается примерно 40% «родительской» гетерозиготности [Bretagnolle, Thompson, 1995]. Согласно данным авторов, SDR происходит в гибридах или генотипах, в которых геномы тесно связаны и образуют биваленты [Ramanna, Jacobsen, 2003].

Образование нередуцированных гамет SDR-типа может происходить в результате выхода из мейоза после первого деления, либо в результате ошибок во втором делении [Mok, Peloquin, 1975; Werner, Peloquin, 1987; d'Erfurth et al., 2010; Wang et al., 2010; Gómez-Rodríguez, 2012]. В таблице 1.2 представлены известные мутации, приводящие к образованию нередуцированных гамет SDR-типа. Одним из первых описанных случаев является мутация *pc* (*premature cytokinesis*) «преждевременный цитокинез» картофеля, для мутантов в ходе микроспорогенеза показано образование значительного числа $2n$ пыльцы [Mok, Peloquin, 1975; Peloquin et al., 1999]. Авторы описали два механизма образования SDR-гамет - преждевременный цитокинез 1 и 2. В первом случае асинхронное деление бивалентов заканчивалось цитокинезом в ТI и блокированием МII, хотя в норме цитокинез происходит симультанно после 2 ядерных делений. Во втором случае, первое деление происходило нормально, мейоциты вступали во второе деление, но уже в профазе II происходил цитокинез с образованием двух гамет с нередуцированным числом хромосом [Mok, Peloquin, 1975]. В макроспорогенезе SDR-гаметы были результатом отсутствия второго деления у мутантов *os* (*omission of second division*) или нарушений цитокинеза после нормальной анафазы II у мутантов *fc* (*failure of cytokinesis*) [Werner, Peloquin, 1987]. В первом случае мейоциты вступали во второе деление после нормального первого деления и цитокинеза, однако деление останавливалось на стадии второй профазы, что приводило к образованию двух $2n$ гамет. Во втором случае, после нормального первого деления и нормального второго, наблюдалось нарушение образования клеточной стенки с образованием триад и диад соответственно [Werner, Peloquin, 1987].

Примеры реституции второго деления (SDR) и мутации, приводящие к образованию SDR – гамет.

Формирование нередуцированных SDR гамет наблюдалось при внутривидовом скрещивании у лилии [Lim et al., 2004]. При анализе двух гибридов Enchantment x *L. pumilum*, в первом делении мейоза наблюдалось образование 12 бивалентов, но у 25% гамет происходили нарушения во втором делении, приводящие к образованию 2n гамет. Поскольку вместе с диадами наблюдались также триады, авторы предположили, что нарушение связано с цитокинезом после второго деления [Lim et al., 2004]. В *Agave tequilana* Weber и *A. angustifolia* Haw было установлено два разных механизма образования 2n гамет [Gómez-Rodríguez, 2012]. В одном случае, после нормального первого и второго делений, происходил сбой цитокинеза, что приводило к формированию диад (отсутствие цитокинеза в обеих клетках) и триад (отсутствие цитокинеза в одной из клеток). Второй механизм включал образование аномального веретена: после редукционного расхождения в AI, в одном из «наборов» разошедшихся хромосом происходило эквационное деление, при формировании метафазной пластинки, ориентированной перпендикулярно к исходной с образованием трех ядер в TI. После цитокинеза формировались триады с двумя 1n клетками и одной 2n клеткой. Наличие аномального веретена после редукционного деления хромосом в *A. angustifolia* var. "LINENO" и отсутствие цитокинеза в *A. tequilana* и *A. angustifolia* var. "LINENO" предполагает наличие SDR-реституции, так как первое деление мейоза происходит в обычном порядке, и нарушения обнаружены позднее. [Gómez-Rodríguez, 2012].

К настоящему времени были идентифицированы и охарактеризованы некоторые гены, регулирующие формирование 2n SDR-гамет у *A. thaliana* (табл. 1.2). Мутации генов арабидопсиса *omission of second division1 (osd1)* [d'Erfurth et al., 2009] и *Arabidopsis A1-type cyclin (CYCA1;2)/ tardy asynchronous meiosis (tam)* [Magnard et al., 2001; Wang et al., 2004, 2010; d'Erfurth et al., 2010] вызывают блокирование второго деления после нормального разделения хромосом в MI, что приводит к образованию диад (вместо тетрад) и гомозиготных 2n гамет в мужском и женском гаметофитах. Однако образование нередуцированных гамет у мутантов *osd1* значительно выше (♂100% и ♀85%) [d'Erfurth et al., 2009], чем у мутантов *tam-2, tam-4* (♂90%, ♀30%) [d'Erfurth et al., 2010]. OSD1 – это специфичный для

растений белок, точная роль которого в мейозе неизвестна. Предполагается, что OSD1 участвует в регуляции активности циклин-зависимых киназ и работе комплекса APC/C (anaphase promoting complex) в конце первого деления, обеспечивая переход во второе деление [d'Erfurth et al., 2009]. Кроме того, у двойных мутантов *osd1/tam* происходит образование тетраплоидных спор в результате блокирования перехода из профазы I в метафазу I мейоза из чего следует, что оба белка участвуют в контроле транзита (перехода) как из первого во второе деление, так и из профазы I в метафазу I [d'Erfurth et al., 2010]. Позднее был охарактеризован ген *GIGAS CELL1 (GIG1)/OSD1*, мутация которого вызывала эктопический эндомитоз у *A. thaliana* [Iwata et al., 2011]. Было показано, что *GIG1/OSD1* может участвовать в регуляции клеточного цикла специфично подавляя активность комплекса APC/C [Iwata et al., 2011].

Таблица 1.2. Известные мутации, приводящие к образованию нередуцированных гамет SDR-типа и других типов нередуцированных гамет.

Мутация	Растение	Тип нарушения	Гаметы	Ссылка
<i>omission of the second meiotic division (os)</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Отсутствие МП, ♀ мейоз	SDR	Werner, Peloquin, 1987; Peloquin et al., 1999
<i>failure of cytokinesis (fc)</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Дефект цитокинеза II ♀ мейоз	SDR	Werner, Peloquin, 1987; Peloquin et al., 1999
<i>premature cytokinesis (pc)</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Преждевременный цитокинез, ♂ мейоз	SDR	Mok, Peloquin, 1975; Peloquin et al., 1999
<i>cyca1;2/tam</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Блок 2 деления ♀ / ♂ мейоз	SDR	Magnard et al., 2001; Wang et al., 2004, 2010; d'Erfurth et al., 2010
<i>omission of second division1 (osd1)</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Блок 2 деления ♀ / ♂ мейоз	SDR	d'Erfurth et al., 2009
<i>pre-meiotic cytokinesis defect 1 (pmcd1)</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Предмейотический эндомитоз Нарушения клет цикла, цитокинеза	2n гаметы/ 4n мейоциты	De Storme, Geelen, 2013
<i>tetraspore (tes)/stud/AtNACK2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Дефект цитокинеза ♂ мейоз	4n гаметы	Spielman et al., 1997; Hulskamp et al., 1997; Yang et al., 2003
<i>MKK6/ANQ1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Дефект цитокинеза ♂ мейоз	4n гаметы	Hulskamp et al., 1997; Soyano et al., 2003; Zeng et al., 2011

Другие механизмы реституции

Большинство известных случаев образования нередуцированных гамет можно отнести к FDR или SDR, однако в литературе описаны также а) «неопределенная» мейотическая реституция (IMR, indeterminate meiotic restitution, рис. 1.6 б), б) пред-мейотическая, и в) пост-мейотическая реституция (рис. 1.6 в).

а) У межвидовых гибридов *Lilium longiflorum* × *Asiatic hybrid* (LA) была описана «неопределенная» мейотическая реституция (IMR), при которой образуются гаметы, отличающиеся от FDR и SDR [Lim et al., 2001; Barba-Gonzalez et al., 2004]. При анализе мейотического поведения хромосом с использованием GISH и FISH методов было показано, что родительские хромосомы подразделялись на униваленты, полу-биваленты и биваленты, из них униваленты и полу-биваленты разделялись эквационно, в то время как биваленты разделялись редукционнo, т.е. наблюдалась высокая степень неоднородности, поскольку IMR гаметы есть смесь FDR и SDR [Lim et al., 2001; Barba-Gonzalez et al., 2004].

б) К предмейотической реституции относится образование $2n$ гамет в результате предмейотического удвоения генома (тетраплоидные материнские клетки пыльцы - МКП). Удвоение мейотического генома может быть результатом двух различных цитологических изменений: цитомиксиса или формирования синцития [Falistocco et al., 1995; De Storme, Geelen, 2013]. При цитомиксисе происходит миграция хромосом через цитоплазматические каналы, а образование синцития происходит в результате слияния одного или нескольких ядер при дефектах образования клеточной пластинки. В обоих случаях образующиеся тетраплоидные МКП в конечном итоге дают диплоидные гаметы [Falistocco et al., 1995, De Storme, Geelen, 2013]. В качестве примера можно привести мутантные растения томата *pmcd1* (предмейотический дефект цитокинеза 1) с эктопической индукцией предмейотического эндомитоза [De Storme, Geelen, 2013]. В мужских мейоцитах мутантов *pmcd1*, полученных обработкой этилметансульфонатом (EMS) семян томата (*Solanum lycopersicum* TR 5–306), происходят изменения в прохождении клеточного цикла и формировании клеточной пластинки, в результате чего образуются синцитиальные клетки с разной степенью клеточного и/или ядерного слияния. Клетки без слияния ядер в результате двух нормальных делений мейоза давали две сближенные тетрады (объединенные одной общей

каллезной оболочкой), а клетки с крупными тетраплоидными ядрами, полученные при слиянии двух диплоидных ядер синцитиальной клетки, в результате внешне не отличающегося от нормы мейоза, давали крупные тетрады с диплоидными гаметами. Наблюдаемые аномалии в формировании клеточной пластинки были, предположительно, обусловлены нарушениями в биосинтезе каллозы [De Storme, Geelen, 2013].

Образование диплоидной пыльцы в результате цитомиктических событий удвоения генома в развивающихся материнских клетках пыльцы показано у *Dactylis glomerata* L., [Falistocco et al., 1995]. Явление цитомиксиса наблюдалось в течение всего первого деления, начиная со стадии пахитены и до телофазы I, а также в интерфазе. Авторы отмечали, что в большинстве случаев по цитомиктическим каналам переходили все хромосомы с образованием одной полиплоидной и одной безъядерной клеток. В диакинезе в некоторых мейоцитах наблюдалось образование 21 бивалента, что подтверждало образование полиплоидной клетки. Далее в этих мейоцитах проходило нормальное мейотическое деление с образованием полиплоидной пыльцы [Falistocco et al., 1995].

в) К пост-мейотической реституции относят аномалии формирования клеточной пластинки, возникающие после нормальных двух мейотических делений хромосом, что характерно для двудольных растений с симультанным (одновременным) цитокинезом.

Одним из примеров является образование нередуцированных гамет при низкотемпературной (4-5°C) обработке в течение 20-40 часов растений *Arabidopsis* [De Storme et al., 2012]. Авторы показали, что низкотемпературный шок специфично влияет на постмейотический цитокинез и/или формирование клеточной стенки, не нарушая сегрегацию хромосом и образование веретена деления. На стадии тетрад наблюдалось правильное тетраэдрическое расположение ядер, однако шло нарушение в построении фрагмопласта, а также была нарушена целостность новообразующейся клеточной пластинки. Из чего авторы сделали вывод, что нарушение происходит за счет ошибок биогенеза или доставки каллозы к экватору [De Storme et al., 2012].

Причиной ошибок в построении клеточных стенок может быть нарушение в организации МТ, как, например, при мутации *tetraspore (tes)/stud* у *A. thaliana* [Spielman et al., 1997; Yang et al., 2003]. У всех четырех мутантов *tes* после двух нормальных мейотических делений наблюдались аномалии формирования клеточной пластинки [Spielman et al., 1997]. После окрашивания микроспороцитов у мутантов *tes-1*, *tes-3*, *tes-4* анилиновым синим, наблюдалось отсутствие межъядерных перегородок, в то время как у мутанта *tes-2* шло частичное образование клеточных стенок, однако полное разделение клеток так и не происходило [Spielman et al., 1997]. Как было показано позднее, монады с четырьмя ядрами в общей цитоплазме в *tes/stud* мутантах образуются в результате дезориентации микротрубочек, что приводит к нарушениям RMS и отсутствию цитокинеза [Yang et al., 2003].

Нарушение постмейотического цитокинеза, который регулируется митоген-активируемой протеинкиназой (МАРК) сигнального пути, также приводит к образованию полиплоидных гамет. Мутации в *TES/STUD/AtNACK2*, *MKK6/ANQ1*, и *MPK4*, трех основных составляющих цитокинетического МАРК каскада сигналов, вызывают полную потерю следующего за мейозом цитокинеза в микроспорогенезе, производя тетраплоидные пыльцевые зерна [Hulskamp et al., 1997; Spielman et al., 1997; Soyano et al., 2003; Zeng et al., 2011]. Ген *TES/STUD* кодирует белок с N-концевым доменом, гомологичным кинезиновым моторам, и C-концевым доменом, имеющим частичную гомологию к табачным NACK белкам, которые участвуют в сборке и организации МТ во время цитокинеза [Yang et al., 2003].

1.3.2. Механизмы реституции при реконструкции генома пшеницы и ее гибридов

Поскольку у аллополиплоидных растений в процессе видообразования формируется система контроля, не позволяющая негомологичным хромосомам спариваться и образовывать биваленты [Jenczewski, Alix, 2004], в мейозе гибридов, полученных скрещиванием с такими аллополиплоидами, нет гомологов, хромосомы не образуют биваленты, а унивалентные хромосомы не способны нормально распределяться в дочерние клетки. Особенно интересным

представляется гибридизация у злаковых, а именно пшеницы и близких к ней родов, поскольку пшеница – с/х ценный аллополиплоид, у которого хорошо описана система контроля спаривания *Ph1*-локуса, не позволяющая гомеологичным хромосомам спариваться и образовывать биваленты.

История изучения цитологических механизмов формирования нередуцированных гамет у межродовых гибридов тетра- и гекса- пloidной пшеницы (*T. turgidum*, *T. aestivum*) началась с 30-х годов 20 века и продолжается до сегодняшнего дня [Aase, 1930; Wagenaar, 1968; Islam, Shepherd, 1980; Fukuda, Sakamoto, 1992; Xu, Joppa 1995, 2000; Matsuoka et al., 2013; Hao et al., 2014; для обзора см. - Силкова и др., 2011]. Значительная часть опубликованных работ по реституции у пшеницы посвящены реконструкции формирования генома мягкой пшеницы (межродовая гибридизация тетраплоидной пшеницы и эгилопса) [Zhang et al., 2007, 2008; Cai et al., 2010; Matsuoka et al., 2013; Hao et al., 2014] и существуют также работы, которые описывают реституцию при скрещивании тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы с другими представителями *Triticeae* [Islam, Shepherd, 1980; Xu, Joppa, 1995, 2000; Silkova et al., 2011; Oleszczuk, Lukaszewski, 2014]. Однако и в тех, и в других случаях выявляется несколько основных механизмов, приводящих к образованию двух идентичных гамет, в результате блокирования одного из делений мейоза или неравного расхождения хромосом (рис. 1.7), а также описываются разные случаи образования анеуплоидных гамет (рис. 1.8).

На рисунке 1.7 приведено схематичное изображение основных цитологических типов реституции у амфигаплоидов в трибе *Triticeae* [по Силкова и др., 2011]. К первому типу Силкова и соавторы отнесли реституцию, происходящую в результате «нерасхождения хромосом во втором делении», предполагающую эквационное деление хромосом на хроматиды в первом делении мейоза с образованием диад и последующим блокированием второго деления (рис. 1.7 1). К типам 2-5 были отнесены различные механизмы «нерасхождения хромосом в первом делении», общей особенностью которых является блокирование первого деления и образования диад - в результате разделения хромосом на сестринские хроматиды во втором делении, либо монад - при блокировании также и второго деления (рис. 1.7 2-5). К 6 типу было отнесено «однополярное расхождение

хромосом», при котором хромосомы случайным образом распределяются по клетке в МI, отходят к одному полюсу в АI с образованием монады в ТI (может сопровождаться асимметричным цитокинезом), а образование реституционных гамет происходит в результате нормального второго деления (рис. 1.7 б) [Силкова и др., 2011]. Чаще всего в литературе обсуждаются 1 и 2 типы деления, для которых характерно выстраивание хромосом на экваторе в метафазе I.

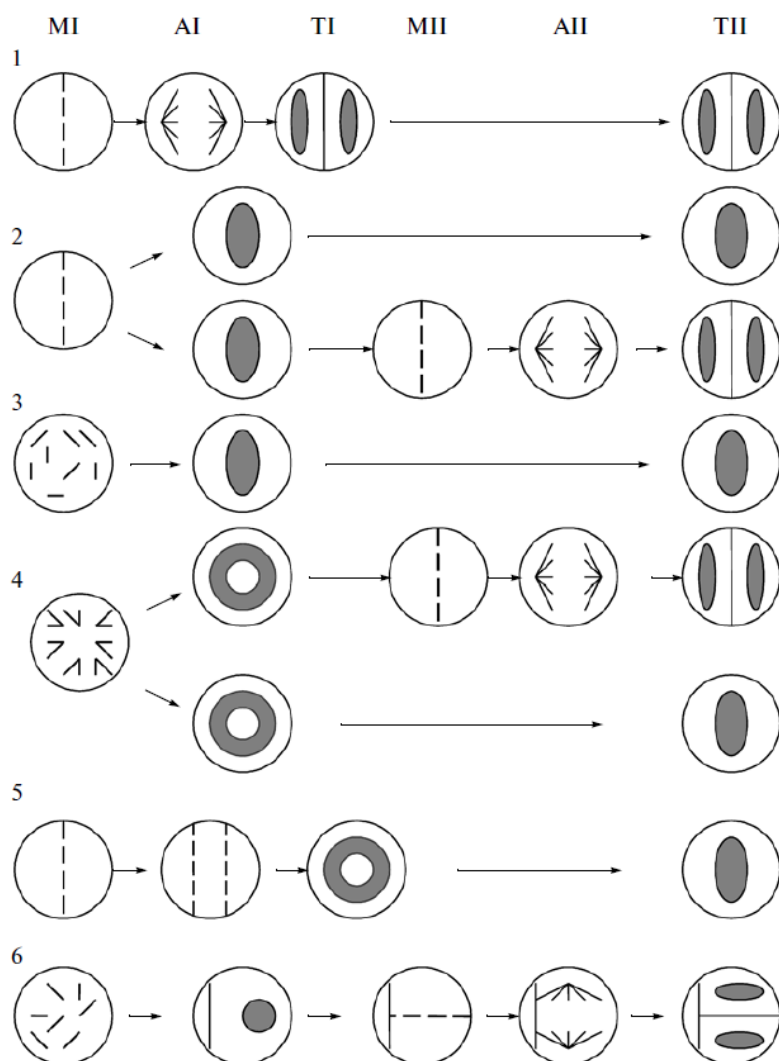


Рисунок 1.7. Механизмы реституции у амфигаплоидов в трибе *Triticeae* [по Силкова и др., 2011]: 1- нерасхождение хромосом во втором делении (эквационное деление, SDM), 2–5 - нерасхождение хромосом в первом делении (FDR/UMCD, образование монад), 6 - однополярное расхождение хромосом.

Многие авторы описывают реституцию у гибридов в трибе *Triticeae* как однократное разделение хромосом в МII после блокирования первого деления (рис. 1.7 2), что отличается от механизмов реституции, описанных для других растений

[Wagenaar, 1968; Islam, Shepherd, 1980; Cai et al., 2010; Matsuoka et al., 2013]. Образование нередуцированных гамет, в результате «продлонгации метафазы I» было описано у гибридов *T. crassum* L. x *T. turgidum* L. [Wagenaar, 1968]. В пролонгирующей метафазе I униваленты, первоначально разбросанные по клетке, постепенно собирались на экваторе, после этого происходило блокирование первого деления с последующим образованием диад после нормального второго деления [Wagenaar, 1968]. Схожее поведение хромосом описано также у межродовых гибридов *T. aestivum* L. x *H. vulgare* L. [Islam, Shepherd, 1980], а также *T. turgidum* L. x *Ae. tauschii* Coss. [Xu, Joppa, 1995, 2000; Cai et al., 2010; Matsuoka et al., 2013]. Для обозначения данного типа деления авторы Xu, Joppa используют термин FDR (first division restitution, реституция в первом делении) [Xu, Joppa, 1995, 2000]. Другие же авторы, поскольку данный механизм отличался от механизмов реституции, описанных у других видов, предложили свое название - UMCD (unreduced meiotic cell division, нередуцированное мейотическое клеточное деление) [Cai et al., 2010], что осложняет чтение и описание литературы по реституции у пшеницы.

Другой механизм реституции был описан у амфигаплоидов *Ae. heldreichii* x *T. durum* [Maan, Sasakuma, 1977]. У гибридов наблюдалось два основных типа поведения хромосом: эквационное расхождение хромосом в МI с последующим блокированием второго деления (эквационное деление, рис. 1.7 1) и случайное распределение хромосом между полюсами [Maan, Sasakuma, 1977]. Образование нередуцированных гамет после эквационного деления унивалентных хромосом описано у гибридов *T. turgidum* L. x *Ae. tauschii* Coss. [Matsuoka, Nasuda, 2004; Zhang et al., 2007], однако для описания данного механизма авторы ввели термин «единственное деление мейоза» (SDM, single-division meiosis), поскольку образование нередуцированных гамет происходило в результате только одного деления.

Оба вышеописанных механизма реституции могут одновременно присутствовать у *T. turgidum* L. x *Ae. tauschii* Coss., либо может присутствовать только один из них [Xu, Joppa, 2000; Zhang et al., 2007, 2008]. Механизм реализации реституции у гибридных растений зависит от генотипа [Xu, Joppa, 2000; Zhang et al., 2007, 2008], кроме того, частота образования нередуцированных гамет, а,

следовательно, и фертильность растений генетически обусловлены, а также могут быть связаны с изменением условий окружающей среды [Zhang et al., 2008]. Xu и Jorra описали несколько возможных механизмов реституции в мейозе межродовых гибридов тетраплоидной пшеницы *T. turgidum* L. (LDN, с замещением хромосом А и В геномов гомеологичными хромосомами D-генома) с эгилопсом *Ae. tauschii* Coss. (образец RL4175) [Xu, Jorra, 2000]. У большинства гибридов формирование нередуцированных гамет происходило после образования реституционного ядра в конце первого деления вследствие нерасхождения хромосом в МI и их декомпактизации (авторы использовали термин FDR, для описания такого типа реституции). Однако скрещивание растений *T. turgidum* L. (LDN) с другим образцом *Ae. tauschii* Coss. (YM9508) приводило к формированию нередуцированных гамет после эквационного деления с последующим блокированием второго деления (SDM) [Matsuoka, Nasuda, 2004]. Авторы предположили, что такое поведение хромосом и блокирование второго деления обусловлены использованием *Ae. tauschii* Coss. образца YM9508 [Matsuoka, Nasuda, 2004], а не RL4175, как у Xu и Jorra [1995, 2000]. У пшенично-эгилопсных гибридов LDNx RL4175 с замещением 1D(1A) наблюдалось преимущественно эквационное деление хромосом в МI с последующим аномальным вторым делением, которое приводило к образованию как нередуцированных гамет, так и анеуплоидных гамет. А замещение 4D(4A) приводило к подавлению FDR-реституции и стерильности гибридов, из чего авторы сделали вывод, что хромосома 4A несет ген, определяющий высокую частоту образования нередуцированных FDR-гамет [Xu, Jorra, 2000].

Наличие FDR и SDM механизмов было показано в мейозе у гибридов *T. turgidum* L. (подвид *turgidum*) x *Ae. tauschii* Coss. (сорт AS60) [Zhang et al., 2007]. Поскольку формирование реституционных гамет происходило в результате блокирования одного из делений и расхождения сестринских хроматид к разным полюсам (как в митозе), авторы предложили называть общий механизм реституции у пшеницы митоз-подобным делением (mitotic-like) [Zhang et al., 2007]. Однако в более поздней работе, с использованием тех же растений *T. turgidum* L. (подвид *turgidum*) x *Ae. tauschii* Coss. (сорт AS60), Hao с соавторами [2014] предположили преимущественное образование нередуцированных гамет в результате FDR-

реституции. Авторы отметили, что нормальное второе деление, после образования реституционного ядра, приводит к образованию более правильных гамет (FDR с образованием реституционного ядра), в то время как расхождение сестринских хроматид в первом делении (FDR без образования реституционного ядра) часто может сопровождаться анеуплоидией, и, соответственно, сниженной фертильностью [Hao et al., 2014]. В данной работе также было отмечено, что реализация реституции у гибридов пшеницы генетически регулируется и зависит от склонности/низкой способности к полиплоидизации, а также может зависеть от условий окружающей среды. Согласно данной гипотезе, пшенично-эгилопсные гибриды более склонны к полиплоидизации, что может быть связано с преобладанием у них FDR с образованием реституционного ядра [Hao et al., 2014].

Во многих работах по гибридизации тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы с рожью показано, что нередуцированные гаметы могут формироваться в результате эквационного деления хромосом в МI [Silkova et al., 2011, 2013; Oleszczuk, Lukaszewski, 2014]. Для триплоидных гибридов F_1 *T. turgidum* L. x *S. cereale* L. было установлено, что основным механизмом формирования нередуцированных гамет является реституция первого деления (FDR, по аналогии с реституцией у других видов, см пред раздел.) (рис. 1.7 1 и 1.8 а), с последующим блокированием второго деления [Oleszczuk, Lukaszewski, 2014].

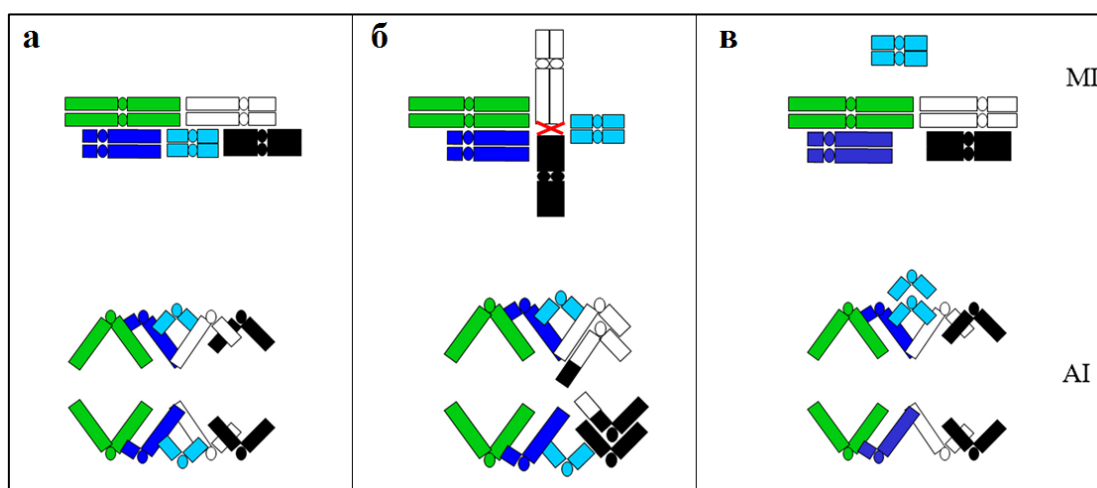


Рисунок 1.8. Механизмы реституции у пшенично-ржаных гибридов [по Oleszczuk, Lukaszewski, 2014].

Однако авторы описывают также два других механизма, предполагающих образование единичных бивалентов (рис. 1.8 б) и преждевременную миграцию отдельных унивалентов (рис. 1.8 в) в первом делении, с последующим блокированием второго деления. Результатом данных двух механизмов являются несбалансированные микроспоры: с одинаковым числом хромосом, но с нуллисомией по одной гомеологичной хромосоме и дисомией по другой (рис. 1.8 б), а также с различающимся числом хромосом (рис. 1.8 в).

Для пшенично-ржаных гибридов с участием гексаплоидной пшеницы (ABDR) показано большее число, по сравнению с тетраплоидной (ABR), цитологических типов реституции. У гибридов *T. aestivum* L. x *S. cereale* L. (ABDR) было выявлено несколько предположительных механизмов образования нередуцированных гамет, включая нерасхождение хромосом во втором и первом делении [Силкова и др., 2003, Silkova et al., 2011, 2013], а также при неравном расхождении хромосом в первом делении [Щапова и др., 1989]. При гибридизации гексаплоидной пшеницы сорта Саратовская 29 с рожью, в части клеток в метафазе I хромосомы выстраивались в эквационной плоскости и деконденсировались, затем происходило блокирование первого деления, с последующим разделением хромосом во втором делении (рис. 1.7 2) [Силкова и др., 2003]. Однако в части случаев, выстроившиеся на экваторе хромосомы, разделялись на сестринские хроматиды и начинали движение к противоположным полюсам, но деление также блокировалось и хромосомы деконденсировались (рис. 1.7 5) [Силкова и др., 2003]. В других мейоцитах хромосомы располагались по кругу кинетохорами внутрь, что также сопровождалось их дальнейшей деконденсацией и образованием реституционного ядра в форме кольца (рис. 1.7 4) [Силкова и др., 2003]. Предполагается, что такая организация хромосом в первом делении может быть реализована в результате ошибок формирования веретена деления, а именно, формирования однополюсного веретена [Shamina et al., 2003, Шамина, 2005].

Как и у пшенично-эгилопсных гибридов, у пшенично-ржаных гибридов в разных мейоцитах одного растения могут наблюдаться разные механизмы реституции [Силкова и др., 2003, Silkova et al., 2011]. Кроме того, наличие/преобладание отдельных механизмов также зависит от генетического фона гибридов [Силкова и др., 2007, 2009; Silkova et al., 2013]. Так, при

скрещивании дисомно-замещенных линий пшеницы (*T. aestivum* L.) с рожью (*S. cereale* L.) было выявлено преобладание эквационного расхождения хромосом с образованием диад в МІ (до 97.04% в отдельных пыльниках), при замещениях 1Rv/1A, 1R/1A, 5R/5D и 6R/6A [Silkova et al., 2011] и полное отсутствие такового у гибридов с замещением 2R/2D₁, 2R/2D₂ [Силкова и др., 2007; Silkova et al., 2011]. У гибридов 2R(2D)₁xR, 2R(2D)₂xR хромосомы произвольным образом распределялись между противоположными полюсами в МІ. Разделение на хроматиды с образованием тетрад происходило во втором делении, что приводило к образованию несбалансированных гамет и стерильности данных растений [Silkova et al., 2011].

Первые работы по изучению реституции у межродовых гибридов пшеницы были основаны на сопоставлении и описании цитологических препаратов, окрашенных ацето-орсеином [Islam, Shepherd, 1980], карбол-фуксином [Xu, Jorra, 1995, 2000], и ацетокармином [Zhang et al., 2007, 2008], которые окрашивают преимущественно хроматин, и определение стадии деления было затруднительно. В более поздних работах, для лучшего различения стадий мейотического деления, было использовано иммуноокрашивание, сочетающее визуализацию хромосом (пропидий-йодид, DAPI) и веретена деления (антитела к α -тубулину микротрубочек) [Cai et al., 2010; Matsuoka et al., 2013]. Кроме того, в своей работе Matsuoka с соавторами использовали также иммуноокрашивание с антителами к фосфорилированному гистону H3Ser10, для которого характерна локализация по всей длине хромосом в первом делении мейоза и только в области центромеры во втором делении [Kaszas, Cande, 2000; Manzanero et al., 2000]. Стоит отметить, что на данный момент нет опубликованных работ, детально описывающих (с использованием иммуноокрашивания) механизм реституции при нерасхождении хромосом во втором делении (эквационное деление, SDM). В некоторых случаях для лучшей визуализации поведения и организации хромосом в мейозе у гибридов пшеницы использовали FISH с зондами к центромерным повторам [Oleszczuk, Lukaszewski, 2014; Hao et al., 2014].

1.4. Заключение

Полиплоидизация играет важную роль в эволюции и широко используется в сельском хозяйстве благодаря проявлению гетерозиса, способности к восстановлению фертильности и пластичности генома получаемых растений. Мягкая пшеница – аллогексаплоид, сформированный в результате 2 этапов аллополиплоидизации, является одной из основных пищевых культур. За время селекции тетраплоидной, а потом и гексаплоидной пшеницы произошло обогащение их генофонда по одним генам и обеднение по другим (например, зимостойкость, устойчивость к биотическим и абиотическим факторам). Для увеличения генетического разнообразия пшеницы используют перенос генов от диких видов пшеницы и других видов *Triticeae* при отдаленной гибридизации, первым этапом которого является получение частично-фертильных гибридов.

У гибридов пшеницы, вследствие наличия локуса *Ph1*, практически полностью отсутствует гомеологичное спаривание, что приводит к наличию преимущественно унивалентных хромосом в MI и стерильности. Восстановление фертильности гибридов происходит в результате мейотической реституции. Механизмы и генетическая регуляция реституции лучше всего изучены у двудольных растений картофеля и арабидопсиса, и связаны, в большей степени, с нарушениями в синапсисе и когезии хромосом, блокированием перехода из первого во второе деление или с ошибками построения веретена деления или клеточной стенки. У пшенично-чужеродных гибридов описано несколько различных цитотипов реституции, однако к настоящему времени нет единого четкого представления о ее механизме(ах). На основе этих данных и того факта, что реституция у пшенично-чужеродных гибридов генетически регулируется, в представленной работе в качестве родительских форм были использованы линии пшеницы с замещениями 1R/1A, 1Rv/1A, 2R/2D, 5R/5D и 6R/6A, что обеспечивало различный генетический фон пшенично-ржаных амфигаплоидов. Структура и поведение хромосом, а также организация аппарата деления в мейозе пшенично-ржаных амфигаплоидов были исследованы с помощью современных методов – иммуноокрашивания и флуоресцентной *in situ* гибридизации.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

В качестве материалов для исследования были использованы рожь посевная *S. cereale* L. сорт Онохойская (RR, $2n=14$), пшеница *T. aestivum* L. сорт Саратовская 29 (AABBDD, $2n=42$), и пшенично-ржаные гибриды 1Rv(1A)xR; 2R(2D)₁xR; 5R(5D)xR; 6R(6A)xR (ABDR, $4x=28$). В качестве исходных родительских растений для получения амфигаплоидов были использованы 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]. Гибридные генотипы амфигаплоидов имеют систему контроля *Ph*-локусов.

Растения выращивались на экспериментальном поле СГК ИЦиГ СО РАН (55°01'00" N. 82°55'00" E) (летняя вегетация 2013, 2014), а также в условиях гидропонной теплицы (осенние и весенние вегетации 2012, 2013, 2014) при температурном режиме 24/18°C (день/ночь) и фотопериоде 16/8 часов (день/ночь). Для флуоресцентного анализа и иммуноокрашивания было отобрано от 2 до 12 гибридных растений, для каждого из которых было проанализировано от 77 до 1582 клеток (табл. 2.1). Для статистического анализа поведения хромосом в мейозе при окрашивании ацетокармином было отобрано по 5 гибридных растений, проанализировано по 500 мейоцитов для каждой из гибридных комбинаций (табл. 2.1).

Таблица 2.1. Число анализируемых клеток отдельных линий.

Линия/гибрид	метод	Число клеток
1Rv(1A)xR	FISH	77
6R(6A)xR	FISH	397
Рожь	FISH	202
C-29	FISH	15
1Rv(1A)xR	иммуноокрашивание	596
6R(6A)xR	иммуноокрашивание	119
2R(2D) ₁ xR	иммуноокрашивание	499
5R(5D)xR	иммуноокрашивание	1582
Рожь	иммуноокрашивание	785
C-29	иммуноокрашивание	222
1Rv(1A)	иммуноокрашивание	42
2R(2D) ₁	иммуноокрашивание	38
5R(5D)	иммуноокрашивание	183
6R(6A)	иммуноокрашивание	41
1Rv(1A)xR	ацетокармин	500
6R(6A)xR	ацетокармин	500
2R(2D) ₁ xR	ацетокармин	500
5R(5D)xR	ацетокармин	500

2.2. Методы

Формирование аппарата деления в митозе (в делящихся клетках корневой меристемы) и мейозе (в материнских клетках пыльцы) изучали с помощью иммуноокрашивания с антителами к α -тубулину (Sigma), который связывается с α -тубулином микротрубочек и к CENH3 [Houben et al., 2006], который детектирует активный кинетохор. Антитела к гистону CENH3 были любезно предоставлены доктором А. Хоубеном (IPK, Gatersleben, Germany).

Организацию ДНК в области центромеры изучали с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации с использованием специфичных для области центромеры проб *Ae. tauschii* pAet6-09 [Zhang et al., 2004], которая гибридизуется в области первичной перетяжки хромосом у ржи и пшеницы, и pAwRc [Francki, 2001], которая гибридизуется в области первичной перетяжки у хромосом ржи. 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.

Модификацию гистона H3 изучали с использованием метода иммуноокрашивания с антителами к pH3Ser10 (Active motif).

Окрашивание микроспороцитов для статистического анализа проводили ацетокармином (2%). Статистический анализ проводили с помощью t-критерия Стьюдента. Все данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего.

2.2.1. Трансформация компетентных клеток *E.coli*

К 200 мкл суспензии компетентных клеток добавляли 1 мкл (0.1 мкг) ДНК плазмиды pAet6-09, pAwRc. Смесь компетентных клеток с ДНК выдерживали во льду в течение 30 мин, после чего помещали в термостат при 37°C на 5 мин. Суспензию клеток высевали на агаризованную литическую среду (LB) (5.0 г/л дрожжевой экстракт; 10 г/л бактотриптон; 10 г/л NaCl, 12 г/л агар, pH=7.2), содержащую 50 мкг/мл ампициллина и инкубировали при 37°C в течение ночи. Далее отдельные колонии помещали в жидкую среду LB (5.0 г/л дрожжевой экстракт; 10 г/л бактотриптон; 10 г/л NaCl, pH=7.2), содержащую 50 мкг/мл ампициллина и инкубировали в шейкере при 37°C, 200 об/мин в течение 15-16 часов.

2.2.2. Выделение плазмидной ДНК из клеток *E.coli*

Для выделения плазмидной ДНК ночную культуру бактерий (в литической среде) разливали по 1.5 мл в пробирки объемом 2 мл и центрифугировали в течение 2 мин при 5000 g (8600 об/мин) при комнатной температуре. После удаления супернатанта, пробирки помещали на -20°C на 30 мин для лучшего разрушения клеточной стенки бактерий. Затем на 1.5 мл культуры добавляли 100 мкл раствора 1 (50 mM глюкоза, 25 mM Tris, 10 mM ЭДТА), и RNКазу-А до

конечной концентрации 100 мкг/мл, ресуспендировали осадок и помещали пробирки на лед. После добавления 200 мкл раствора 2 (0.2 М NaOH, 1% SDS) и аккуратного перемешивания, пробирки выдерживали на льду в течение 10 минут. Далее добавляли 150 мкл раствора 3 (3 М KAc, pH 4,8), аккуратно перемешивали и выдерживали на льду в течение 10 минут. После центрифугирования при 8000g (10900 об/мин) в течение 15 мин при 4°C, супернатант отбирали в пробирку с 300 мкл холодного изопропанола, перемешивали переворачиванием 2-3 раза и помещали на -20°C на 30 мин (до 2 часов). Далее пробирки центрифугировали на максимальных оборотах в течение 15 мин при 4°C, сливали супернатант и дважды промывали 70% этанолом (-20°C). Высушенный при комнатной температуре осадок, растворяли в 20-40 мкл однократного TE (Tris-EDTA) (10 mM Tris HCl, 1 mM ЭДТА, H₂O) буфера.

2.2.3. Выделение суммарной ДНК растений

Выделение ДНК проводили из 3-4-х дневных проростков ржи и пшеницы при помощи набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, № K0512) по методике производителя с дополнениями. Для этого 60-100 мг образца растирали в жидком азоте до мелкодисперсной массы. Полученную массу доводили 1xTE (10 mM Tris HCl, 1 mM ЭДТА, H₂O) буфером до конечного объема, равного 200 мкл и добавляли 400 мкл лизирующего буфера, 6 мкл РНКазы (100мг/мл). Затем препарат инкубировали при периодическом перемешивании в течение 10 минут при 65°C. Далее добавляли 600 мкл хлороформа, аккуратно переворачивали пробирки 3-5 раз для перемешивания и центрифугировали в течение 2 минут при 10000 об/мин. Отбирали верхний водный слой, содержащий ДНК, в новую пробирку и добавляли к нему свежеприготовленный раствор для осаждения (720 мкл деионизованной воды и 80 мкл концентрата раствора для осаждения). Перемешивали переворачиванием в течение 1-2 минут до выпадения ДНК, которую наматывали на носик пипетки и переносили в новую пробирку. Затем добавляли 100 мкл раствора NaCl и перемешивали переворачиванием 3-5 раз. Из раствора ДНК осаждали добавлением 300 мкл холодного 96% этанола с выдерживанием в течение 1-2 часов при -20°C и последующим

центрифугированием в течение 3-4 минут при 10000 об/мин. Полученную ДНК дважды промывали раствором холодного 70% этанола и растворяли в 1x TE буфере.

2.2.4. Мечение ДНК-зонда

Мечение зонда проводилось при помощи набора Nick Translation System (Invitrogen, № 18160-010) по методике, предложенной производителем. Реакционная смесь содержала 1 мкг ДНК (плазмидная ДНК или суммарная ДНК ржи), 2 мкл dNTP без dTTP (500 mM Tris HCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM 2-меркаптоэтанол, по 0.2 mM dCTP, dATP, dGTP), 2 мкл dUTP, ассоциированного с биотином/дигоксигенином, 2 мкл смеси ферментов ДНК-полимераза I/ДНКазы I (50 mM Tris HCl, 5 mM ацетата магния, 0.1 mM фенилметилсульфонилфторида и 0.1 mM 50% глицерина, 100 мкг/мкл BSA, 0.5 ед.акт./мкл ДНК-полимеразы 1, 0.4 ед.акт./мкл ДНКазы 1), 12.5 мкл H₂O. Инкубация смеси проводилась при 15°C в течение 3-5 часов для плазмид и в течение ночи для геномной ДНК ржи. Меченый зонд чистили от невключившихся нуклеотидов переосаждением. Для этого добавляли 1/10 объема 3M NaAc и 3 объема 96% этанола с последующим центрифугированием при 10000 об/мин в течение 20 минут.

2.2.5. Приготовление давленных препаратов митотических хромосом

Семена проращивали на влажной фильтровальной бумаге в чашке Петри, чередуя: день в холодильнике, ночь – при комнатной температуре. Для приготовления препаратов использовали корешки длиной 1-2 см. Несколько срезанных корешков помещали в пенициллиновые флаконы с дистиллированной водой. Флаконы с корешками выдерживали во льду (для пшеницы 24 часа, для ржи – 26 часов). По истечении времени корешки переносили в фиксирующий раствор Карнуа (3:1 96% этанол: ледяная уксусная кислота). Фиксацию проводили в холодильнике в течение 2-4 дней. Для окрашивания корешки помещали в 1% ацето-кармин на 30-40 минут. Корешок помещали на предметное стекло, удаляли с помощью лезвия кончик с корневым чехликом, затем аккуратно выдавливали его

содержимое на стекло в капле 45%-ой уксусной кислоты. Меристематическую ткань распределяли в капле уксусной кислоты и накрывали покровным стеклом размером 22×22 мм. После заморозки в жидком азоте снимали покровное стекло с помощью лезвия. Для обезвоживания препараты проводили через серию спиртов: 70%, 90% и 96%, по 5 минут, затем сушили на воздухе. До гибридизации препараты хранили в 96% этаноле при -20°C. Перед гибридизацией отбирали препараты с пластинками.

2.2.6. Флуоресцентная *in situ* гибридизация

1 день. Препараты промывали 3 раза по 5 минут в 2×SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M цитрат Na). Затем обрабатывали РНК-азой (100 мкг/мл), для этого наносили на препараты по 50мкл раствора РНКазы в 2×SSC, накрывали парафилмом и инкубировали во влажной камере при температуре 37°C в течение 1 часа. По истечении времени промывали 3 раза по 5 минут в 2×SSC и проводили через серию спиртов: 70%, 90% и 96%, по 5 минут в каждом. Подсохшие на воздухе препараты помещали в раствор 70% формамида (FA) в 2×SSC, нагретый на водяной бане до 70°C, на 2 минуты для денатурации ДНК. Далее стекла проводили через серию, охлажденных до -20°C, спиртов: 70%, 90%, 96%, по 5 мин в каждом, и сушили на воздухе. Далее на препараты наносили гибридизационную смесь, накрывали покровными стеклами 24×32 мм и инкубировали в течение ночи во влажной камере при температуре 37°C. Гибридизационная смесь содержала 50% FA, 4×SSC, 10% декстрансульфат натрия, конкурентную пшеничную ДНК (обработанная ультразвуком), ржаную ДНК, меченую дигоксигенином (dig) или биотином (bio) и плазмидную ДНК pAet6-09, меченую bio или dig, соответственно. Перед нанесением на препараты гибридизационную смесь денатурировали при 80°C в течение 10 минут с последующим охлаждением во льду.

2 день. Детекция биотинилированных зондов осуществлялась с помощью авидина, конъюгированного с флуоресцеином (Fluorescein Avidin D, Vector Laboratories, № А-2001), сигнал гибридизации усиливался с применением флуоресцеин анти-авидина (Fluorescein Anti-Avidin D, Vector Laboratories, № SP-2040). Зонды, меченные дигоксигенином, выявляли с помощью антител к

дигоксигенину, конъюгированных с родамином (Anti-digoxigenin-rhodamine, Fab fragments, Sigma-Aldrich, № 11207750910 ROCHE).

Для снятия покровных стекол препараты помещали в раствор 2×SSC. Препараты дважды промывали в предварительно нагретом до 42°C растворе 50% формамида в 2×SSC в течение 5 минут, а затем 3 раза по 5 минут в 2×SSC (42°C). Затем наносили по 50 мкл блокирующего буфера (3% BSA (бычий сывороточный альбумин), 4×SSC, 0.1% Tween20), накрывали парафилмом и инкубировали во влажной камере при 37°C в течение 1 часа. Аккуратно снимали парафилм и наносили по 50 мкл авидина, конъюгированного с флуоресцеином (разведение 1:400) в детекционном буфере (4×SSC, 0.1% Tween 20, 1% BSA), для детекции биотинилированных зондов. Снова накрывали парафилмом и инкубировали во влажной камере при 37°C в течение часа. Дальнейшие стадии проводили в темноте для предотвращения выгорания флуоресцентных красителей. Препараты промывали 3 раза по 5 минут в «растворе С» (4×SSC, 0.1% Tween20) на водяной бане при 42°C. Наносили по 40 мкл раствора флуоресцеин анти-авидина (разведение 1:100) и антител с родамином (разведение 1:100) в детекционном буфере (4×SSC, 0.1% Tween 20, 1% BSA). Накрывали парафилмом и помещали во влажную камеру на 1 час при 37°C. Промывали препараты 3 раза по 5 минут в «растворе С» на водяной бане при 42°C, затем дегидрировали в растворах этанола: 70%, 90%, 96%, по 5 минут. Подсушенные на воздухе препараты заключали в среду, замедляющую выцветание флуоресценции (Vectashield mounting medium, Vector laboratories, № X1215), содержащую 0.5 мкг/мл DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol, Sigma-Aldrich, № D9542) для окрашивания хромосом, накрывали покровными стеклами 24×32 мм и оставляли на ночь в сухой непрозрачной коробке в холодильнике при +4°C. Перед просмотром на флуоресцентном микроскопе края препарата заклеивали.

Анализ флуоресцентных сигналов проводили на микроскопе проходящего и отраженного света Axio Imager.M1 (Zeiss), с камерой ProgRes MF camera (Meta Systems, Jenoptic) в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

2.2.7. Иммуноокрашивание

1 день. Отбирали пыльники на необходимой стадии. У крупных пыльников бритвенным лезвием отрезали кончики, чтобы облегчить доступ фиксатора, содержащего 8% PFA (параформальдегид) и 1xPBS буфер (137 мМ NaCl, 2.68 мМ KCl, 1.76 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ Na_2HPO_4), внутрь пыльника. Надрезанные пыльники помещали на дно пробирки и фиксировали при комнатной температуре в течение 2 часов, затем промывали в 1xPBS буфере 4 раза по 15 минут. Чтобы избавиться от каллозной оболочки, пыльники инкубировали 5-10 минут в смеси ферментов: 1% пектиназа, 1% пектолиаза, 1% целлюлаза, промывали несколько раз по 5 минут 1xPBS буфером. Затем переносили пыльники на покрытое полилизинном стекло и выдавливали клетки из пыльника, распределяя их препаровальной иглой. Далее препараты во влажной камере помещали на -70°C на 15 минут для увеличения проницаемости клеток за счет микроповреждений кристаллами льда. После того, как препараты оттаивали, их инкубировали во влажной камере в растворе 0.5% тритон X-100 в течение 10 минут, капнув его на стекло. Затем промывали препараты 1xPBS буфером 2 раза по 15 минут и инкубировали с блокирующим буфером (обезжиренное молоко, 3% BSA, 1xPBS) в течение 30 минут. После непродолжительного споласкивания в 1xPBS, на препараты наносили первичные антитела к α -тубулину (Monoclonal Anti- α -Tubulin antibody produced in mouse, Sigma-Aldrich, № T5168) (разведение 1:2000) и pH3Ser10 (Histone H3S10ph antibody produced in rabbit, Active Motif, № 39254) (разведение 1:2000) или антитела к CENH3 (1:850), разведенные в 1xPBS буфере с 1% BSA, накрывали покровным стеклом, подложив под него с одной стороны швейную иглу, инкубировали во влажной камере при $+4^\circ\text{C}$ в течение ночи.

2 день. Промывали в 1xPBS буфере 4 раза по 15 минут при комнатной температуре и инкубировали с родамин-конъюгированными (Rhodamine (TRITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch, № 111-025-003) и FITC-конъюгированными (Anti-Mouse IgG (whole molecule)-FITC developed in Goat, Sigma, № F 0257) вторичными антителами (разведение 1:100 в 1xPBS буфере с 1% BSA) во влажной камере в течение 1 часа. Затем промывали 1xPBS буфером 4 раза по 15 минут и наносили среду против выцветания

(Vectashield mounting medium, Vector laboratories, № X1215), содержащую 0.5 мкг/мл DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol, Sigma-Aldrich, № D9542) на препараты. Препараты хранили в холодильнике при +4°C.

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 Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

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

В отличие от нормального мейотического деления, в МI которого бивалентные хромосомы выстраиваются в эквационной плоскости, а в АI гомологичные хромосомы сегрегируют к противоположным полюсам (рис. 3.1 а), мейоз амфигаплоидов характеризуется наличием унивалентных хромосом из-за полигаплоидного состояния генома. В связи с этим, мейотическое деление у гибридов было аномальным (рис. 3.1 б-и). Деление происходило асинхронно, и в одном пыльнике можно было наблюдать мейоциты, находящиеся на разных стадиях деления. В первом делении мейоза можно было наблюдать различное поведение унивалентных хромосом – их эквационное и/или редукционное расхождение, второе деление также характеризовалось асинхронностью и различным поведением хромосом, а также наличием одиночных хроматид в части мейоцитов, и заканчивалось образованием тетрад, полиад или диад (рис. 3.1 з,и). Первое деление, как было показано ранее [Silkova et al., 2011], характеризовалось различными типами поведения хромосом. Амфигаплоидные растения, полученные с использованием замещенных линий пшеницы, отличались по частоте встречаемости мейоцитов с различными типами поведения хромосом.

Анализ окрашенных ацетокармином препаратов показал, что в мейоцитах растений $2R(2D)_1xR$ в первом делении мейоза унивалентные хромосомы случайным образом распределялись между полюсами (рис. 3.1 б). Во втором делении мейоза, хромосомы выстраивались в эквационной плоскости в МII, затем в АII сестринские хроматиды расходились к противоположным полюсам. В ТII происходило формирование тетрад. Однако иногда могли встречаться тетрады с микроядрами или значительными отличиями в размере ядер. В данном случае происходило формирование несбалансированных гамет, приводящее к стерильности пыльцы. Описанный мейотический фенотип был назван

«редукционным типом деления» [Silkova et al., 2011] и в нашем эксперименте наблюдался в среднем у $83.5 \pm 2.3\%$ мейоцитов растений $2R(2D)_1xR$ независимо от условий культивирования (поле, теплица) (рис. 3.2).

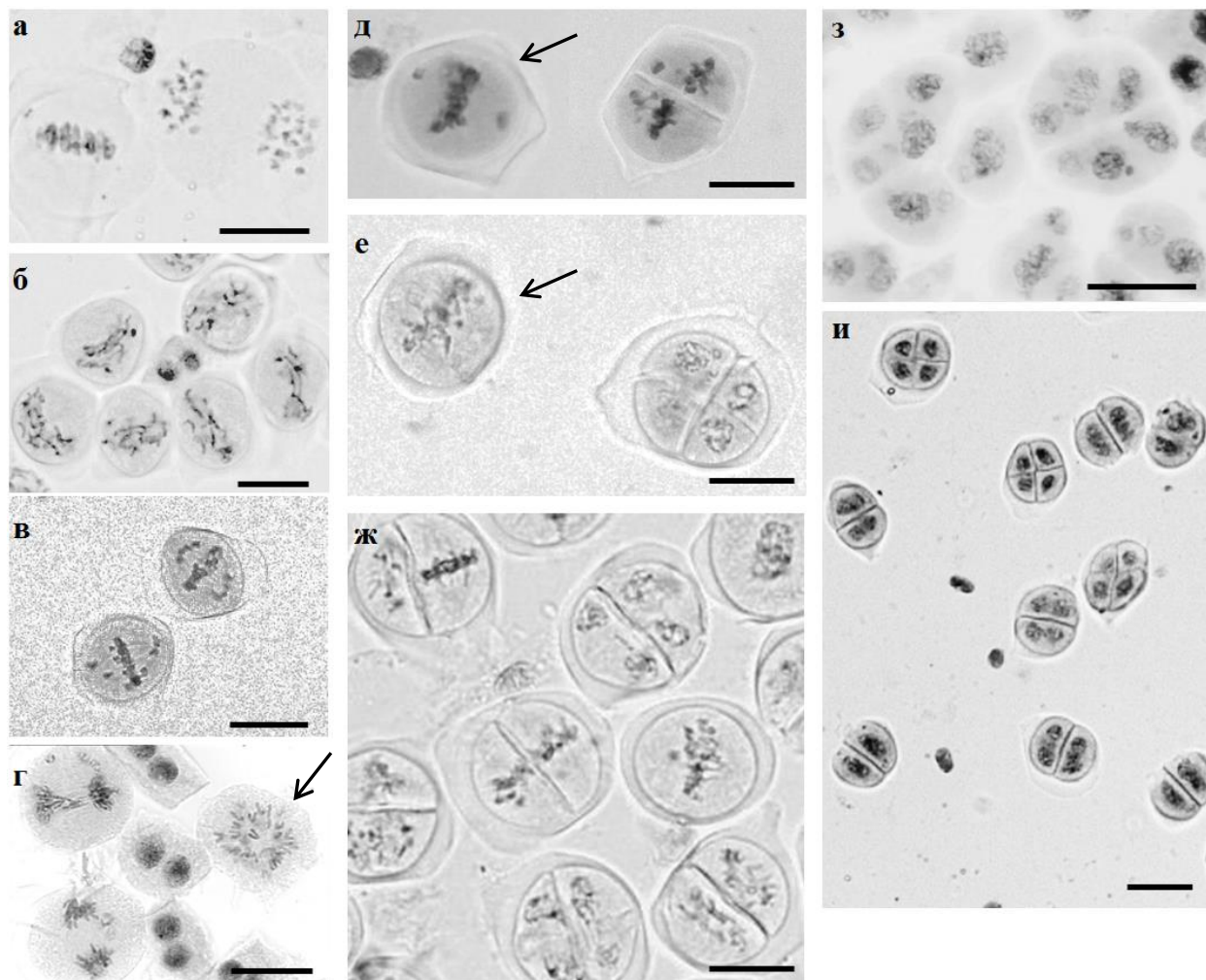


Рисунок 3.1. Первое деление мейоза в норме (а) и различные типы мейоцитов в первом и втором делении мейоза у амфигаплоидов (б-и): а) рожь, MI и AI, б) MI, редукционный тип деления, в) MI, редукционно-эквиационный тип деления, г) MI, мейоцит с блокированием первого деления (обозначен стрелкой), д) два различных типа мейоцитов, находящихся на разных стадиях деления в одном пыльнике - MI (обозначен стрелкой), MII, е) мейоцит с одним общим веретенем (обозначен стрелкой), тетрада, ж) второе деление мейоза, общий вид (асинхронность деления), з) полиады, и) диады и тетрады.

У гибридов F_1 $1Rv(1A)xR$, $5R(5D)xR$ и $6R(6A)xR$ мы наблюдали формирование четырех различных типов мейоцитов (4 различных типа деления). Первый тип соответствовал редукционному типу деления, которое наблюдалось у $2R(2D)_1xR$ и характеризовался случайным распределением унивалентных хромосом между полюсами. Второй тип деления был назван редукционно+эквиационным, поскольку

он отличался случайным распределением между полюсами одних унивалентных хромосом, в то время как остальные хромосомы выстраивались в эквационной плоскости (рис. 3.1 в) и в AI разделялись на сестринские хроматиды. К третьему типу мы отнесли мейоциты, у которых все унивалентные хромосомы (за исключением 1 или 2) выстраивались на экваторе в MI (рис. 3.1 д) и разделялись на сестринские хроматиды в AI, т.е. происходило эквационное разделение хромосом. Четвертый тип характеризовался выстраиванием близко расположенных унивалентных хромосом в виде кольца или круга (рис. 3.1 г), в данном случае первое деление блокировалось. Частота встречаемости этих четырех типов мейоцитов у амфигаплоидов была различной (рис. 3.2). У гибридов 1Rv(1A)xR, в среднем, $35.5 \pm 5.8\%$ мейоцитов имели эквационный тип деления, $39.4\% \pm 6.9\%$ - редуционный, $23.4 \pm 4.2\%$ редуционно+эквационный и только $1.7 \pm 0.9\%$ мейоцитов с блокированием первого деления. Гибриды 5R(5D)xR характеризовались наличием $30.8 \pm 7.3\%$ мейоцитов с эквационно-делящимися хромосомами, $48.0 \pm 8.3\%$ - с редуционным типом, $19.0 \pm 4.7\%$ с редуционно+эквационным и $2.2 \pm 0.9\%$ с выстраиванием хромосом в виде кольца. Однако в некоторых пыльниках растений 5R(5D)xR до 40.62% мейоцитов относились к четвертому типу. У гибридов 6R(6A)xR чаще, чем у других, наблюдалось эквационное разделение хромосом в первом делении мейоза – $41.0 \pm 6.8\%$. Редуционный тип деления встречался в $35.3 \pm 5.02\%$ мейоцитов, а редуционно+эквационный – в $23.3 \pm 3.1\%$, выстраивание хромосом в виде кольца встречалось довольно редко – в $0.4 \pm 0.1\%$ мейоцитов.

Поведение хромосом у 1Rv(1A)xR, 5R(5D)xR и 6R(6A)xR во втором делении также имело несколько различных типов, соотношение которых различалось как между растениями, так и между различными пыльниками одного растения. В части пыльников мы наблюдали выстраивание всех хромосом в эквационной плоскости в MII с разделением их на сестринские хроматиды в AII. В других пыльниках встречались как мейоциты с нормальным вторым делением, так и оставшиеся на стадии TI, и мейоциты, в которых образовывалось только одно веретено деления вместо двух (рис. 3.1 е). В некоторых мейоцитах с одним веретеном хромосомы имели компактизацию, соответствующую MI (более компактные) (рис. 3.1 д), в других – характерную для MII (рис. 3.1 е). В некоторых пыльниках наблюдались

преимущественно полиады (рис. 3.1 з), в других - диады (рис. 3.1 и). Диады, являющиеся результатом мейотической реституции, в конце созревания микроспороцитов могут давать фертильную пыльцу и завязывать семена, что и наблюдалось у растений всех групп, кроме $2R(2D)_1xR$.

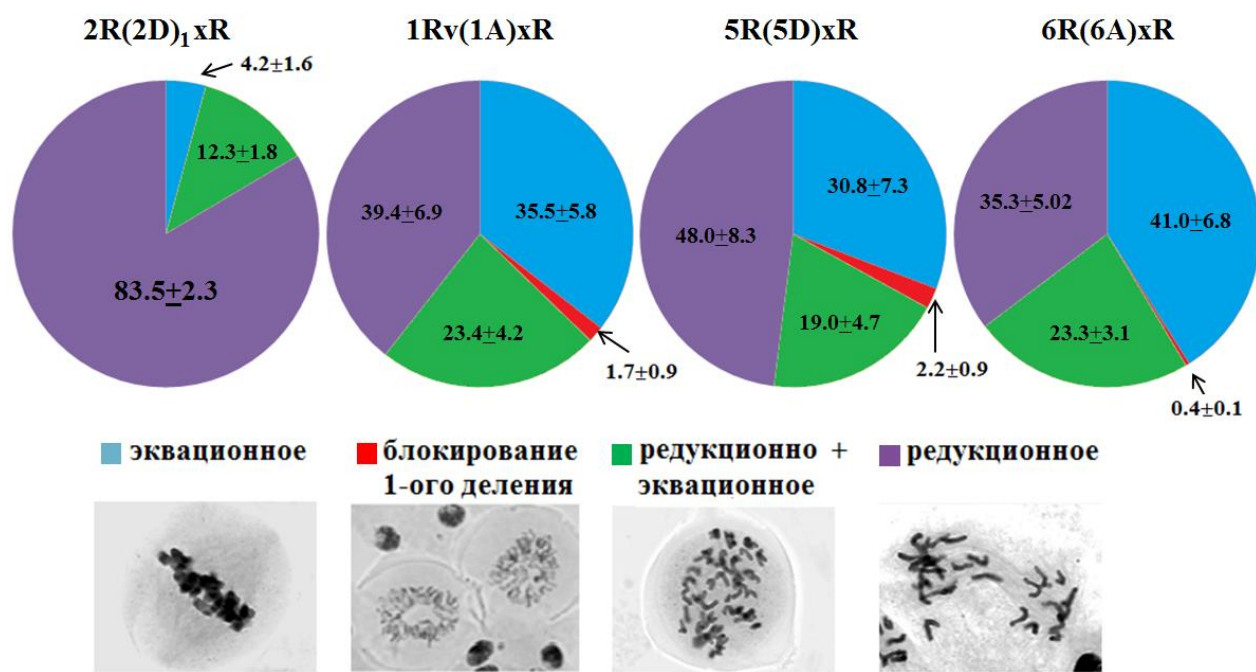


Рисунок 3.2. Распределение по частоте встречаемости 4 типов мейоцитов в первом делении у пшенично-ржаных амфигаплоидов.

Как было описано ранее [Silkova et al., 2011], в мейозе пшенично-ржаных гибридов F_1 Саратовская 29 с рожью также встречались все вышеперечисленные типы поведения хромосом, характерные для гибридов $1Rv(1A)xR$, $5R(5D)xR$ и $6R(6A)xR$. Однако распределение мейоцитов по типам деления достоверно отличалось: с эквационным типом - $20.04 \pm 5.11\%$, редукционно+эквационным - $13.14 \pm 6.24\%$, редукционным - $66.82 \pm 3.74\%$ мейоцитов.

Таким образом, замещение $2R/2D$ детерминирует редукционный тип деления, замещения $1Rv/1A$, и $6R/6A$ определяют эквационный тип деления, в то время как замещение $5R/5D$ может в некоторых случаях приводить к высокой частоте образования «кольца» в МI. Данные четыре гибридные комбинации позволяют наблюдать контрастное соотношение различных типов мейоцитов, что дает возможность лучше понять поведение хромосом в МI и судьбу клеток с редукционным, редукционно+эквационным и эквационным поведением хромосом.

3.2. Поведение хромосом с прямой визуализацией динамики микротрубочек, организации хромосом и их центромерных районов

3.2.1. Митоз и мейоз у 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. Иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину позволило визуализировать динамику микротрубочкового цитоскелета, а с помощью антител к фосфорилированному гистону H3Ser10 и кинетохорному белку CENH3 – организацию, динамику хромосом и архитектуру кинетохора. Гибридизация *in situ* с центромероспецифичными зондами pAet6-09 и pAwRc позволила визуализировать организацию ДНК в области центромеры на каждом из этапов деления.

Формирование веретена деления в митозе происходило сходным образом у растений ржи и пшеницы (рис. 3.3). Полученные нами данные не противоречили опубликованным на настоящий момент данным по формированию веретена у растений [Keijzer et al., 2014]. Известно, что отличительной чертой формирования веретена в митозе растений является отсутствие центросом и самоорганизация, основанная на естественной полярности МТ [Keijzer et al., 2014]. Сайтами нуклеации микротрубочек являются хромосомы и оболочка ядра [Keijzer et al., 2014]. В профазе митоза кортикальные МТ образовывали препрофазное кольцо (ППК), которое играет важную роль в определении плоскости деления (экватор), а перинуклеарные МТ формировали про-веретено, полярные шапочки которого определяли местонахождение будущих полюсов веретена (рис. 3.3 а). После разрушения ядерной оболочки в профазе короткие пучки МТ проникали в область ядра и взаимодействовали с хромосомами (рис. 3.3 б). Дальнейший рост МТ и организация кинетохорных пучков приводили к образованию специфичного для митоза биполярного бочкообразного (анастрального) веретена деления в метафазе, которое выравнивало хромосомы на экваторе (рис. 3.3 в). На полюсах веретена наблюдалось несколько центров конвергенции микротрубочек – миниполюсов.

В анафазе происходило укорочение кинетохорных пучков МТ, миниполюса сближались и, объединяясь, образовывали полюсные структуры (рис. 3.3 г,д). Митоз завершался образованием фрагмопласта (рис. 3.3 е) и построением новой клеточной стенки.

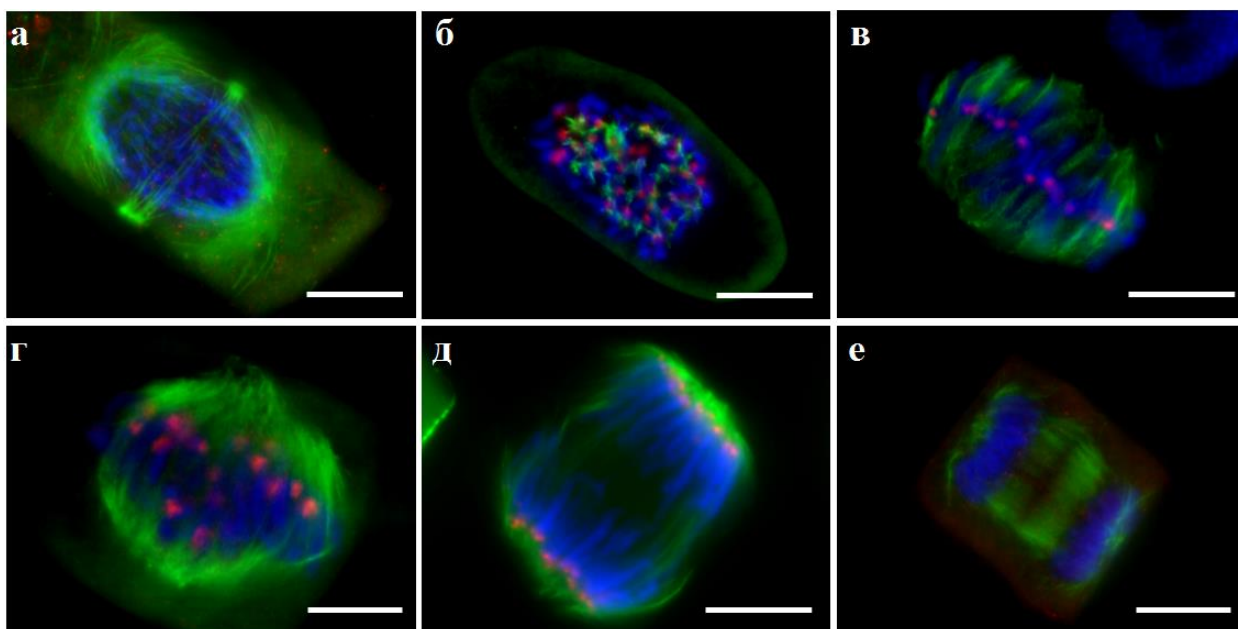


Рисунок 3.3. Формирование веретена деления и распределение rhH3Ser10 на хромосомах в митозе *Triticum aestivum* L.: иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и rhH3Ser10 (красный) а,б) профаза, в) метафаза, г,д) ранняя и поздняя анафаза, е) телофаза. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

В профазе митоза происходила компактизация хромосом и фосфорилирование гистона H3 по серину в 10 положении в области центromеры (рис. 3.3 б,в). На стадии метафазы хромосомы выстраивались в экваториальной плоскости (рис. 3.3 в, 3.4 а,г), 2 точечных сигнала локализации антител к SENH3 в области центromеры каждой из хромосом соответствовали биполярно-ориентированным сестринским кинетохорам, от которых отходили пучки МТ к противоположным полюсам (амфителлическое прикрепление МТ) (рис. 3.4 г). Сигналы гибридизации pAet6-09 в метафазе имели вид диффузных бэндов, растянутых поперек первичной перетяжки хромосомы (рис. 3.4 а). При переходе от метафазы к анафазе картина локализации центromерных зондов pAet6-09 менялась (рис. 3.4 а,б). При разделении сестринских хроматид в анафазе, сигналы гибридизации раздваивались и локализовались точно на каждой сестринской центromере, ориентировано к полюсам деления (рис. 3.4 б,в). На каждой из сестринских

хроматид в анафазе мы также наблюдали одиночные точечные сигналы иммулокализации pH3Ser10 (рис. 3.3 д) и анти-CENH3 (рис. 3.4 д). В телофазе происходила декомпактизация ДНК в дочерних ядрах, и исчезали сигналы pH3Ser10 (рис. 3.3 е), однако сигнал иммулокализации антител к CENH3 сохранялся (рис. 3.4 е). Характер локализации сигналов гибридизации зонда рAet6-09 в метафазе, анафазе и телофазе в клетках меристемы корешков пшеницы соответствовал локализации, описанной для митоза ржи (рис. 3.4 а-в).

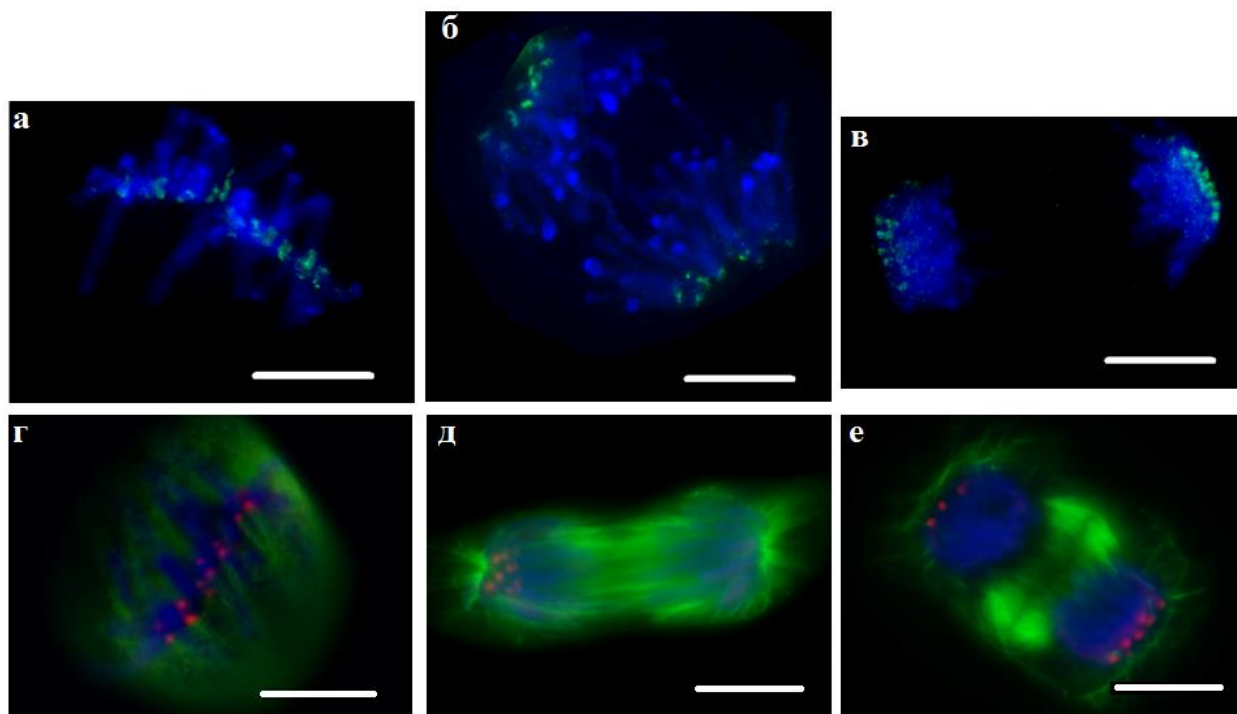


Рисунок 3.4. Организация и поведение центромерного района в митозе *Secale cereale* L.: FISH с центромерным зондом рAet6-09 (зеленый) а) метафаза, б) анафаза, в) поздняя анафаза; иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и CENH3 (красный): г) метафаза, д) анафаза, е) телофаза. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

Для родительских форм ржи, пшеницы и замещенных линий динамика микротрубочкового цитоскелета в мейозе была идентичной. Для иллюстрации представлены данные по растениям пшеницы *Triticum aestivum* L. (рис. 3.5, 3.6). В III мейоза наблюдалось преобразование ретикулярной системы МТ-пучков, сформировавшейся вокруг ядра в интерфазе, в систему прямых радиальных пучков (рис. 3.5 а). В диплотене МТ реориентированы из радиального положения в тангенциальное (рис. 3.6 б). МТ-пучки уплотняются, формируя перинуклеарную профазную систему – околядерное «кольцо» микротрубочек (рис. 3.6 б).

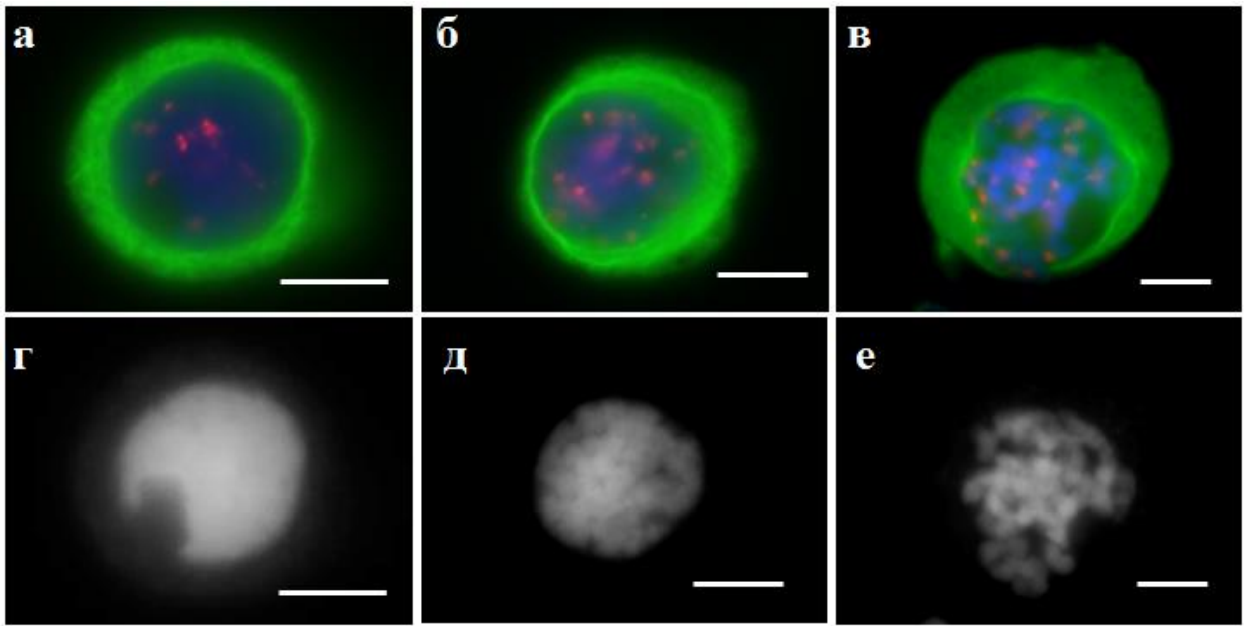


Рисунок 3.5. Формирование веретена деления в профазе I мейоза *Triticum aestivum* L.: иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и pH3Ser10 (красный) а) лептотена, б) пахитена, в) диакинез, г-е) компактизация хромосом в профазе I. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

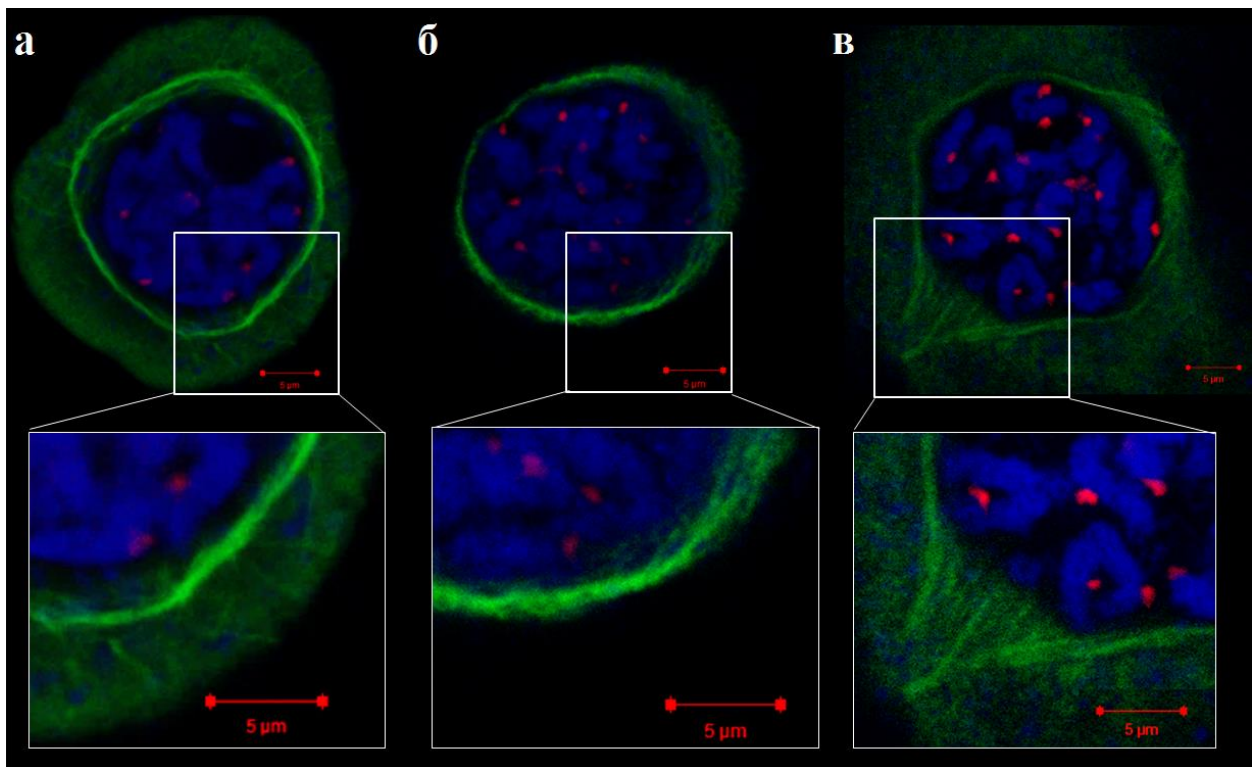


Рисунок 3.6. Динамика МТ в профазе I мейоза *Triticum aestivum* L. на стадиях диплотена и диакинез (конфокальный микроскоп): иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и CENH3 (красный) а) уплотнение перинуклеарных МТ, б) тангенциальная ориентация МТ, в) разрыв ЯО и формирование аналога митотических полярных шапочек. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 5 мкм.

Разрушение ядерной оболочки в диакинезе сопровождалось ее «впячиванием» (рис. 3.5 в) и затем - формированием структур МТ, напоминающих митотические полюсные колпачки (рис. 3.6 в). После разрушения ядерной оболочки, происходила нуклеация МТ возле хромосом (рис. 3.7 а), а затем формировались пучки МТ от кинетохоров (рис. 3.7 б). Кинетохорные пучки МТ удлинялись, ко-ориентировались и сближались с образованием двух полюсов, формируя в МІ конвергентное биполярное веретено (рис. 3.7 в).

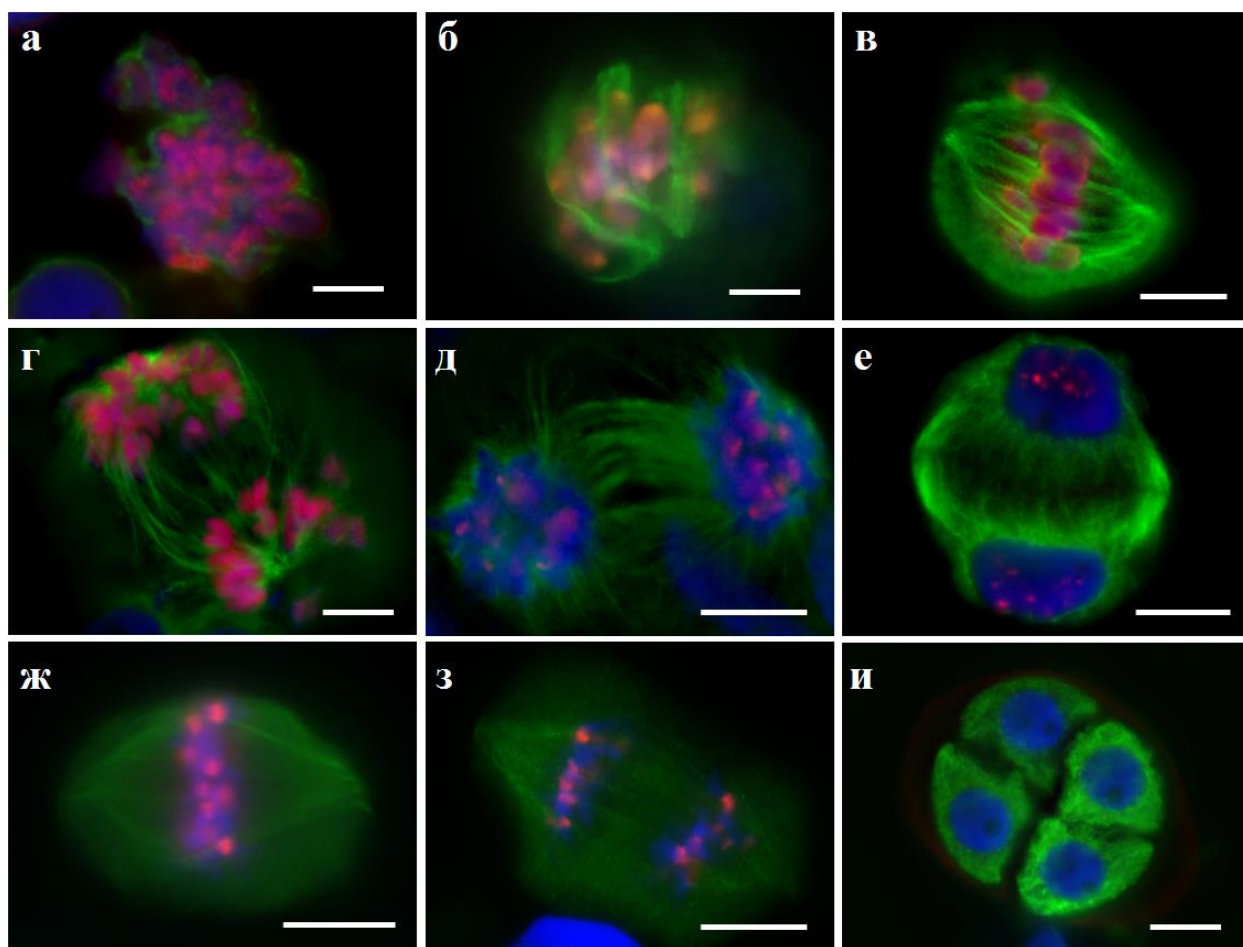


Рисунок 3.7. Формирование веретена деления и распределение сигнала pH3Ser10 на хромосомах в мейозе *Triticum aestivum* L: иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и pH3Ser10 (красный) а,б) профаза I, в) метафаза I, г,д) снижение сигнала pH3Ser10 в анафазе I, е) телофаза I, ж) метафаза II, з) анафаза II, и) тетрада. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

В АІ наблюдалась деполимеризация кинетохорных МТ, способствующая расхождению гомологичных хромосом к противоположным полюсам. В средней - поздней АІ можно было наблюдать интерзональную систему микротрубочек (рис. 3.7 г), которая в ТІ участвовала в формировании фрагмопласта во время

цитокинеза. В МII мы наблюдали формирование биполярного конвергентного веретена деления (рис. 3.7 ж), наличие интерзональных МТ в АII (рис. 3.7 з), и фрагмопласта в ТII.

В ПI мейоза происходила компактизация хромосом, синапсис гомологов и образование бивалентов (рис. 3.5 а-е). Во время компактизации хромосом на стадии лептотены детектировались точечные сигналы иммулокализации антител к фосфорилированному гистону H3Ser10 (рис. 3.5 а). Однако начало появления первых иммунофлуоресцентных сигналов варьировало в отдельных мейоцитах от ранней до средней профазы. В диакинезе сигнал pH3Ser10 распространялся на плечи хромосом (рис. 3.7 а,б), равномерно распределяясь по всей длине бивалентов к началу МI (рис. 3.7 в). В АI происходило разделение плечей сестринских хроматид и гомологи отходили к противоположным полюсам, при этом наблюдалось постепенное исчезновение сигнала pH3Ser10, начиная с плечей хромосом (рис. 3.7 г,д). В ТI сигнал pH3Ser10 преимущественно сохранялся только в прицентромержной области и исчезал к концу ТI вместе с декомпактизацией хромосом (рис. 3.7 е). Компактизация хромосом в МII была сопоставима с митотической. Во втором делении сигнал pH3Ser10 детектировался только в прицентромержной области хромосом (рис. 3.7 ж,з), начиная с ПII, и сохранялся на разделившихся сестринских хроматидах до ТII.

Динамика центромержных районов гомологичных хромосом и сестринских хроматид ржи и пшеницы хорошо визуализировалась при иммуноокрашивании с анти-CENH3 (рис. 3.8) и FISH с центромержо-специфичными зондами pAwRc (рожь) (рис. 3.9). На стадии диакинеза мы наблюдали одиночные плотные точечные сигналы гибридизации зонда pAwRc на каждой из гомологичных хромосом, соответствующие объединенным центромержам гомологов, расположенные на первичной перетяжке хромосомы (рис. 3.9 а). Кроме того, на каждом из гомологов мы наблюдали одиночный точечный сигнал иммулокализации антител к CENH3, соответствующий объединенному кинетохору монополярно-ориентированных сестринских хромосом (рис. 3.8 а). По мере наступления метафазы, сигналы локализации антител к CENH3 и зонда pAwRc становились более яркими и компактными на гомологах, образующих биваленты (рис. 3.8 б, 3.9 б). При этом одиночные плотные точечные сигналы гибридизации зонда pAwRc/локализации

антител к CENH3 на гомологичных хромосомах были ориентированы к противоположным полюсам (рис. 3.8 б, 3.9 б). Объединенные сестринские кинетохоры в МI были связаны с МТ, направленными к одному из полюсов (синтеллическое прикрепление МТ) (рис. 3.8 б). В АI мы не наблюдали существенных изменений в локализации антител к CENH3, а сигнал pAwRc был либо одиночный (но более рыхлый), либо раздваивался (рис. 3.8 в). Разделение сестринских кинетохоров в ТI определялось разделением сигналов иммулокализации анти-CENH3 (рис. 3.8 в).

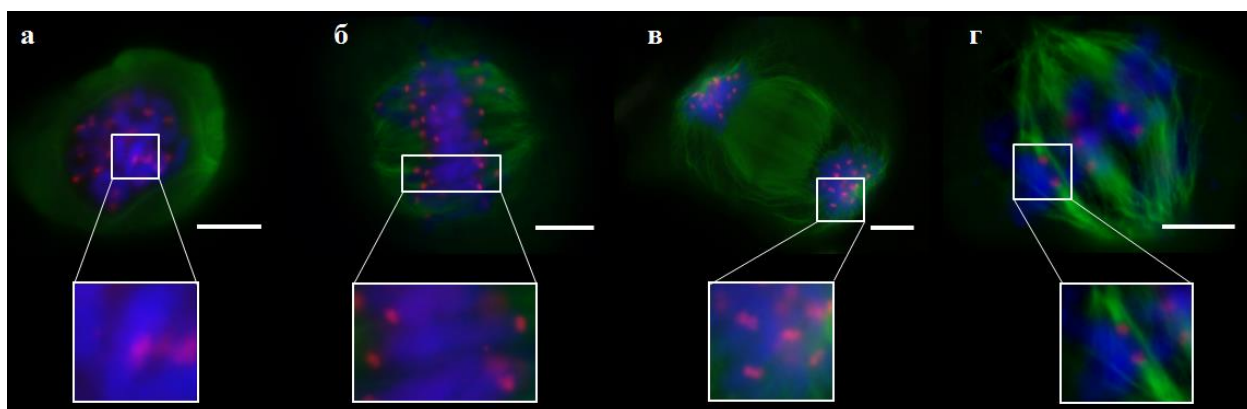


Рисунок 3.8. Изменение структуры и поведения центромерного района хромосом в мейозе *Triticum aestivum* L. (а-в), и *Secale cereale* L. (г): иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и CENH3 (красный) а) диакинез; б) метафаза I; в) телофаза I; г) метафаза II, масштабный отрезок – 10 мкм.

На хромосомах в области центромеры в ПII детектировались два близко расположенных плотных точечных сигнала CENH3, к МII расстояние между ними увеличивалось (рис. 3.8 г). Характер расположения сигналов гибридизации центромерного зонда pAwRc в МII отличался от такового в МI (рис. 3.9 б,г). В МII хромосомы располагались на экваторе, локализация сайтов гибридизации центромерного зонда имела вид диффузных натянутых бэндв поперек хромосомы (рис. 3.9 г). В поздней МII сестринские центромеры начинали разделяться, что демонстрировалось появлением двух локальных точечных сайтов гибридизации (рис. 3.9 д). В АII расходящиеся к полюсам сестринские хроматиды имели плотные гибридационные сигналы pAwRc/CENH3, ориентированные к противоположным полюсам (рис. 3.9 е).

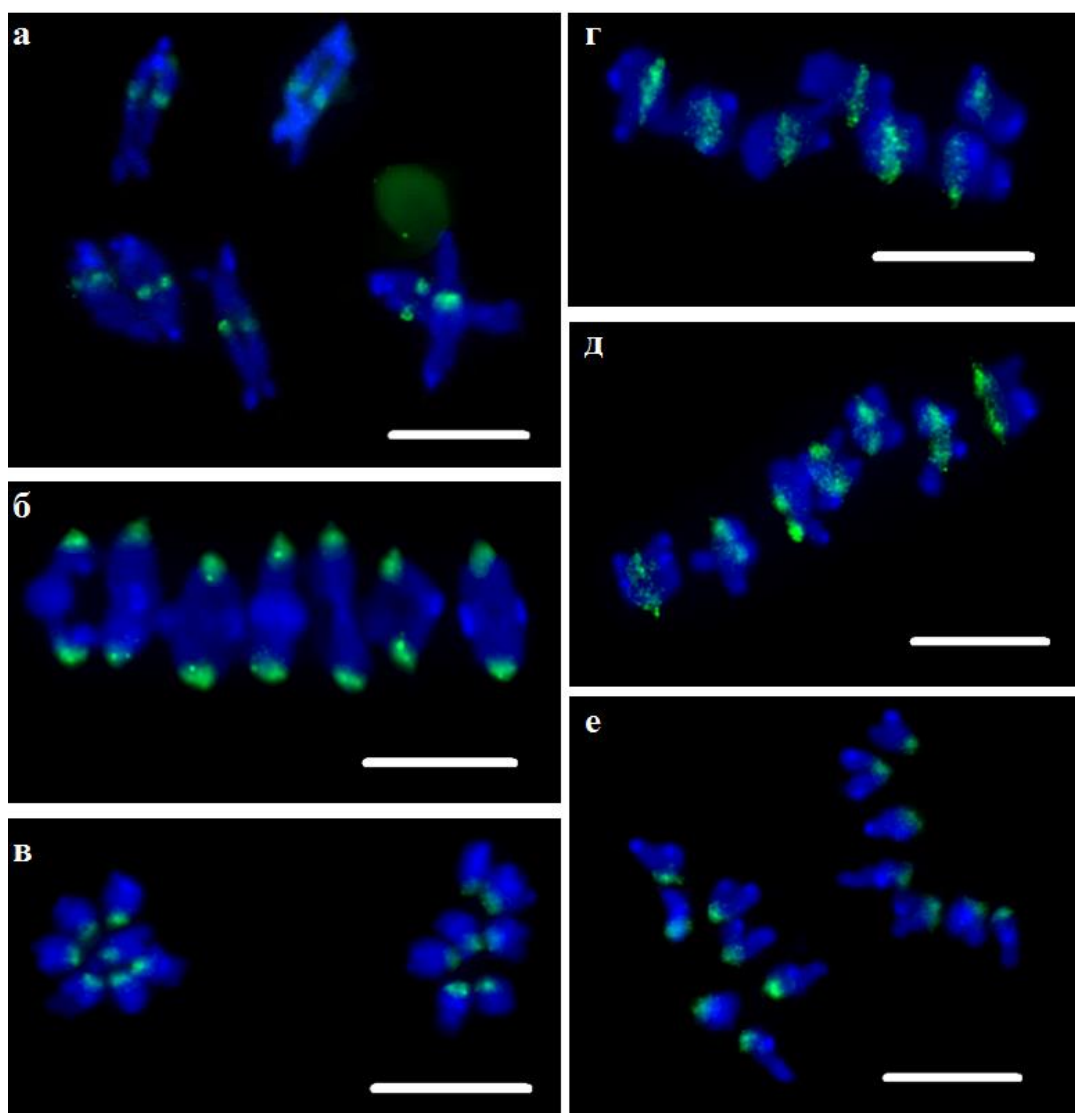


Рисунок 3.9. Изменение структуры центромерного района хромосом в мейозе *Secale cereale* L.: FISH с центромеро-специфичным зондом pAwRc (зеленый) а) диплотена; б) метафаза I, плотные единичные сигналы гибридизации; в) анафаза I; г) метафаза II; растянутые диффузные сигналы гибридизации д) поздняя метафаза II; разделение сестринских кинетохоров; е) анафаза II. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

Молекулярно-цитогенетический анализ показал, что в первом делении мейоза картина локализации pAwRc и CENH3 соответствовала монополярной ориентации сестринских хромосом, а во втором - биполярной ориентации. Выявленные различия были использованы нами в дальнейшем для идентификации моно- / биполярности в ориентации хромосом в мейозе амфигаплоидов. Различия в картине фосфорилирования в первом и втором делении были использованы для точного определения стадий мейоза у амфигаплоидов (отличия первого от второго мейотического деления).

Для систематизации полученных данных были составлены таблицы, содержащие сравнительные характеристики клеточного деления в норме (табл. 3.1) и в мейозе у пшенично-ржаных амфигаплоидов (табл. 3.2-3.5). Для каждого из типов деления (редукционное, редукционно+эквационное, эквационное, блокирование первого деления) в таблицах во втором и третьем столбце кратко обозначено (-/+ к какому типу деления (митоз или мейоз) ближе та или иная характеристика (см. далее, табл. 3.2-3.5).

Таблица 3.1. Основные сравнительные характеристики митотического и мейотического деления растений.

Характеристика деления		митотическое	мейотическое
Организация ДНК в области центромеры в метафазе (сигнал гибридизации pAet6-09, pAwRc)		растянутый диффузный	плотный точечный
Ориентация кинетохоров (сигнал иммулокализации антител к CENH3)		биполярная ориентация (двойной)	монополярная ориентация в МI (одиночный)
Компактизация хромосом		митотическая	мейотическая (более короткие, компактные в МI, более длинные в МII)
Когезия сестринских хроматид (сигнал иммулокализации антител к H3Ser10)		(область центромеры)	(по всей длине хромосомы в МI, область центромеры в МII)
Разделение сестринских хроматид	По плечам	до метафазы	начало анафазы I
	В районе центромер	анафаза	анафаза II
Деление		одно деление	два последовательных деления

3.2.2. Формирование аппарата деления в мейозе амфигаплоидов с редуционным типом деления

Поведение хромосом, описанное ранее, как редуционный тип деления, было наиболее характерно для растений $2R(2D)_1 \times R$, хотя встречалось у всех амфигаплоидов в разном процентном соотношении (рис. 3.2). III визуально не имела серьезных отличий в мейоцитах у амфигаплоидов и была аналогична III родительских форм. После разрушения ядерной оболочки мы наблюдали нуклеацию МТ вблизи кинетохоров конденсированных хромосом (рис. 3.10 а), в метафазе пучки МТ удлинялись (рис. 3.10 д), однако классического выстраивания хромосом в эквационной плоскости не происходило. Метафаза характеризовалась группой плотно расположенных хромосом в центре мейоцита (рис. 3.10 а,д). Хромосомы в данном случае были нормально компактизованы, а сигнал pH3Ser10 присутствовал по всей длине хромосом, как и в случае первого мейотического деления в норме (рис. 3.10 б).

Мейоциты, в которых хромосомы были распределены на группы, мы идентифицировали как анафазу (рис. 3.10 б,е). Мощные пучки кинетохорных МТ ассоциировали друг с другом, их минус-концы были сфокусированы в полюсную структуру. В этих мейоцитах наблюдались очень тонкие, слабо заметные единичные интерзональные МТ, либо они полностью отсутствовали (рис. 3.10 е). Кинетохорные пучки МТ распределяли хромосомы по группам, имитируя расхождение к полюсам. В некоторых случаях коориентация МТ-пучков не происходила, и хромосомы не образовывали группы (рис. 3.10 ж). В MI – AI мы наблюдали одиночные плотные точечные сигналы иммунолокализации антител к CENH3, соответствующие объединенному кинетохору сестринских хроматид, от которых отходили пучки МТ, направленные к одному из полюсов (рис. 3.10 е,ж, 3.11 б). Аналогично, на каждой хромосоме единичный сигнал гибридизации центромерной пробы pAet6-09 располагался в области первичной перетяжки и имел плотную точечную структуру (рис. 3.11 а).

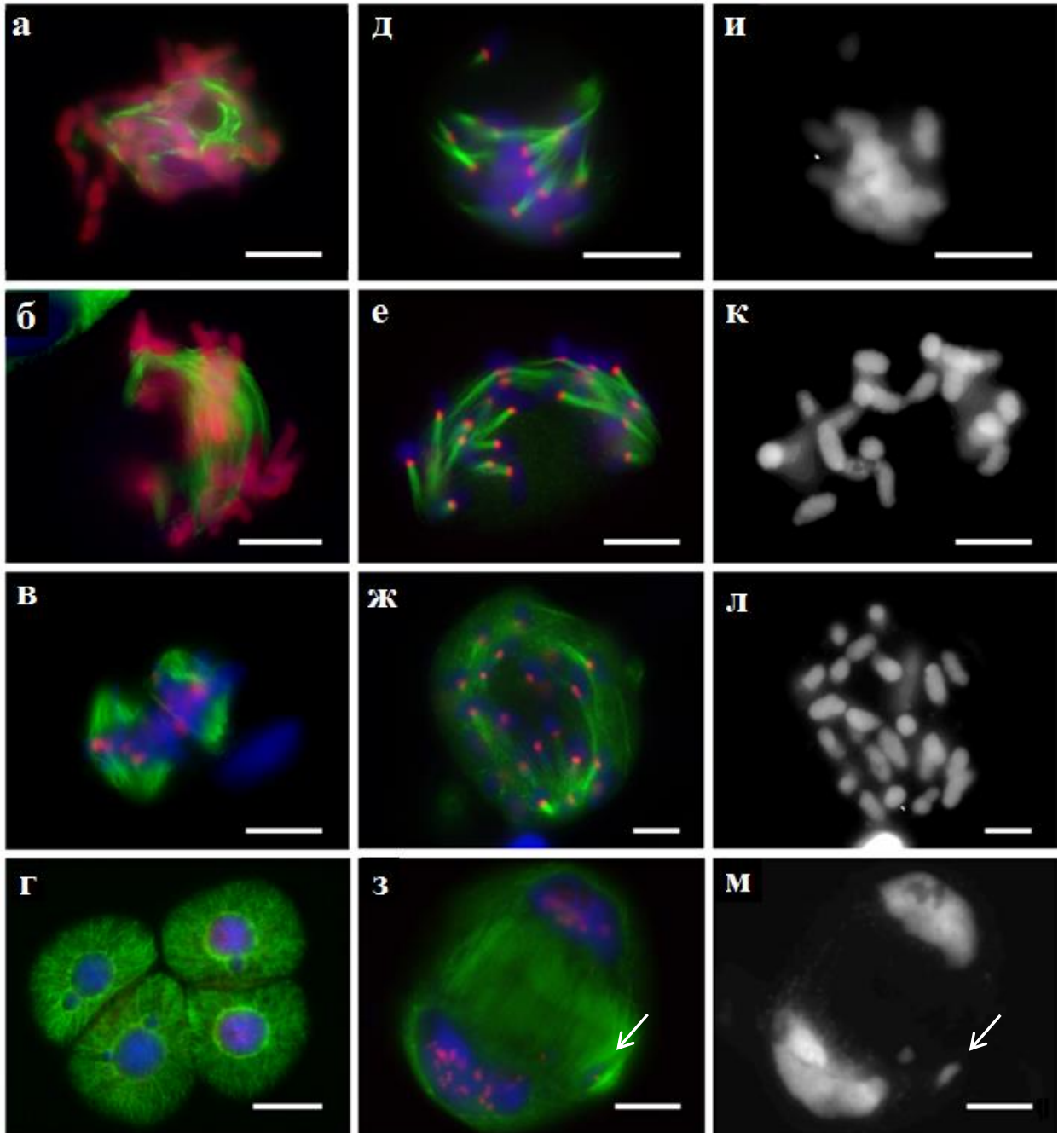


Рисунок 3.10. Поведение хромосом и формирование аппарата деления в мейозе пшенично-ржаных амфигаплоидов с редукционным типом деления: иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и pH3Ser10 (красный) (а-г): а) метафаза I, б) анафаза I, в) метафаза II, г) тетрада; иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и CENH3 (красный) (д-м): д,и) метафаза I, е,к) анафаза I, ж,л) аномальная анафаза I, з,м) телофаза I, (и-м) то же, что и д-з, DAPI-канал. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

Иногда в мейоцитах встречались хромосомы с одним растянутым сигналом анти-CENH3 поперек хромосом, от которого формировались пучки МТ по направлению к противоположным полюсам и, благодаря этому, хромосомы

располагались на экваторе. На более поздних стадиях происходило разделение таких сигналов с образованием двух точечных (рис. 3.11 в). Раздвоение сигнала сопровождалось разделением плечей хромосом, но не центромер сестринских хроматид, которые оставались связанными до второго деления. Такая локализация антител может свидетельствовать о том, что в МI в данных мейоцитах кинетохор представляет собой единую структуру, которая разделяется на более поздних стадиях. Мы не наблюдали классической конвергенции хромосом на экваторе и изменения монополярной ориентации на биполярную (реориентации). Еще одной особенностью такого расхождения хромосом была задержка (отсутствие) разделения сестринских хроматид в AI, даже у биполярно-ориентированных хромосом (рис. 3.10 б,е,к,л). Нередко в TII такие хромосомы оставались не включенными в ядра (обозначены стрелкой, рис. 3.10 з,м). Несмотря на малое количество интерзональных микротрубочек, в телофазе I формировался нормальный фрагмопласт (рис. 3.10 з).

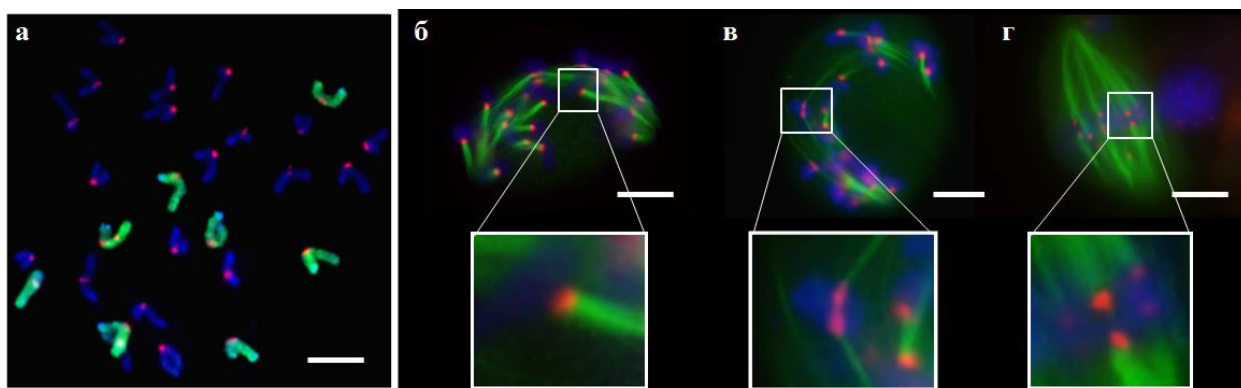


Рисунок 3.11. Изменение организации и поведения центромерного района хромосом в мейоцитах с редукционным типом деления: FISH с зондами pAet6-09 (красный), суммарная ДНК ржи (зеленый), метафаза I (а); иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и CENH3 (красный) (б-г): б) AI, монополярно ориентированный кинетохор, в) AI, разделение сестринских кинетохоров, г) MII, биполярно ориентированный кинетохор. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

Формирование аппарата деления во втором делении мейоза практически не отличалось от такового в норме. Второе деление характеризовалось образованием биполярного веретена и выстраиванием хромосом в экваториальной плоскости в MII (рис. 3.10 в, рис. 3.11 г). Расположенные на экваторе хромосомы имели по 2

сигнала СЕННЗ, соответствующие разделенным сестринским кинетохорам (рис. 3.11 г). Компактизация хромосом в МП была аналогична компактизации в нормальном втором делении и митозе. Сигнал pH3Ser10 наблюдался в области центромеры на всех хромосомах (рис. 3.10 в), начиная с ПП и до ТП. После расхождения сестринских хроматид в АП происходило образование тетрад (рис. 3.10 г).

Сопоставление некоторых характерных особенностей редукционного деления с нормальным митозом и мейозом (табл. 3.2) позволило сделать предположение, что деление в мейоцитах «редукционного типа» проходит по мейотическому пути с отклонениями. Пшенично-ржаное замещение хромосом 2R/2D определяет формирование преимущественно монополярно-ориентированных хромосом в первом делении, и отсутствие блокирования первого деления, несмотря на неспособность хромосом выстраиваться в экваториальной плоскости.

Таблица 3.2. Основные характеристики мейотического деления пшенично-ржаных амфигаплоидов с редукционным типом деления.

Характеристика деления		митотическое	мейотическое
Организация ДНК в области центромеры в метафазе		–	+
Ориентация кинетохоров		–	+
Компактизация хромосом		–	+
Когезия сестринских хроматид		–	+
Разделение сестринских хроматид	По плечам	–	нет разделения в АІ
	В районе центромер	–	+
Деление		–	+

3.2.3. Формирование аппарата деления в мейозе амфигаплоидов с редуционно+эквационным типом деления

Мейоциты с редуционно+эквационным типом деления встречались у гибридов всех изученных комбинаций скрещивания. Специфической особенностью у таких мейоцитов являлось различное поведение хромосом в первом делении. В МI одни хромосомы выстраивались в экваториальной плоскости, а другие распределялись произвольным образом между полюсами (рис. 3.12 а,б,д,е). Эти хромосомы имели плотные точечные сигналы гибридизации центромерного зонда (рис. 3.13 а), а также одиночные точечные сигналы CENH3, от которых отходили пучки МТ, ориентированные только к одному из полюсов (рис. 3.12 д,е). Хромосомы, выстроившиеся в эквационной плоскости, имели сайты гибридизации зонда pAet6-09 в виде натянутых диффузных бэндов, расположенных поперек хромосомы (рис. 3.13 а). Данные хромосомы имели по 2 точечных сигнала CENH3, соответствующих разделенным сестринским кинетохорам, от которых отходили МТ к противоположным полюсам (рис. 3.12 д,е). По мере прохождения деления, в поздней МI/ранней АI растянутые диффузные сайты гибридизации pAet6-09 превращались в два независимых точечных сигнала, обозначая разделившиеся сестринские центромеры (рис. 3.13 б,в). В АI расхождение сестринских хроматид от экватора к полюсам происходило асинхронно. Особенно хорошо это можно было заметить на препаратах FISH с центромеро-специфичным зондом pAet6-09 (рис. 3.13 б). В ранней АI мы наблюдали группы хромосом с одиночными сигналами pAet6-09 на полюсах и хромосомы в эквационной плоскости, находящиеся на разных стадиях разделения сестринских хроматид: сигнал гибридизации от растянутого диффузного - на неразделенных, до плотного точечного - на разделенных сестринских хроматидах (рис. 3.13 б). Разделение плечей хромосом также было асинхронным, но не зависело от того, располагаются ли хромосомы на экваторе или нет. Сигнал иммунолокализации антител к pH3Ser10, как и в норме, распространялся на всю длину хромосом к МI (рис 3.12 а,б) и постепенно исчезал в АI, начиная с плечей. Между расположенными на экваторе хромосомами, и произвольно распределенными

между полюсами мы не наблюдали существенных отличий в установлении или исчезновении сигналов pH3Ser10 в первом делении (рис 3.12 б).

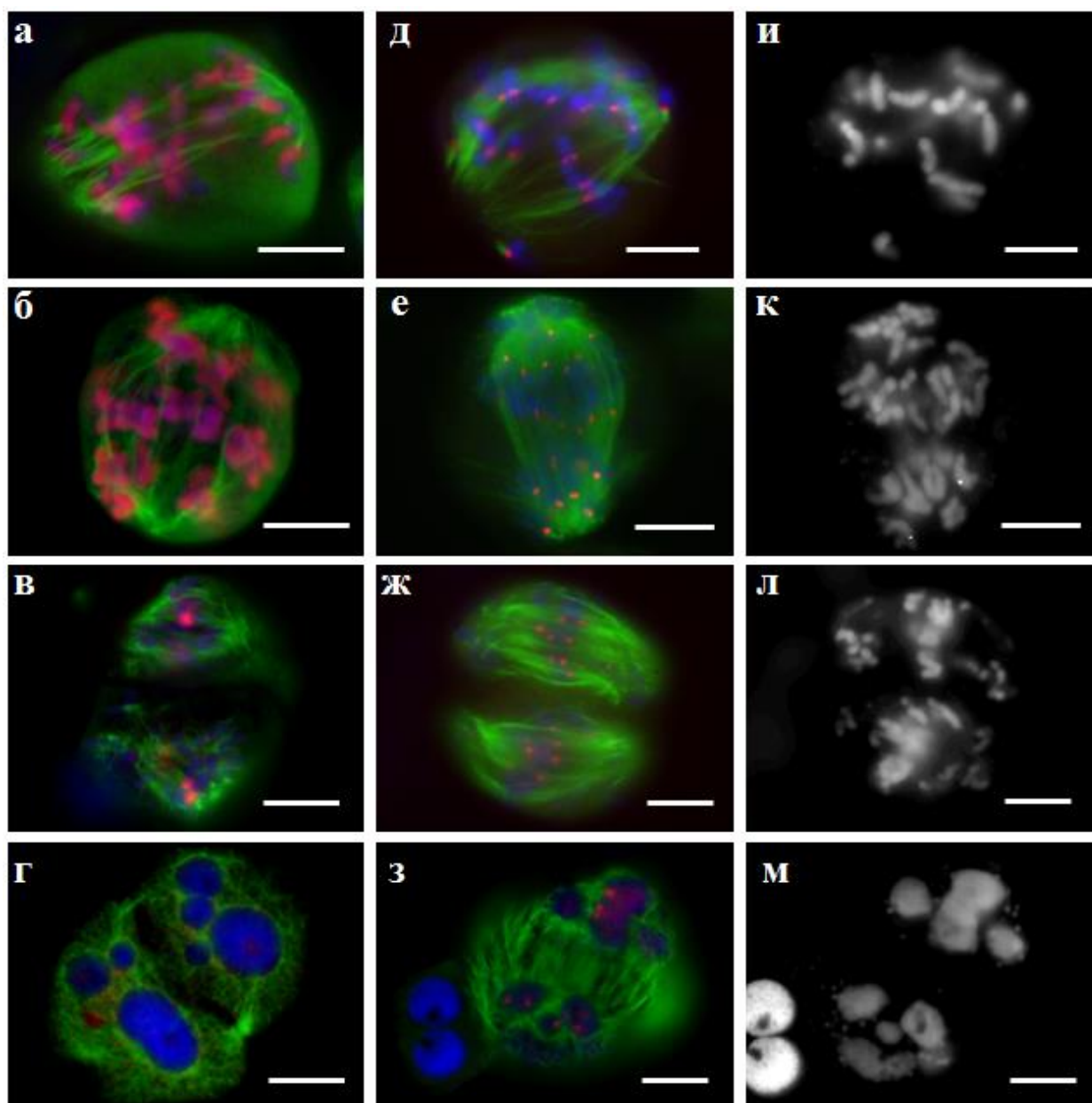


Рисунок 3.12. Формирование аппарата деления и поведение хромосом в мейоцитах с редукционно+эквационным типом деления: иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и pH3Ser10 (красный) (а-г): а) метафаза I, б) ранняя анафаза I, в) метафаза II, г) полиада; иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и CENH3 (красный) (д-м): д,и) метафаза I, е,к) анафаза I, ж,л) анафаза II, з,м) телофаза II, (и-м) то же, что и д-з, DAPI-канал. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

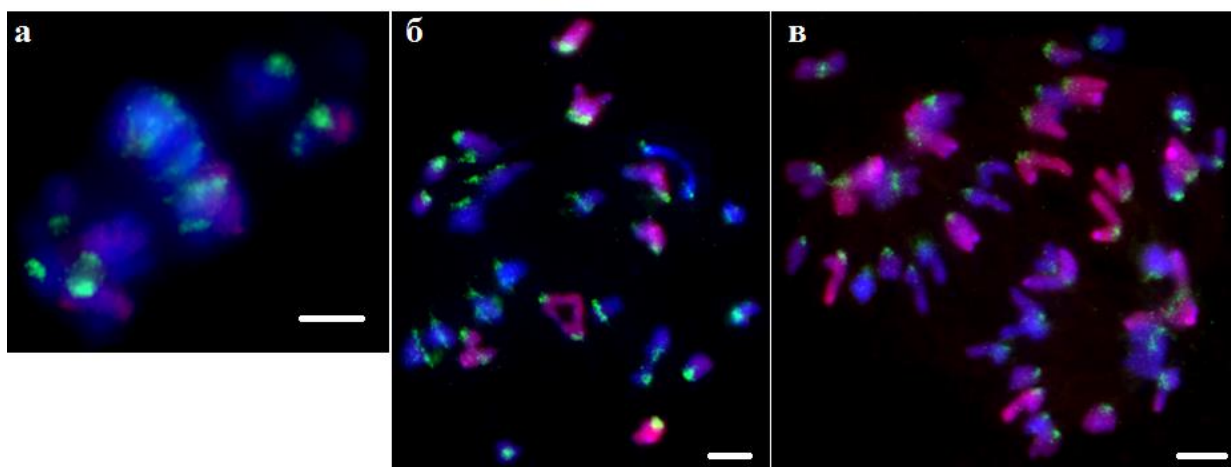


Рисунок 3.13. Организация центромерной области хромосом в мейоцитах с редукционно+эквационным типом деления: FISH с зондами pAet6-09 (зеленый), ДНК ржи (красный), а) метафаза I, часть хромосом расположенных в эквационной плоскости имеют растянутые диффузные сайты гибридизации, остальные - плотные точечные сайты гибридизации; б,в) анафаза I, хромосомы в эквационной плоскости делятся на хроматиды, остальные – случайным образом распределяются. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

Во втором делении все хромосомы выстраивались в эквационной плоскости в МП (рис. 3.12 в). Компактизация хромосом была аналогична компактизации в нормальном втором делении (рис. 3.12 л). В АП хромосомы, не разделившиеся в первом делении, расходились к противоположным полюсам, в то время как одиночные хроматиды задерживались в эквационной плоскости (рис. 3.12 ж,л) и в конце ТП неравномерно распределялись между полюсами с образованием микроядер (рис. 3.12 г,з,м). Сигнал CENH3 наблюдался в области центромеры на всех хроматидах, начиная с ПШ и до ТП. Расположенные на экваторе хромосомы имели по 2 сигнала CENH3, соответствующих разделенным сестринским кинетохорам (рис. 3.12 ж). Сигнал pH3Ser10 локализовался только на хромосомах, не разделившихся в АI, на одиночных хроматидах сигнал отсутствовал.

Формирование веретена деления в большинстве случаев было близко к норме. Нуклеация МТ в области кинетохоров происходила после разрушения ЯО, а последующий их рост и объединение в пучки образовывали полюса биполярного веретена, в таких мейоцитах всегда образовывалось центральное веретено деления (рис. 3.12 а,б,д,е).

Сопоставление некоторых характерных особенностей редукционно+эквационного деления с нормальным мейотическим и митотическим делением

(табл. 3.3) позволило сделать предположение, что формирование аппарата деления в мейоцитах «редукционно+эквационного типа» происходило по мейотическому пути, хотя и имело аномалии.

Таблица 3.3. Основные характеристики мейотического деления пшенично-ржаных амфигаплоидов с редукционно+эквационным типом деления.

Характеристика деления	митотическое	мейотическое
Организация ДНК в области центромеры в метафазе	+	+
Ориентация кинетохоров	+	+
Компактизация хромосом	–	+
Когезия сестринских хроматид	–	+
Деление	–	+

3.2.4. Формирование аппарата деления в мейозе амфигаплоидов с эквационным типом деления

Эквационный тип деления, наиболее часто встречался у растений 1Rv(1A)xR и 6R(6A)xR. На стадии МI все хромосомы (за редким исключением 2-3 хромосом) выстраивались в эквационной плоскости, не образуя биваленты (рис. 3.14 д, 3.15 а,б). Каждая хромосома имела двойные сигналы CENH3, от которых отходили кинетохорные пучки МТ к противоположным полюсам (рис. 3.15 а,б). Сигнал гибридизации центромеро-специфичного зонда pAet6-09 в МI имел растянутую диффузную структуру и располагался поперек хромосомы, также как в митозе или МII в норме (3.16 а,б). Компактизация расположенных на экваторе хромосом была аналогична компактизации в нормальном первом делении мейоза (рис. 3.15 д). Кроме того, как и в норме, сигнал pH3Ser10 наблюдался по всей длине хромосом в МI (рис. 3.15 д), постепенно исчезал в AI, начиная с плечей, сохранялся только в области центромер к началу, и полностью исчезал к концу ТI (рис. 3.15 ж,з).

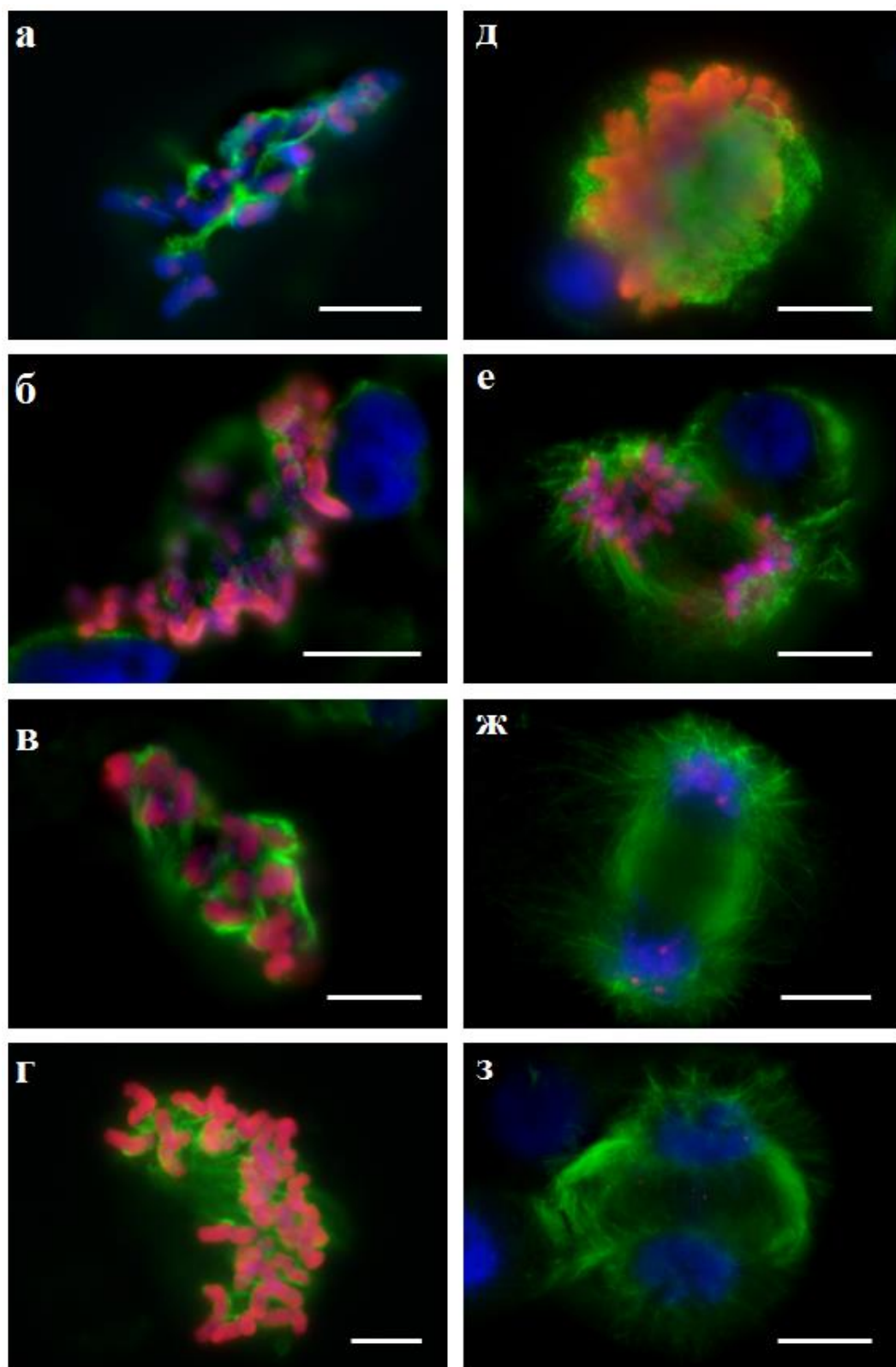


Рисунок 3.14. Поведение хромосом в мейоцитах с эквационным типом деления: иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и pH3Ser10 (красный): а-г) прометафаза I, д) метафаза I, е) анафаза I, ж) телофаза I, з) диада. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

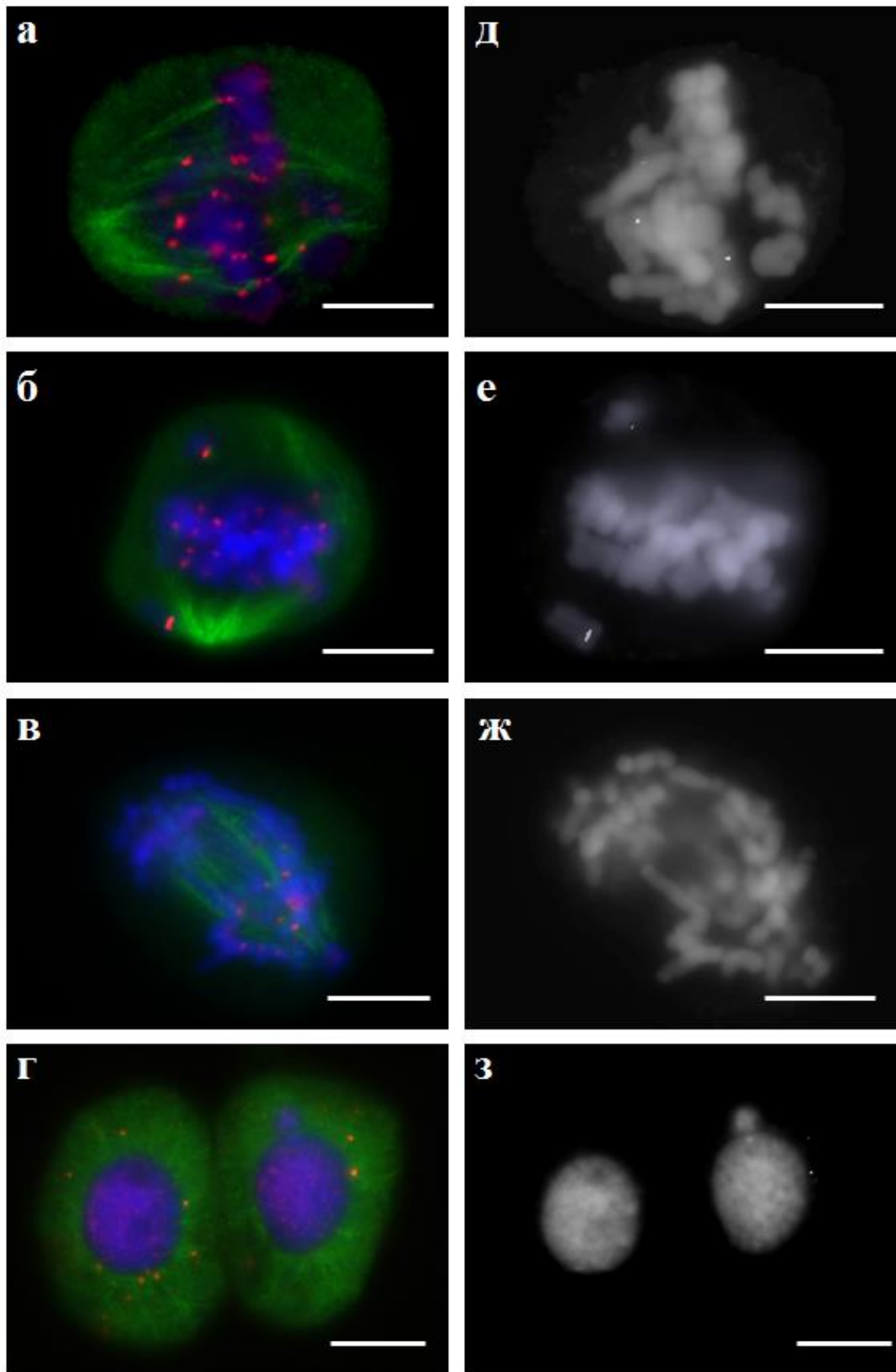


Рисунок 3.15. Архитектура кинетохора в мейозе амфигаплоидов с эквационным типом деления: иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и CENH3 (красный): а) метафаза I, б) ранняя анафаза I, в) анафаза I, г) диада, д-з) то же, что и а-г, DAPI-канал. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

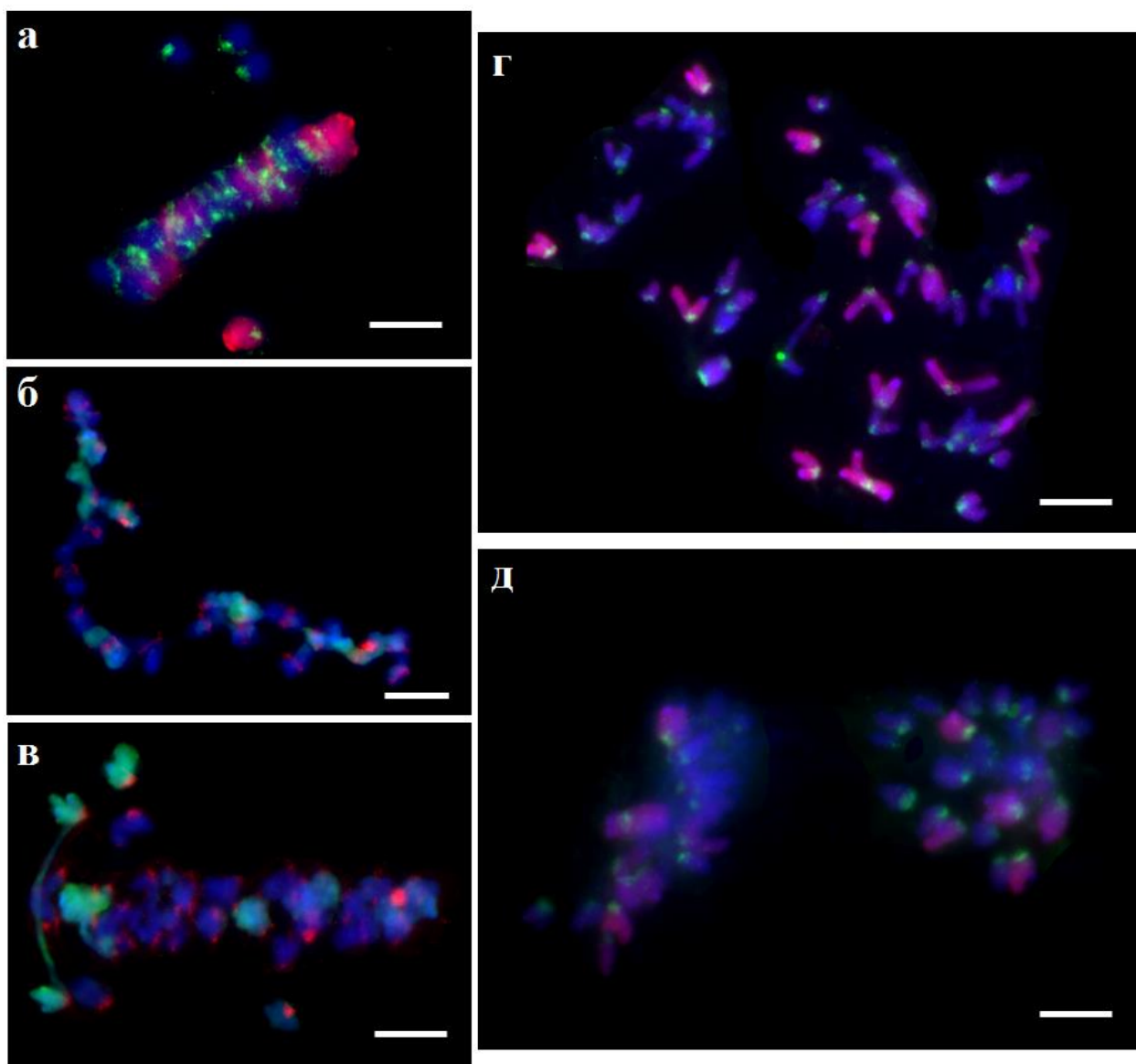


Рисунок 3.16. Структура центромерной области хромосом в МI у пшенично-ржаных амфигаплоидов в мейоцитах с эквационным типом деления: FISH с зондами рAet6-09 (зеленый), ДНК ржи (красный) (а,г,д) и с зондами рAet6-09 (красный), ДНК ржи (зеленый) (б,в): а,б) метафаза I, в) начало анафазы I, г) средняя анафаза I д) поздняя анафаза I. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

В некоторых случаях в ранней АI мы наблюдали начало расхождения к противоположным полюсам, предположительно, ржаных гомологов (рис. 3.15 б,е). Данные хромосомы имели сдвоенный сигнал CENH3, соответствующий объединенным сестринским кинетохорам (рис. 3.15 б). После разделения в АI (рис. 3.14 е, 3.15 в,ж) сестринские хроматиды отходили к разным полюсам с образованием диад и выходом из мейоза (рис. 3.14 з, 3.15 г,з). Поскольку на препаратах, полученных при окрашивании ацетокармином, среди тетрад наблюдались диады (рис. 3.1 и), можно предположить, что после эквационного

типа деления происходило блокирование второго деления мейоза. Доказательством блокирования второго деления являлось также отсутствие сигналов гибридизации pH3Ser10 в мейоцитах на стадии ТI, находящихся среди клеток во втором делении мейоза (рис. 3.17 е), и автономность мейоцитов на этой стадии.

В мейоцитах с эквационно расходящимися хромосомами всегда формировалось нормально функционирующее биполярное веретено деления. Нуклеация МТ начиналась возле хромосом уже находящихся в области экватора. Затем происходил рост МТ от кинетохоров, сформированные пучки МТ конвергировали минус-концами и образовывалось биполярное веретено (рис. 3.14 в,г). В таких мейоцитах хромосомы не подвергались реориентации с монополярной на биполярную. Иногда нами были обнаружены биполярно-ориентированные веретена с неконвергентными полюсами (рис. 3.14 д), что является отличительной характеристикой митотического веретена.

Основные характеристики эквационного типа деления соответствовали митотическим, за исключением компактизации хромосом и распространения сигнала pH3Ser10 на всю длину хромосом (табл. 3.4). Из чего было сделано предположение, что формирование аппарата деления в мейоцитах «эквационного типа» происходило по митотическому пути с некоторыми исключениями, касающимися организации хромосом.

Таблица 3.4. Основные характеристики мейотического деления пшенично-ржаных амфигаплоидов с эквационным типом деления.

Характеристика деления	митотическое	мейотическое
Организация ДНК в области центромеры в метафазе	+	–
Ориентация кинетохоров	+	–
Компактизация хромосом	–	+
Когезия сестринских хроматид	–	+
Деление	+, нет второго деления	–

3.2.5. Формирование аппарата деления в мейозе амфигаплоидов с блокированием первого деления мейоза

Наибольшее число мейоцитов с монополярным веретеном мы наблюдали у частично фертильных гибридов 5R(5D)xR, и в меньшем количестве у гибридов 1Rv(1A)xR, 5R(5A)xR, 6R(6A)xR, однако у растений 2R(2D)₁xR образование таких веретен не происходило. Образование фигуры круга с плотно расположенными хромосомами и нуклеация МТ возле хромосом идентифицировалась как прометафаза I (рис. 3.17 а). Позднее шло интенсивное образование кинетохорных пучков МТ, направленных хаотично (рис. 3.17 б). Затем образовывалась конструкция из ползущих вверх хромосом – «шляпа», в которой пучки МТ были ориентированы в одну сторону (рис. 3.17 в,г). Кинетохорные пучки МТ фокусировались с образованием монополярного веретена. Хромосомы имели одиночные сигналы CENH3 (рис. 3.18 а,б) и плотные точечные сигналы гибридизации центромерного зонда pAet6-09 (рис. 3.19). Более поздние стадии сопровождалась разрушением МТ веретена, разделением сестринских кинетохоров (рис. 3.17 д), и отсутствием образования фрагмопласта. В конце первого деления происходила дезорганизация монополярного веретена (МТ) и декомпактизация хромосом, приводящая к формированию одного нередуцированного ядра.

Начало второго деления сопровождалось *de novo* компактизацией хромосом, фосфорилирование гистона H3Ser10 происходило в прицентромерной области, что детектировалось наличием сдвоенных точечных сигналов иммунолокализации на центромерах сестринских хроматид (рис. 3.17 е). В ПII в области хромосом происходила сборка МТ (рис. 3.17 ж), которые затем удлинялись, сближались с образованием биполярного конвергентного веретена деления (рис. 3.17 з,и). В МII все хромосомы выстраивались в экваториальной плоскости (рис. 3.17 к, 3.18 в) и имели компактизацию, соответствующую нормальному второму делению мейоза (рис. 3.18 ж). В области центромеры расположенных на экваторе хромосом мы наблюдали по два сигнала CENH3, обращенных к противоположным полюсам (рис. 3.18 в). Данные хромосомы также характеризовались центромерной локализацией сигнала pH3Ser10 (рис. 3.17 к). После разделения сестринских хроматид в АII (рис. 3.17 л), деление завершалось образованием диад (рис. 3.17 м).

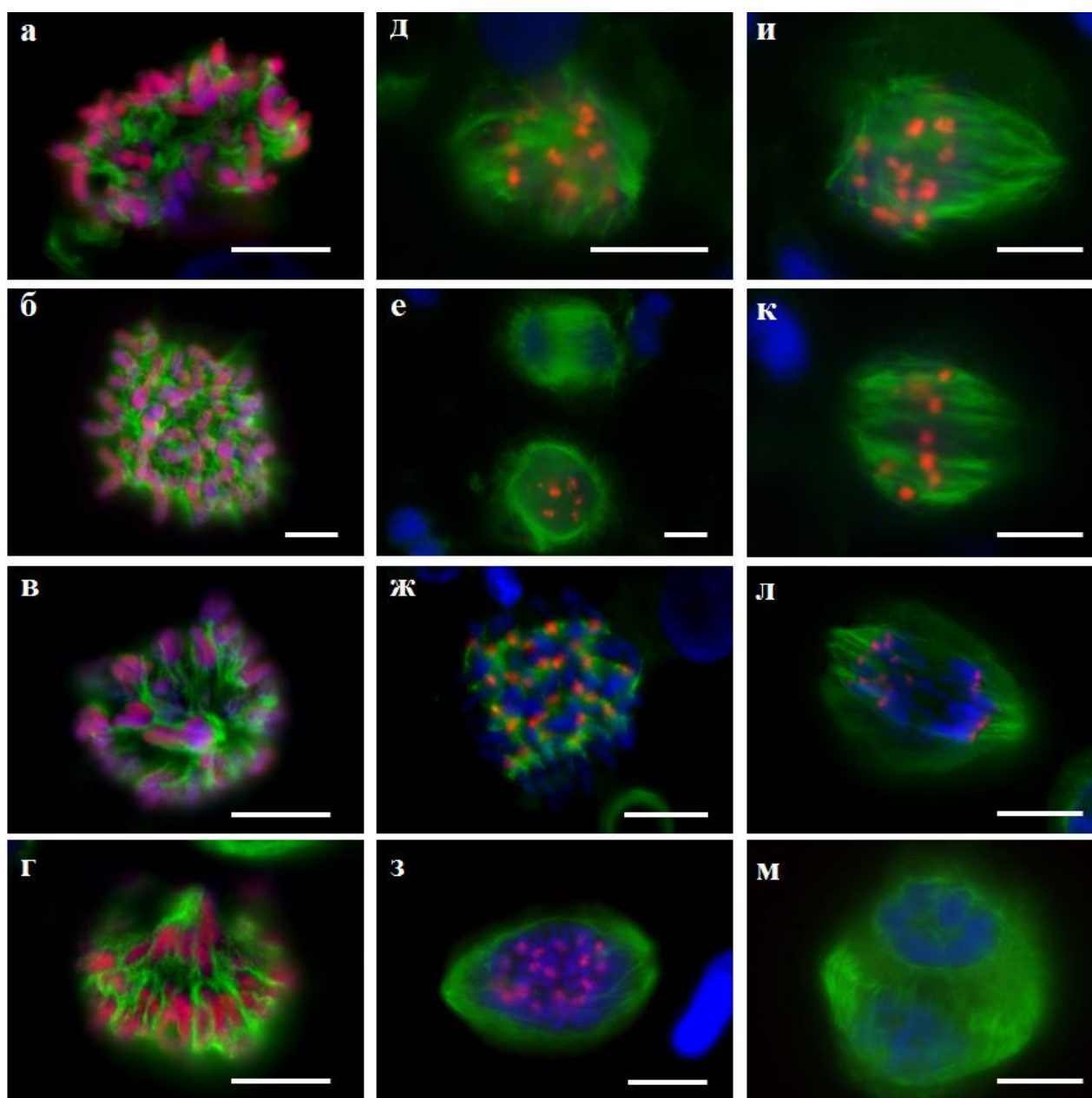


Рисунок 3.17. Поведение хромосом в мейоцитах с блокированием первого деления у пшенично-ржаных амфигаплоидов: иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и pH3Ser10 (красный), а,б) профаза I, в) метафаза I (вид снизу), г) метафаза I (вид сверху), д) телофаза I, е-з) профаза II, и) прометафаза II, к) метафаза II, л) анафаза II, м) телофаза II. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

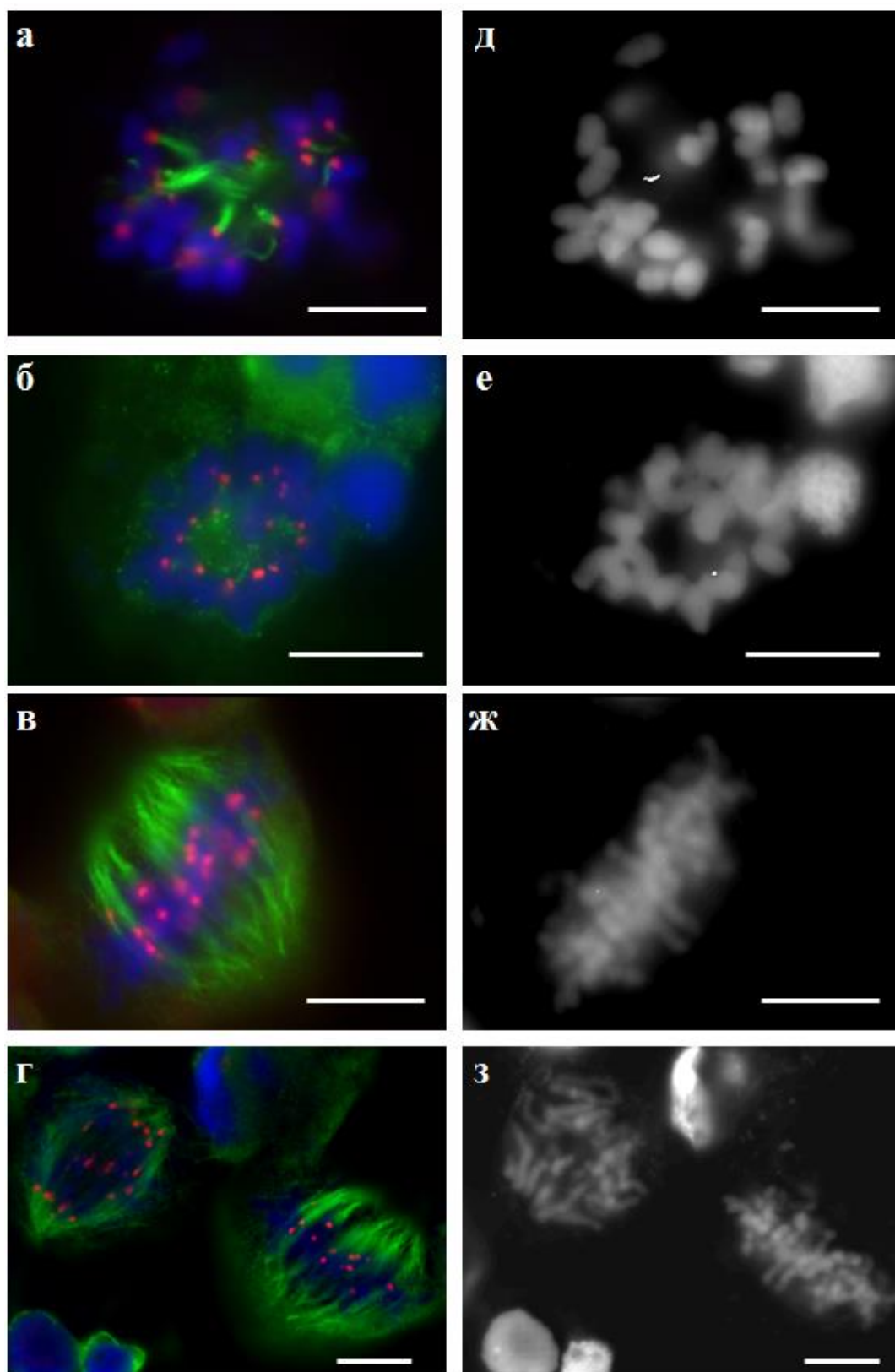


Рисунок 3.18. Архитектура кинетохора в мейоцитах с блокированием первого деления мейоза: иммуноокрашивание с антителами к α -тубулину (зеленый) и CENH3 (красный): а) профаза I, б) прометафаза I, в) метафаза II, г) ранняя и средняя анафаза II, д-з) то же, что и а-г, DAPI-канал. Хромосомы окрашены DAPI (синий), масштабный отрезок – 10 мкм.

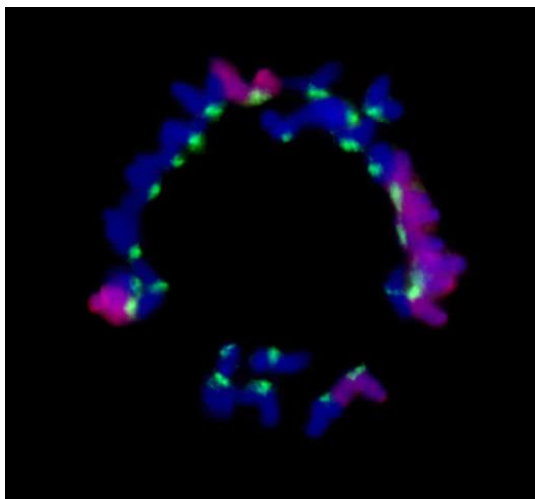


Рисунок 3.19. Организация центромерной области в МI в мейоцитах пшенично-ржаных амфигаплоидов с блокированием первого деления мейоза: FISH с зондами рAet6-09 (зеленый), ДНК ржи (красный). Хромосомы окрашены DAPI (синий).

Несмотря на то, что компактизация хромосом и организация кинетохора в МI соответствовали мейотическим, формирование аппарата деления в мейоцитах «с блокированием первого деления» являлось уникальным и отличалось и от митоза, и от мейоза, поскольку в первом делении отсутствовало расхождение хромосом и формировалось монополярное веретено (табл. 3.5).

Таблица 3.5. Основные характеристики первого мейотического деления пшенично-ржаных амфигаплоидов с блокированием первого деления.

Характеристика деления	митотическое	мейотическое
Организация ДНК в области центромеры в метафазе	–	+
Ориентация кинетохоров	–	+
Компактизация хромосом	–	+
Когезия сестринских хроматид	–	+
Деление	блок первого деления	

3.3. Анализ фертильности пшенично-ржаных гибридов F₁ и F₂

Среди пшенично-ржаных гибридов первого поколения, полученных с участием замещенных линий и сорта пшеницы Саратовская 29, было получено по 2 фертильных растения F₁ C29xR и 1Rv(1A)xR, одно - 5R(5D)xR и 4 - 6R(6A)xR. Данные растения различались между собой по числу завязавшихся зерен и их всхожести, а также по фертильности их потомства - растений F₂ (табл. 3.6, 3.7).

Таблица 3.6. 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

Растения 45-8 и 45-12 гибридов C29xR завязали 8 и 1 зерно, соответственно. Четыре частично самофертильных гибрида 6R(6A)xR значительно отличались по числу завязавшихся зерен – от 1 до 13 (табл. 3.6). Шесть и пять зерен завязались на гибридах 4-7, 4-3 1Rv(1A)xR и два у гибрида 95-26 5R(5D)xR.

У растений №45-12 (C29xR), и №9-5 (6R(6A)xR) было получено продуктивное потомство F₂, при самоопылении которых завязалось 79 и 139 зерен, соответственно. При самоопылении растения №95-26 (5R(5D)xR) завязалось 2 зерна, из которых были получены фертильные растения №69-1 и №69-2, на которых завязалось 70 и 26 зерен, соответственно. У растений №4-7 и №4-3 (1Rv(1A)xR) завязалось примерно одинаковое число зерен (6 и 5), однако они различались по всхожести и фертильности потомков F₂. Потомки от самоопыления

растений №4-3 все были жизнеспособны и фертильны, в то время как из 6 зерен, полученных при самоопылении растения №4-7, взошло только 2 растения.

Таблица 3.7. Количество и масса зерен, завязавшихся у пшенично-ржаных гибридов F₂.

Гибридная комбинация/номер растения F ₁	№ растения F ₂	Количество зерен с растения	Масса 1000 зерен (гр)
C29xR/45-8	3-1	8	38.75
	3-2	3	43.33
	3-3	2	25
	3-4	21	56.19
	3-5	0	0
C29xR/45-12	4-1	79	30.76
5R(5D)xR/95-26	69-1	70	30.91
	69-2	26	30.00
1Rv(1A)xR/4-7	6-1	6	21.67
	6-2	20	26.5
1Rv(1A)xR/4-3	7-1	5	26
	7-2	9	18.89
	7-3	126	23.17
	7-4	320	26.38
	7-5	67	18.36
6R(6A)xR/9-2	8-1	6	30
	8-2	8	30
	8-3	13	37.69
	8-4	0	0
	8-5	0	0
6R(6A)xR/9-1	9-1	0	0
	9-2	10	39
	9-3	7	34.29
	9-4	18	35.56
	9-5	0	0
6R(6A)xR/9-5	10-1	139	52.3
6R(6A)xR/9-9	11-1	0	0
	11-2	0	0
	11-3	5	26
	11-4	11	38.18
	11-5	9	42.22

Растения №45-8 (C29xR), №9-2, №9-1 и №9-9 (6R(6A)xR) отличались более высокой фертильностью, относительно других растений F₁ (8-12 зерен, по сравнению с 1-6), однако характеризовались вариабельностью по всхожести зерен

(5 из 8, 5 из 12, 5 из 13 и 5 из 9, соответственно) и фертильности потомков от самоопыления (от 0 до 21). При самоопылении растений $2R(2D)_1 \times R$ семена не образовывались, т.е. данные пшенично-ржаные амфигаплоиды были стерильны.

Потомки F_2 от самоопыления пшенично-ржаных амфигаплоидов отличались по числу образованных зерен: от полного отсутствия (стерильности) до 320 зерен с одного растения (табл. 3.7). Для F_2 растений $C29 \times R$ наблюдалось образование 72 зерен у потомков растения №45-12 и от 0 до 21 у потомков растения №45-8. Максимальная вариабельность по числу образованных зерен наблюдалась у потомков растения №4-3 $1Rv(1A) \times R$ и составляла от 5 до 320 зерен с растения. Наибольшее число зерен было получено у растений F_2 №7-3, №7-4 ($1Rv(1A) \times R$) и №10-1 ($6R(6A) \times R$) равное 126, 320 и 139, что во много раз превышало показанное для родительских растений число завязавшихся зерен (табл. 3.6, 3.7).

Масса 1000 зерен варьировала как между потомками разных гибридов - от 18.36 гр у растения №7-5, до 56.19 гр у растения №3-4, так и между потомками одного растения – от 25 гр до 65.19 гр у потомков F_2 амфигаплоида $C29 \times R$. Гибридная комбинация $1Rv(1A) \times R$ приводила к образованию мелких зерен овально-удлиненной формы с темно-красной окраской перикарпия, в то время как комбинация $6R(6A) \times R$ характеризовалась образованием зерен средней величины с красной окраской перикарпия у всех растений, кроме №11-3 (красные, мелкие) и растения №10-1 (белые, крупные). У потомков F_2 от самоопыления растения $5R(5D) \times R$ зерна были средней величины, имели овально-удлиненную форму и красную или темно-красную окраску перикарпия. Скрещивание пшеницы сорта Саратовская 29 с рожью приводило к наибольшей вариабельности по размеру зерен от мелких у растения №3-3 до крупных у №3-4 (табл. 3.7).

Таблица 3.8. Масса 1000 зерен у исходных родительских линий пшеницы

Растение	Масса 1000 зерен (гр)
C29	37.5
5R(5D)	28.4
1Rv(1A)	32.8
6R(6A)	40.7



Рисунок 3.20. Различия формы и окраски зерен, завязавшиеся у родительских форм (а-в) и у растений F_2 поколения от самоопыления пшенично-ржаных гибридов C29xR, 1Rv(1A)xR, 6R(6A)xR (г-е): а) C29 б) 1Rv(1A) в) 6R(6A), г) №4-1, д) №7-4, е) №10-1.

Таким образом, мы наблюдали широкую вариабельность по способности образовывать семена, и, соответственно, фертильности амфидиплоидных потомков F_2 относительно родительских форм, а также вариабельность агрономических характеристик зерна, что может быть связано с реорганизацией генома при полиплоидизации. Стоит отметить, что реорганизация, по-видимому, зависела от генотипа растений, и проходила сходным образом у растений одной гибридной комбинации, что выражалось в схожести фенотипа зерен у потомков одного растения.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Генетическая регуляция реституции у пшенично-ржаных гибридов

У пшеницы определено и картировано незначительное количество мейотических генов. Большинство известных генов, функционирующих в мейозе, локализовано у диплоидных растений риса, кукурузы, арабидопсиса [Consiglio et al., 2004; Jenkins et al., 2008; Nannas, Dawe, 2015] и ржи [Соснихина, Михайлова, 2005], для которых получены моногенные мейотические мутанты. Кроме того, полиплоидный статус пшеницы, осложняет проведение оценки экспрессии генов [Fu et al., 2016]. Использование линий с замещением хромосом пшеницы на чужеродные гомеологичные может позволить сузить поиск генов, участвующих в генетической регуляции реституции у гибридов, до определенных хромосом [Ху, Жорра, 1995, 2000; Силкова и др., 2009; Silkova et al., 2011]. Например, скрещивание тетраплоидной пшеницы сорта Langdon (LDN) с замещением 5D(5B) с рожью *S. cereale* L. сорта Gazelle и эгилопсом *Ae. tauschii* Coss. линии RL41750 приводило к увеличению спаривания гомеологичных хромосом и подавлению реституции [Ху, Жорра, 2000]. На длинном плече 5B хромосомы расположен локус *Ph1*, инактивация/отсутствие которого не компенсируется наличием 5A и 5D хромосом [Riley et al., 1966; Sears, 1972; Chen et al., 1994], что может объяснить такой эффект. На настоящий момент показано, что реализация реституции через блокирование первого деления (FDR с образованием реституционного ядра в MI) у гибридов тетраплоидной пшеницы LDN может определяться генами, расположенными на 4A хромосоме, поскольку замещение данной хромосомы на 4D приводило к подавлению FDR-реституции и стерильности гибридов при скрещивании линии как с эгилопсом, так и с рожью [Ху, Жорра, 2000]. С другой стороны, для гибридов *T. turgidum* L. линий AS313 и AS2255 с *Ae. tauschii* Coss. образца AS60 было показано наличие QTL, ассоциированных с реституцией, на 3B (сильный) и 2A (слабый) хромосомах [Hao et al., 2014].

В данной работе использовались различные замещения хромосом для исследования регуляции реституции у пшенично-ржаных гибридов. Амфигаплоиды с замещением 2R/2D характеризовались преимущественно редуционным расхождением хромосом и образованием тетрад в конце ТП. Следовательно, можно предположить, что отсутствие хромосомы 2D в геноме пшенично-ржаных амфигаплоидов приводит к подавлению реституции, а также, что данная хромосома несет ген или гены, участвующие в ее регуляции. Однако нужно учитывать не только отсутствие хромосомы 2D, но и наличие двух ржаных хромосом 2R (одна от замещенной линии, а другая из генома ржи), каждая из которых может нести разные аллели предполагаемого гена (поскольку рожь - перекрестник). Так, для гибридов 2R(2D)₃xR было показано лишь незначительное увеличение числа мейоцитов с редуционным типом деления, относительно контрольных растений C29xR [Silkova et al., 2011], что говорит о вкладе в регуляцию реституции также генов, расположенных на 2R хромосоме. Кроме того, в регуляции реституции могут участвовать и гены, находящиеся на 2A и/или 2B хромосомах. Например, у гибридов дисомно-замещенной тетраплоидной пшеницы *T. turgidum* L. с рожью *S. cereale* L. сорта Gazelle и эгилопсом *Ae. tauschii* Coss. образца RL4175 отсутствие реституции и формирование тетрад в ТП по-разному проявлялось при замещениях 2D/2A и 2D/2B, а также отличалось по данным характеристикам от контрольных растений [Xu, Jorra, 2000]. Максимальный эффект подавления реституции (высокий процент тетрад - 94.5%, низкий диад - 3%) проявлялся у гибридов с рожью, в генотипе которых хромосома 2A была замещена на 2D, а замещение 2D/2B имело более слабый эффект (71% и 20%), в то время как скрещивание LDNxGazelle (контроль) не приводило к подавлению реституции и стерильности (41% и 53% диад). Из чего можно сделать вывод, что 2A, 2B и 2D вносят различный по силе вклад в регуляцию реституции (подавление реституции: 2D > 2B > 2A). Данное предположение верно также и для гибридов с *Ae. tauschii* Coss.: комбинация 2D(2A)xRL41750 приводила к увеличению числа тетрад и снижению числа диад (72% и 16.5%, соответственно), комбинация 2D(2B)xRL41750 имела более слабый эффект (52.5% и 32.5%), в то время как скрещивание LDNxRL41750 способствовало реституции (только 16.5% тетрад и 56.6% диад). Из чего также следует, что генотип ржи сорта Gazelle при

скрещивании с пшеницей LDN индуцировал подавление реституции в большей степени, чем генотип образца RL4175 *Ae. tauschii* Coss. В случае пшенично-ржаных гибридов 2R(2D)₁xR отсутствие 2D и наличие 2R хромосом приводит к подавлению реституции и увеличению редукционного типа деления (более 80%). Таким образом, хромосомы 2-ой гомеологической группы несут ген или гены, участвующие в регуляции реституции у гибридов пшеницы. Поскольку в мейоцитах с редукционным типом деления у гибридов 2R(2D)₁xR наблюдается только монополярная ориентация кинетохоров, можно предположить, что гены, расположенные на хромосомах 2-ой гомеологической группы участвуют в определении мейотической архитектуры кинетохора.

В отличие от замещения 2R/2D, замещения 1Rv/1A и 6R/6A характеризуются значительно меньшим числом мейоцитов с редукционным типом деления хромосом в MI (менее 50%, по сравнению с 83.5% у 2R(2D)₁xR) и увеличением мейоцитов с эквационным типом деления (более 30% по сравнению с 4.2% у 2R(2D)₁xR), а также частичной фертильностью. Следовательно, замещение хромосом 1A и 6A на гомеологические им ржаные хромосомы способно приводить к увеличению эквационного расхождения хромосом у амфигаплоидов. Таким образом, можно предположить, что хромосомы 1-ой и 6-ой гомеологических групп несут гены, способные влиять на реституцию. Ранее в нашей лаборатории было установлено, что при гибридизации дисомно-замещенных линий пшеницы 1Rv(1A), 1Ron(1A) с рожью, только замещение 1Rv/1A приводило к достоверному увеличению эквационного разделения хромосом [Silkova et al., 2011], что говорит о преимущественном вкладе генов 1R хромосомы сорта Вятка в определение эквационного разделения хромосом в AI. Анализ пшенично-чужеродных гибридов тетраплоидной пшеницы сорта LDN с замещением хромосом 1-ой гомеологической группы показал наличие зависимости поведения хромосом в мейозе от генотипа растения, с которым было проведено скрещивание [Xu, Jorra, 2000]. Гибридизация дисомно-замещенной пшеницы 1D(1A)LDN с образцом RL41750 *Ae. tauschii* Coss. приводила к значительному увеличению эквационного разделения хромосом (но не эквационному типу деления) в AI, что не наблюдалось при скрещивании 1D(1A)LDN с рожью *S. cereale* L. сорта Gazelle [Xu, Jorra, 2000]. Схожая закономерность прослеживалась и для LDN с замещением 1D/1B – отсутствие

достоверных изменений при скрещивании с рожью, и увеличение эквационно-делящихся хромосом в AI у 1D(1B)LDN \times RL41750 (но эффект был менее выражен, чем при 1D/1A замещении) [Xu, Jorra, 2000].

В отличие от амфигаплоидов 6R(6A) \times R, скрещивание тетраплоидных растений пшеницы LDN с замещениями 6D/6A и 6D/6B с рожью сорта Gazelle не приводило к увеличению эквационно-делящихся хромосом, но у гибридов 6D(6A)LDN \times RL41750 и 6D(6B)LDN \times RL41750 появлялись мейоциты с эквационным расхождением большинства хромосом в первом делении [Xu, Jorra, 2000]. Исходя из этих данных и установленного нами факта, что эквационное разделение хромосом в AI у амфигаплоидов происходит при биполярной ориентации кинетохоров, можно предположить, что на хромосомах 1-ой и 6-ой гомеологичных групп локализуются гены, контролирующие формирование митотической архитектуры кинетохора. Однако их действие в значительной степени зависит от генотипа растения.

Блокирование как первого, так и второго деления с образованием монад показано для гибридов тетраплоидной пшеницы с замещениями 3D/3A и 6D/6A с рожью *S. cereale* L. [Xu, Jorra, 2000]. Поскольку использование пшеницы с данными замещениями при скрещивании с эгилопсом не приводило к образованию монад, авторы сделали вывод о преимущественном влиянии ржаного генотипа. Следовательно, хромосома 6R может нести гены, определяющие блокирование мейотического деления, что может обеспечивать формирование диад в микроспорогенезе и фертильность пшенично-ржаных амфигаплоидов 6R(6A) \times R.

Наши данные, в совокупности с данными других авторов [Xu, Jorra, 2000; Нао et al., 2014], позволяют предположить, что реституция у амфигаплоидов контролируется не одним, а несколькими генами, локализованными на различных хромосомах, однако их активность сильно зависит от генотипа гибридов. У амфигаплоидов, полученных гибридизацией дисомно-замещенных линий пшеницы с рожью сорта Онохойская, хромосомы 1-ой, 2-ой и 6-ой групп несут гены, участвующие в регуляции реституции. Хромосомы 1-ой и 6-ой гомеологичных групп индуцируют механизмы реституции (формирование митотической архитектуры кинетохора и блокирование второго деления), в то время как хромосомы 2-ой гомеологичной группы подавляют реституцию, индуцируя

мейотическое деление (формирование мейотической архитектуры кинетохора и прохождение нормального второго деления). Для других гибридных комбинаций, наиболее активные гены, участвующие в реституции, могут быть локализованы на других хромосомах, как, например, 3В у гибридов AS313x AS60 и AS2255x AS60 [Hao et al., 2014], или 4А - у гибридов LDNxRL41750 и LDNxGazelle [Xu, Joppa, 2000].

4.2. Монополярное веретено и эквационное деление могут быть причиной реституции у пшенично-ржаных амфигаплоидов

Мейоз растений характеризуется наличием 2 последовательных делений, приводящих к образованию 4 гаплоидных ядер: в первом делении происходит сегрегация гомологичных хромосом, а во втором - расхождение сестринских хроматид. В первом случае важную роль играет формирование синаптонемного комплекса, обеспечивающего связь между гомологичными хромосомами и образование хиазм, удерживающих гомологи вместе до AI, а во втором – установление комплекса белков-когезинов, удерживающих вместе сестринские хроматиды и связывание с ним белкового комплекса SGO1-PP2A (шугошин-фосфатаза 2А), который не позволяет сестринским центромерам разделяться до АII [Nasmyth, Haering, 2009; Marston, 2015]. В мейозе амфигаплоидных гибридов пшеницы нет гомологов, что приводит к практически полному отсутствию бивалентов и неспособности протекания нормального мейотического деления. У гибридов тетра- и гексаплоидной пшеницы существует система контроля локуса *Ph1*, способствующего преимущественному спариванию и рекомбинации гомологичных хромосом [Sears, 1976; Griffiths et al., 2006; Martin et al., 2014]. При этом, даже одной копии локуса *Ph1* (наличие одной хромосомы 5В) достаточно, для его нормального функционирования как у дигаплоидной (AB, $2n = 2x = 14$) [Jauhar et al., 2000] и полигаплоидной пшеницы (ABD, $2n = 3x = 21$) [Jauhar, 2007], так и у межвидовых гибридов пшеницы (ABDX, $2n = 4x = 28$) [Dhaliwal, Johnson, 1982].

Восстановление фертильности гибридных растений происходит в результате мейотической реституции. Существует множество работ, направленных на

изучение мейотической реституции у растений [Bretagnolle, Thompson, 1995; Ramanna, Jacobsen, 2003; Cai, Xu, 2007]. При этом сложилось четкое представление о существовании нескольких основных механизмов, приводящих к образованию нередуцированных гамет (преимущественно для двудольных): реституция первого деления (FDR), реституция второго деления (SDR) и неопределенная реституция (IMR) [Bretagnolle, Thompson, 1995; Ramanna, Jacobsen, 2003; Cai, Xu, 2007]. Эти три типа описывают реституцию у растений или гибридов, преимущественно, способных к образованию бивалентов в МI (кроме асинапсиса, который может приводить к FDR). Для гибридов пшеницы описано множество цитотипов формирования нередуцированных гамет и многие авторы вводят свою терминологию для описания реституции, что также осложняет понимание механизмов реституции [обзор, Силкова и др., 2011]. Наличие столь разрозненных данных, может быть связано с отсутствием четкого понимания, какие механизмы приводят к реституции [обзор, Силкова и др., 2011]. Причиной отсутствия единого мнения является сложность анализа цитологических данных мейоза у амфигаплоидов, поскольку в пределах одного генотипа может сосуществовать несколько цитотипов реституции, совместно с нереституционным делением [Силкова и др., 2003; Silkova et al., 2011], а также тот факт, что деление в отдельных мейоцитах происходит асинхронно [Cai et al., 2010; Silkova et al., 2011]. То есть, на цитологических препаратах, окрашенных ацетокармином, ацетоорсеином, карбол-фуксином (окрашивание хроматина) [Islam, Shepherd, 1980; Xu, Jorra, 1995, 2000; Zhang et al., 2007, 2008; Silkova et al., 2011], сложно идентифицировать стадии деления. Например, в мейоцитах, где в отсутствие бивалентов, унивалентные хромосомы произвольным образом распределены в цитоплазме, невозможно отличить движение хромосом к экватору в прометафазе I от расхождения отдельных хромосом в AI.

С использованием гибридов с различными хромосомными замещениями, контрастных по частоте появления различных мейотических цитотипов [Silkova et al., 2011], а также современных методов молекулярно-цитогенетического анализа, удалось охарактеризовать 4 типа деления мейоцитов, а среди них выявить два основных механизма формирования нередуцированных гамет, происходящих в первом делении: эквационное разделение хромосом в МI и формирование

монополярного веретена деления. На основании данных о динамике микротрубочек и структуре кинетохора унивалентных хромосом в представленной работе подтверждено, что редукционное и эквационно+редукционное деление, являются самостоятельными типами деления, а не промежуточными стадиями первого мейоза. Так, для редукционного типа деления характерно наличие двух стадий деления, первое из которых отличается отсутствием выравнивания унивалентных хромосом на экваторе, монополярной ориентацией кинетохоров и отсутствием разделения хромосом на сестринские хроматиды в АI. Второе деление практически неотличимо от нормального, характеризуется эквационным делением хромосом и преимущественным образованием тетрад.

Для редукционно+эквационного типа деления также характерно наличие двух стадий деления, однако в ТII формируются преимущественно полиады, или тетрады с микроядрами в результате задержки на экваторе одиночных хроматид (которые образовались при разделении части хромосом на хроматиды еще в первом делении). Отличительной чертой данного типа деления является наличие как би-, так и монополярно-ориентированных кинетохоров в МI. Оба описанных типа деления приводят к неравномерному распределению хромосом в первом делении, формированию несбалансированных гамет во втором и образованию стерильной пыльцы, и, следовательно, не могут считаться механизмами мейотической реституции. Произвольное распределение хромосом между полюсами в первом делении и образование тетрад и полиад описано также у гибридов тетраплоидной пшеницы (*Triticum turgidum* L.) с рожью (*Secale cereale* L.) и эгилопсом (*Ae. tauschii* Coss.) [Ху, Жорра, 1995, 2000]. Авторы предполагали 5 возможных типов деления хромосом, один из которых (№4) соответствует нашему представлению о редукционном типе деления, а смешанное (редукционно+эквационное) деление было объединено с эквационным (№2). Однако, в отличие от представленной работы, авторы использовали только окрашивание хроматина карбол-фуксином, что ограничивало возможность правильного определения организации хромосом и стадий деления [Ху, Жорра, 2000].

Мейотическое деление, фенотипически схожее с редукционным типом, наблюдалось у синаптических мутантов *DMC1* и *spo11* арабидопсиса [Couteau et al., 1999; Grelon et al., 2001]. Мутация гена *DMC1*, участвующего в рекомбинации

хромосом, характеризовалась образованием 10 унивалентов, которые произвольным образом распределялись в МІ [Couteau et al., 1999; Pradillo et al., 2012]. Разделение сестринских хроматид во втором делении приводило к образованию тетрад и полиад как в микро-, так и в мегаспорогенезе и снижению фертильности на 98.5% [Couteau et al., 1999]. У мутантов *spo11* также наблюдалось подавление рекомбинации и синапсиса хромосом и неравномерное распределение унивалентных хромосом в АІ [Grelon et al., 2001]. Для двух других асинаптических мутантов арабидопсиса *asy1* и *dsy1*, было показано деление, подобное редукционно+эквационному типу [Ross et al., 1997]. Так, в первом делении мейоза у *asy1* уже на стадии диплотены наблюдалось преимущественное образование унивалентов, некоторые из них произвольным образом распределялись между полюсами в анафазе, другие же разделялись на сестринские хроматиды, отходящие к противоположным полюсам. Вследствие неравного распределения хромосом и хроматид в МІ, во втором делении наблюдалось образование асимметричных (неравных) тетрад и полиад. У мутантов *dsy1* на стадии диплотены наблюдалось образование бивалентов, однако к МІ они разделялись с образованием унивалентов, а дальнейшие стадии мейоза не отличались от описанных для мутантов *asy1* [Ross et al., 1997]. Схожая картина неправильного разделения хромосом в МІ с образованием полиад в конце второго деления показана также у мутантов по гену *AtCTF7/ECO1* (ацетилтрансфераза, которая участвует в когезии хромосом и репарации ДНК) арабидопсиса [Bolaños-Villegas et al., 2013]. Однако у растений *AtCTF7/ECO1* наблюдалась не только стерильность пыльцы, но и карликовость растений, которая не показана для пшенично-ржаных амфигаплоидов.

Существование двух основных механизмов, приводящих к реституции у межродовых гибридов пшеницы, уже обсуждалось ранее [Xu, Jorra, 2000; Zhang et al., 2007, 2008; Nao et al., 2014]. Реализация реституции через эквационное разделение хромосом в МІ показана для гибридов тетраплоидной и гексаплоидной пшениц с рожью [Zhang et al., 2007; Silkova et al., 2011; Oleszczuk, Lukaszewski, 2014] и тетраплоидной пшеницы с эгилопсом [Matsuoka, Nasuda, 2004; Zhang et al., 2007, 2008].

У пшенично-ржаных амфигаплоидов, исследуемых в представленной работе, наблюдалось выстраивание унивалентных хромосом на экваторе в МІ и их эквационное разделение в АІ, что подтверждалось распределением фосфорилирования по всей длине хромосом и хроматид. При этом выстраивающиеся на экваторе хромосомы имели митотическую организацию ДНК центромеры и кинетохоров, что подтверждалось наличием растянутого диффузного сигнала локализации центромерного зонда (pAet6-09) и двухточечного сигнала локализации антител к белку внутреннего кинетохора, располагающихся с разных сторон от первичной перетяжки хромосом (CENH3). При анализе иммуноокрашивания с антителами к α -тубулину МТ в клетках с эквационным типом деления, на стадии МІ и до поздней АІ детектировалось нормальное биполярное веретено деления и построение фрагмопласта в ТІ, разделяющего два полигаплоидных ядра с образованием симметричных диад. На данный момент, анализ веретена деления при изучении реституции у гибридов пшеницы с использованием иммуноокрашивания представлен только в двух работах [Cai et al., 2010; Matsuoka et al., 2013]. Однако в данных работах авторы не наблюдали эквационного деления хромосом в МІ: после выстраивания хромосом на экваторе, с их точки зрения, происходила дезорганизация веретена деления и деконденсация хромосом [Cai et al., 2010; Matsuoka et al., 2013].

Вторым (основным) механизмом образования нередуцированных гамет считается блокирование первого деления мейоза с образованием реституционного ядра и разделением хромосом на хроматиды во втором делении [Ху, Жорра, 1995, 2000; Cai et al., 2010; Matsuoka et al., 2013; НАО et al., 2014]. В представленной работе описана реализация реституции как блокирование первого деления в результате образования монополярного веретена с последующим разделением сестринских хроматид во втором делении. Достоверность образования монополярного веретена была описана с использованием комбинации иммуноокрашивания с антителами к МТ веретена, CENH3, pH3Ser10 и FISH. Образование монополярного веретена деления именно в МІ подтверждалось наличием сигнала локализации антител к pH3Ser10 по всей длине хромосом. Ориентация хромосом кинетохором к одному полюсу и отсутствие второго дивергентного или конвергентного полюса подтверждались при анализе клеток с

данным типом деления на конфокальном микроскопе. Монополярная ориентация хромосом подтверждалась образованием мейотической структуры центромерной ДНК (одиночный точечный сигнал, pAet6-09) и формированием объединенного кинетохора сестринских хроматид в МІ (одиночный точечный сигнал, CENH3). Для данного типа клеток мы предполагаем отсутствие стадий AI-TI и цитокинеза, диссоциацию микротрубочек веретена и образование реституционного ядра. Однако, согласно данным некоторых авторов, блокирование первого деления у гибридов пшеницы *Triticum turgidum* L. с эгилопсом *Ae. tauschii* Coss. и образование реституционного ядра происходит после выстраивания унивалентных хромосом в эквационной плоскости, в результате дезорганизации (диссоциации) биполярного веретена деления, сопровождающегося деконденсацией хромосом [Cai et al., 2010; Matsuoka et al., 2013]. Поскольку обе исследовательские группы [Cai et al., 2010; Matsuoka et al., 2013] также использовали иммуноокрашивание с антителами к МТ веретена и конфокальную микроскопию, можно сделать вывод, что формирование монополярного веретена деления может быть особенностью пшенично-ржаных амфигаплоидов и определяться генотипом растений. Например, в мейозе у пшенично-пырейных гибридов ранее была показана низкая (3-10%), по сравнению с пшенично-ржаными гибридами (от 30 до 70%), частота появления монополярных веретен [Shamina et al., 2003].

4.3. Эквационное деление, приводящее к реституции, сочетает характеристики митотического и мейотического деления

В работе было показано, что организация ДНК в районе первичной перетяжки хромосом и организация кинетохора соответствовали митотическому делению. Так, сигнал локализации центромерного зонда pAet6-09 в МІ имел вытянутую диффузную структуру, как в митозе у пшеницы и ржи (рис. 3.16 а). Мы предполагаем, что такая структура может быть следствием физического натяжения центромерных районов при биполярной организации кинетохоров. Согласно данным литературы, структура хромосом различна при монополярной (первое деление мейоза) и биполярной (второе деление мейоза и митоз) ориентации, причем данные различия касаются расположения хромосомного (хроматидного)

кора и кинетохора (модель хромосомного скэффолда, chromosomal scaffold model) [Rufas et al., 1992; Stack, Anderson, 2001; Suja, Rufas, 2007]. В митозе коры обнаруживаются в виде плотных линейных структур внутри хроматид метафазных хромосом, в то время как на стадии пахитены в мейозе у бивалентов пара сестринских коров расположена на периферии по отношению к петлям хроматина [Rufas et al., 1992; Stack, Anderson, 2001; Suja, Rufas, 2007]. Разница в расположении хроматидных коров предопределяет позицию кинетохоров: при митотическом расположении сестринских коров «бок-о-бок» (back-to-back) – кинетохоры располагаются отдельно по обе стороны от хромосомы, а расположенные рядом (side-by-side) сестринские коры предопределяют положение кинетохоров с одной стороны хромосомы [Stack, Anderson, 2001; Suja, Rufas, 2007]. Пространственное ограничение рядом расположенных сестринских кинетохоров способствует синтелическому (от одного полюса) прикреплению МТ в первом делении мейоза, в то время как расположение «бок-о-бок» во время митоза и второго деления мейоза способствует амфителлическому (от разных полюсов, биполярная ориентация) прикреплению МТ веретена [Hauf, Watanabe, 2004]. Натяжение центромерного района при биполярной ориентации хромосом было также показано у гибридов тетраплоидной пшеницы *T. turgidum* L. линии Do1 с рожью *S. cereale* L. линии MAD510, характеризующихся эквационным разделением хромосом в МІ с последующим блокированием второго деления [Oleszczuk, Lukaszewski, 2014]. В МІ наблюдалось по два сигнала локализации антител к белку СЕНН3 на каждой хромосоме: по одному сигналу с обеих сторон от ориентированной вдоль эквационной плоскости хромосомы. От сестринских кинетохоров отходили пучки МТ, направленные к противоположным полюсам (рис. 3.15 а).

У пшеницы и большинства других растений фосфорилирование гистона Н3 по серину в 10 положении происходит по всей длине в первом делении мейоза, начиная с прометафазы и только в области центромеры во втором делении мейоза и митозе [Kaszas, Cande, 2000; Manzanero et al., 2000]. В представленной работе было показано, что эквационное разделение хромосом действительно происходит именно в первом делении, поскольку в МІ наблюдалось выстраивание фосфорилированных по всей длине хромосом и разделение хромосом на

хроматиды в AI (рис. 3.14 д,е). Как и в нормальном первом делении, фосфорилирование по всей длине хроматид сохранялось до поздней AI, а в TI детектировалось только в области центромеры. Кроме того, структура хромосом (плотность упаковки хроматина, отражающаяся в сокращении длины плечей хромосом) соответствовала первому мейотическому делению, плечи хромосом/хроматид были короче, чем это наблюдалось в митозе или втором делении мейоза, что отражало более плотную (мейотическую) упаковку (рис. 3.15 д,е). В отличие от наших данных, у мутантов по гену *ago104* кукурузы, для которых описана реституция с образованием нередуцированных гамет, авторы наблюдали преимущественную локализацию антител к pH3Ser10 только в области центромеры [Singh et al., 2011]. Так как фосфорилирование в области центромер характерно для митотического деления, в сочетании с наблюдаемым нарушением когезии и одноэтапным разделением хромосом на сестринские хроматиды, авторы сделали вывод, что у данных мутантов произошло переключение мейотического деления на митотическое. Поскольку уровень фосфорилирования и компактизации хромосом у пшенично-ржаных амфигаплоидов соответствовал первому мейотическому делению, то в данном случае не наблюдается полное переключение на митотическое деление. Необходимо также отметить, что, в отличие от амфигаплоидов, у мутантов *ago 104* кукурузы наблюдалось также нарушение структуры и компактизации хромосом [Singh et al., 2011].

Кроме мейотической организации хромосом, эквационное деление отличалось от классического митоза расположением хромосом вдоль веретена деления, а не поперек него, как у митотических хромосом. Также можно отметить, что деление хромосом в AI происходило практически одновременно, как на плечах хромосом, так и в центромере, что отличается от митотической или мейотической программы деления высших эукариот [Nasmyth, Haering, 2009; Marston, 2015]. Когезия хромосом в митозе и мейозе обеспечивается белковыми комплексами – когезиновыми кольцами (состоят из Smc1, Smc3, Scc3 субъединиц и α -kleisin субъединицы: Scc1/Rad21/Mcd1 в митозе и Rec8 в мейозе), которые удерживают хроматиды вместе после репликации хромосом [Nasmyth, Haering, 2009]. В мейозе деление плечей сестринских хроматид (потеря когезии) происходит в первом делении, что позволяет разделить гомологичные хромосомы (редукционное

деление), а разделение центромер сестринских хроматид происходит во втором делении мейоза (эквационное деление), что приводит к образованию гаплоидных гамет [Marston, 2015]. Разделение плечей хромосом происходит в результате «разрезания» сепаразой когезиновых колец (α -kleisin субъединицы), удерживающих хроматиды вместе [Nasmyth, Haering, 2009; Marston, 2015]. Прицентромерная область в первом делении мейоза защищена от разрезания белком-шугошином (SGO) [Kitajima et al., 2004, 2006; Hamant et al., 2005], который инактивируется во втором делении, позволяя сепаразе разделить сестринские центромеры [Nasmyth, Haering, 2009; Marston, 2015]. В митозе потеря когезии плечей хромосом и центромерных областей происходит также в два этапа, в профазе происходит разделение плечей хромосом с помощью киназы Plk (polo-like kinase), а в начале анафазы сепараза разрезает когезин в области центромеры, освобождая сестринские хроматиды [Nasmyth, Haering, 2009; Marston, 2015]. Таким образом, потеря когезии у хромосом, наблюдаемая нами у пшенично-ржаных амфигаплоидов, не соответствует ни мейотическому, ни митотическому пути. Однако у дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) реализуется схожая программа одновременного разделения плечей и центромер хромосом в анафазе митоза в результате разрезания сепарином (сепараза) Scc1 субъединицы когезина [Uhlmann et al., 1999].

4.4. Предположительный механизм деления, подобного митозу, у пшенично-ржаных гибридов

Для диплоидных растений, характеризующихся симультанным цитокинезом, основным механизмом образования нередуцированных гамет считается нарушение построения веретена деления в МП, приводящее к образованию FDR-гамет [Ramanna, 1979; Ramanna, Jacobsen, 2003; Cai, Xu, 2007]. Также реституция может быть связана с асинапсисом, аномалиями когезии сестринских хроматид и переключением с мейотического на митотическое деление [Ravi et al., 2008; Pawlowski et al., 2009; Singh et al., 2011; Filho et al., 2014].

В нашей работе мы определили два основных механизма реституции у пшенично-ржаных гибридов, полученных скрещиванием *T. aestivum* L. сорта

Саратовская 29 и *S. cereale* L. сорта Онохойская. Один из механизмов связан с блокированием первого деления в результате образования монополярного веретена, второй – связан с эквационным разделением хромосом в МІ и блокированием второго деления. Частота появления мейоцитов с монополярным веретеном незначительна, и основным механизмом образования нередуцированных гамет можно считать эквационное расхождение хромосом в МІ.

Поскольку основным различием мейоза фертильных гибридов $1Rv(1A)xR$, $5R(5D)xR$, $6R(6A)xR$ (с эквационным типом деления) и стерильных $2R(2D)_1xR$ (с редукционным типом деления) является одноэтапное разделение сестринских хроматид в первом делении мейоза, следовательно, нарушения, приводящие к эквационному типу деления, могут быть связаны с особенностями организации хромосом и кинетохоров. В норме когезия хромосом и монополярная ориентация кинетохоров в МІ обеспечивается локализацией мейоз-специфичного когезина на хромосомах, содержащего белок REC8, который удерживает сестринские хроматиды вместе, а также белка шугошина (SGO1), сохраняющего когезию в центромерном районе в АІ [Hamant et al., 2005; Golubovskaya et al., 2006; Zamariola et al., 2013]. Потеря активности *REC8* может приводить к нарушению когезии хромосом и разделению сестринских хроматид в АІ, как было показано для растений арабидопсиса (*SYN1/AtRec8*), кукурузы (*afd1/Zmrec8*) и риса (*OsREC8*) [Chelysheva et al., 2005; Golubovskaya et al., 2006; Shao et al., 2011]. Однако *SYN1/AtRec8* участвует не только в установлении когезии сестринских хроматид, но также в элонгации синаптонемного комплекса и репарации двуцепочечных разрывов ДНК, вследствие чего у мутантов по данному гену в первом делении мейоза наблюдается также фрагментация хромосом [Chelysheva et al., 2005]. Участие белка REC8 не только в когезии, но и в образовании СК показано также у кукурузы и риса [Golubovskaya et al., 2006; Shao et al., 2011], кроме того, для риса показано участие REC8 в гомологичной рекомбинации [Shao et al., 2011]. В случае потери экспрессии *afd1*, наблюдаемое нарушение когезии хромосом приводит к отсутствию фосфорилирования гистона H3 (phH3Ser10) на плечах хромосом [Kaszas, Cande, 2000]. При эквационном типе деления у пшенично-ржаных амфигаплоидов мы наблюдали сигнал phH3Ser10 по всей длине хромосом, и не наблюдали фрагментации хромосом, что говорит о нормальной работе когезинов и

наличии белка REC8. Нарушения экспрессии *SGO1*, с другой стороны, не влияет на организацию хромосом, как было показано для мутантов по гену *ZmSGO1* кукурузы [Namant et al., 2005]. У *Zmsgo1* мутантов наблюдается преждевременное разделение сестринских хроматид в конце первого деления мейоза, а второе деление характеризуется отсутствием нормального расхождения одиночных хроматид [Namant et al., 2005]. У пшенично-ржаных амфигаплоидов с эквационным типом деления мы также наблюдали расхождение сестринских хроматид уже в первом делении, из чего можно сделать вывод о возможном отсутствии или преждевременной диссоциации белка *SGO1* из центромерной области хромосом в MI или AI. Однако нарушения активности/отсутствия *SGO1* недостаточно для реализации реституции, поскольку *SGO1* не влияет на монополярность ориентации кинетохоров в MI и не способен вызывать блокирование деления.

Объединение сестринских кинетохоров в неделимую функциональную единицу в MI (монополярная ориентация) у растений обеспечивается комплексом кинетохорных белков MIS12 и NDS80, как было показано для растений кукурузы [Li, Dawe, 2009]. Монополярно-ориентированный объединенный кинетохор обеспечивает синтетическое прикрепление МТ веретена, в то время как подавление экспрессии *MIS12* приводит к биполярной ориентации кинетохоров и амфителлическому прикреплению микротрубочек веретена [Li, Dawe, 2009]. У пшенично-ржаных амфигаплоидов эквационное разделение хромосом сопровождалось биполярной ориентацией кинетохоров. По аналогии с данными, полученными на кукурузе, можно предположить, что у гибридов 1Rv(1A)xR, 5R(5D)xR, 6R(6A)xR могло произойти нарушение экспрессии одного из белков MIS12 или NDS80. Другой вероятной причиной биполярной ориентации кинетохоров у амфигаплоидов может быть организация хромосомных коров «бок-о-бок» и, соответственно, кинетохоров.

Сочетание двух мутаций *Atspo11-1/Atrec8* также приводит к митоз-подобному расхождению хромосом в первом делении мейоза *A. thaliana*, но отсутствие блокирования второго деления приводит к образованию несбалансированных спор и стерильности растений [Chelysheva et al., 2005]. Эквационное разделение унивалентных хромосом с образованием диад и блокированием второго деления показано для мутантов *Mi-Me-2* (митоз вместо мейоза) *A. thaliana* [d'Erfurth et al.,

2010]. Данные мутанты были получены объединением в одном геноме трех мейотических мутаций: *Atspo11-1*, которая затрагивает гомологичную рекомбинацию и приводит к образованию унивалентов, *Atrec8*, приводящая к нарушению когезии и *cusca1;2/tam*, приводящая к отсутствию второго деления [d'Erfurth et al., 2010]. Следовательно, для реализации реституции обязательным условием является также блокирование второго деления мейоза после эквационного разделения хроматид в AI. Переход из MI в AI, а также из первого деления во второе сопровождается частичной деградацией циклина В (активатор киназы CDK1) и снижение активности CDK1. Абсолютное подавление CDK1-активности в нормальном делении мейоза не происходит, чтобы не допустить выход из мейоза и следующий цикл репликации ДНК [Nasmyth, Haering, 2009]. Полная деградация циклина В и подавление CDK1 способствуют переходу из MII в AII и окончанию мейотического деления. Формирование диад в микроспорогенезе амфигаплоидов может свидетельствовать об отсутствии активности CDK1 и APC/C в конце первого деления. Возможно, выход из клеточного деления может быть осуществлен путем полной деградации циклина В, что также, как и разделение сестринских хроматид в AI, более характерно для митоза, а не мейоза. Следует также отметить, что у пшеницы гомолог гена *cusca1;2/tam*, мутация которого приводит к формированию нередуцированных гамет в *A. thaliana* [d'Erfurth et al., 2010], расположен близко к QTL (*QTug.sau-3B*), для которого показано участие в гексаплоидизации пшеницы [Нао et al., 2014]. По-видимому, данный ген может также влиять на реституцию у амфигаплоидных растений пшеницы.

Таким образом, можно представить следующую схему реализации реституции в мейоцитах с эквационным типом деления (рис. 4.1). В S-фазе происходит локализация белка Rec8 (когезин, рис. 4.1) на хромосомы и установление когезии сестринских хроматид. В III отсутствует спаривание хромосом, обеспечиваемое наличием *Ph1* локуса. В MI унивалентные хромосомы с биполярно-ориентированными кинетохорами выстраиваются в эквационной плоскости за счет амфителического прикрепления МТ веретена, предположительно, обеспечиваемое организацией хромосомных коров «бок-о-бок» или подавлением генов *MIS12*, *NDS80*. В AI сепараза разрезает когезиновые кольца, разделяя как сестринские хроматиды, так и центромеры, не защищенные белковым комплексом SGO1-PP2A.

В ТІ происходит декомпактизация хромосом, полная деградация циклина и подавление активности CDK1-киназы, приводящие к выходу из мейоза и формированию диад.

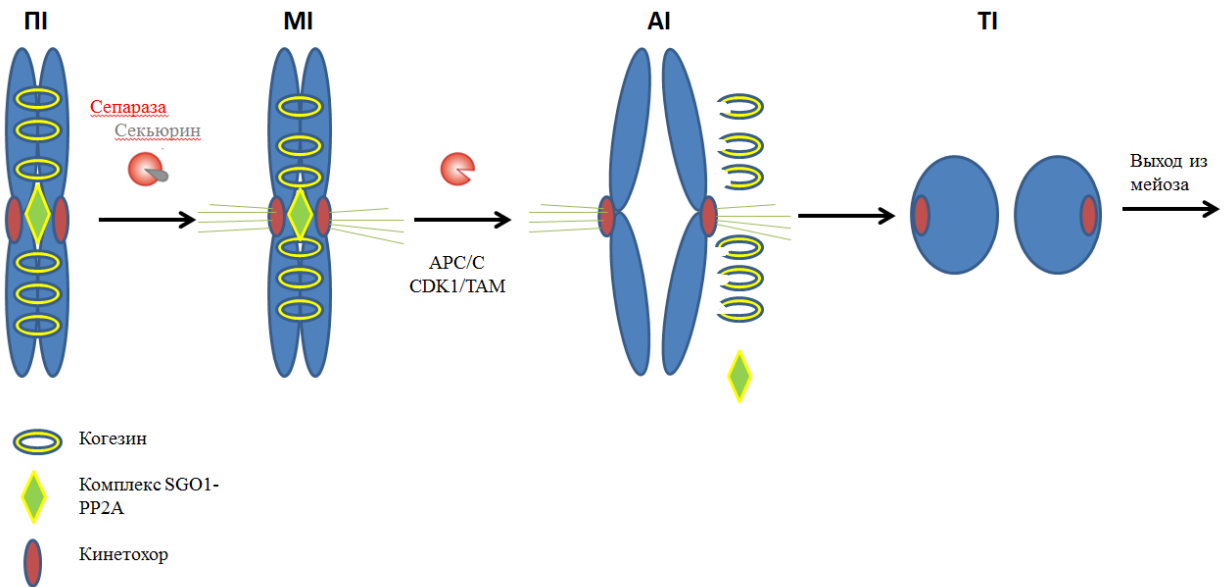


Рисунок 4.1. Предполагаемая схема реституции у пшенично-ржаных амфигаплоидов с эквационным типом деления.

4.5. Формирование монополярного веретена у амфигаплоидов

Первое мейотическое деление в норме характеризуется формированием биполярного конвергентного веретена деления, но у гибридов 1Rv(1A)xR, 5R(5D)xR, и 6R(6A)xR мы наблюдали мейоциты с аномальным монополярным веретеном. Формирование монополярного веретена может быть связано с нарушениями в работе моторных белков семейства кинезин-5 [Bannigan et al., 2007]. Так, у митотического мутанта *rsw7* (radially swollen7) *A. thaliana* L., в прометафазе происходило формирование биполярного веретена, полюса которого затем «схлопывались» с образованием одного полюса, в дальнейшем МТ мигрировали к периферии клетки, но фрагмoplast не формировался [Bannigan et al., 2007]. Так же, как и у других организмов, белки семейства кинезин-5 растений стабилизируют веретено на экваторе, фиксируя плюс-концы МТ [Zhu, Dixit 2012]. В нашей работе мы не наблюдали реориентации МТ или «схлопывания» полюсов как у мутантов *rsw7*, следовательно, можно предположить, что формирование

монополярного веретена у амфигаплоидов не связано с нарушением работы кинезинов-5.

Кроме кинезинов, в формировании биполярного веретена деления у растений участвует также Cdc2/CDK1 киназа, ингибирование которой приводило к аномалиям веретена у садового боба и люцерны [Binarova et al., 1998]. В таких клетках в метафазе хромосомы не выстраивались на экваторе, а образовывали круг, в котором кинетохоры были ориентированы к центру, а плечи - наружу. Использование гамма-тубулина в качестве маркера полюсов позволило установить наличие одного полюса в центре данного круга, что подтверждало формирование монополярного веретена [Binarova et al., 1998]. Данная картина схожа с формированием хромосомами фигуры кольца кинетохорами внутрь и плечами - наружу в первом делении мейоза у амфигаплоидов. Таким образом, можно предположить, что формирование монополярного веретена может быть следствием инактивации Cdc2/CDK1 киназы.

4.6. Гибриды $2R(2D)_1xR$ являются удобными моделями для изучения динамики МТ в мейозе

У пшенично-ржаных гибридов $2R(2D)_1xR$ мы наблюдали преимущественно редукционный тип деления, характеризующийся монополярной ориентацией унивалентных хромосом и их произвольным распределением между полюсами. Такой тип поведения может предположить отсутствие функционирования чекпоинтов SAC (Spindle Assembly Checkpoint, чекпоинт сборки веретена деления) и APC (Anaphase Promotion Complex, комплекс стимуляции анафазы). Контроль сегрегации хромосом лучше всего описан у животных и дрожжей и осуществляется благодаря наличию SAC, функция которого обеспечивается консервативными белками, контролирующими правильное прикрепление МТ веретена деления к кинетохорам хромосом [Zamariola et al., 2014]. В случае неправильного прикрепления МТ, эти белки посылают сигнал к остановке деления, не позволяя войти клетке в стадию анафазы. Переход в анафазу и деградация когезина обеспечивается белками APC [Adele, Marstone, 2009]. Предполагается, что белки SGO способны определять отсутствие «натяжения» между кинетохорами при

неправильном прикреплении МТ и принимают участие в координации работы CPC (Chromosome Passenger Complex, транзитный хромосомный комплекс), APC и SAC [Gutierrez-Caballero et al., 2012]. У растений чекпоинт сборки веретена деления не такой строгий, как у животных и дрожжей [Wijnker, Schnittger, 2013], и наличие неспаренных хромосом или неправильно прикрепленных МТ не останавливает деление, в результате чего мы наблюдаем различные нарушения в образовании гамет у гибридных растений. Предполагается, что контроль чекпоинта сборки веретена деления у растений осуществляется так же, как и у животных, поскольку для некоторых растений идентифицированы гомологи генов, кодирующих SAC белки, такие как *MAD2* (mitotic arrest deficient) кукурузы и арабидопсиса, *BRK1* (Bub1-Related Kinase) риса и *Mps1* (Monopolar kinase1) арабидопсиса [Wang et al., 2012; Zamariola et al., 2014]. Для растений пшеницы также показано наличие гена *MAD2*, картированного на хромосомах 2-ой гомеологической группы [Kimbara et al., 2004]. Предполагается, что белок *MAD2* участвует в контроле чекпоинта сборки веретена деления в митозе пшеницы, поскольку при обработке делящихся клеток колхицином (разрушение МТ веретена деления), *MAD2* оставался связанным с кинетохорами хромосом и в метафазе, чего не наблюдалось в норме. Однако функция данного белка в мейозе, как и влияние каждой из гомеологических копий гена *MAD2* пока еще не определены [Kimbara et al., 2004].

Кроме отсутствия чекпоинта сборки веретена деления у гибридов $2R(2D)_1 \times R$, детектировалось наибольшее число отклонений в работе веретена деления, таких как формирование изогнутого, трехполюсного и сферического веретен деления, что говорит о нарушении полярности веретена. Данные отклонения могут быть связаны с наблюдаемым отсутствием/подавлением формирования интерзональных микротрубочек в AI, а также с практически полным отсутствием выстраивающихся в эквационной плоскости биполярно-ориентированных хромосом, прикрепленных к МТ от противоположных полюсов.

У амфигаплоидов $2R(2D)_1 \times R$ мы наблюдали формирование полюсных структур без формирования интерзональной системы МТ. Следовательно, можно предположить, что кинетохорные пучки микротрубочек способны распределять хромосомы между полюсами в отсутствие интерзональной системы МТ, возможно, за счет тянущей силы, создаваемой при разборке МТ на полюсах. Динамика МТ и

сегрегация хромосом лучше всего изучены на примере анафазы митоза животных, которая происходит в 2 этапа: начало движения хромосом к полюсам (анафаза А) и элонгация веретена деления (анафаза Б) [McIntosh et al., 2012]. При этом, движение хромосом в анафазе А происходит за счет укорочения кинетохорных микротрубочек, обеспечиваемое деполимеризацией МТ в области кинетохора и/или на полюсах (в зависимости от типа клеток и организма) [McIntosh et al., 2012]. Сегрегация также может осуществляться за счет действия белков-кинезинов, таких как хромокинезин Nod, для которого предполагается участие в создании тянущей силы на полюсах в ооцитах дрозофилы [Theurkauf, Hawley 1992; Matthies et al., 1999]. В анафазе Б основную роль играет интерзональная система микротрубочек, обеспечивающая «расталкивание» противоположных полюсов, за счет кинезин-5 опосредованного скольжения интерзональных микротрубочек и стабилизации плюс-концов МТ белком патронином (Patronine), который противодействует кинезин-13 опосредованной деполимеризации МТ на полюсах [Wang et al., 2013]. Таким образом, можно предположить, что у растений система интерзональных МТ менее важна, чем у животных для сегрегации хромосом и может осуществляться за счет деполимеризации МТ. Также стоит отметить, что в растительных клетках интерзональные МТ участвуют в формировании фрагмопласта в телофазе - массива антипараллельных МТ, который способствует везикулярному транспорту (везикулы Гольджи) к экватору клетки. Транспортируемые пузырьки сливаются на экваторе с образованием клеточной пластинки, которая, в конце цитокинеза, объединяется с плазматической мембраной, разделяя две новые клетки [Seguí-Simarro et al., 2004]. Отсутствие МТ в области экватора в АІ не приводило к блокированию цитокинеза у растений $2R(2D)_1xR$, и в ТІ наблюдалось построение фрагмопласта и клеточной стенки.

Гибридные растения $2R(2D)_1xR$ являются хорошей моделью для изучения динамики МТ, поскольку у растений наблюдается множество различных нарушений веретена деления в МІ, которые, хотя и не приводят к реституции, но дают возможность установить некоторые закономерности организации веретена деления: в профазе пучки МТ формируются от кинетохора, а в анафазе кМТ пучки способны распределять хромосомы между полюсами в отсутствие центрального веретена.

4.7. Формообразование и продуктивность гибридов F₂

Отдаленная гибридизация является мощным инструментом селекционеров для получения новых форм культурных растений, что нашло свое подтверждение во множестве работ классиков, таких как Цицин [1963] и Карпеченко [1971]. При этом отмечалось, что «чем дальше родство, тем интереснее варианты» в формообразовании. Таким образом, наибольшее многообразие форм обеспечивается в результате объединения в одном гибридном геноме различных аллелей генов при межродовой гибридизации. Восстановление фертильности таких гибридов происходит при полиплоидизации, а сопутствующая реорганизация генома также способствует увеличению разнообразия форм. И фертильность, и формообразование зависят от генетического фона гибрида [Zhang et al., 2007, 2008]. Анализ фертильности гибридов F₁ тетраплоидной пшеницы *T. durum* Desf. сорта Langdon и его 10 дисомно замещенных линий с образцом AS60 *Ae. tauschii* Coss. показал увеличение числа завязавшихся семян у гибридов 1D(1A), 1D(1B), 3D(3A), 4D(4B), 7D(7A), и 2D(2B) с AS60 и снижение у гибридов 3D(3B)+3BL, 5D(5A)+5AL, 5D(5B)+5B, и 6D(6B)+6BS с AS60 по сравнению с гибридами Langdon с AS60 [Zhang et al., 2008]. В настоящей работе также показано, что формообразование и восстановление фертильности зависят от генотипа. Так, у потомков F₂ 1Rv(1A)xR наблюдалось увеличение числа зерен с одновременным сокращением их массы относительно родительских форм пшеницы (замещенная линия), в то время как у потомков 6R(6A)xR наблюдалось увеличение числа зерен без снижения массы, но у одного из растений происходило увеличение массы 1000 зерен и изменение окраски перикарпа (растение №10-1). Восстановление фертильности происходило как у гибридов пшеницы сорта Саратовская 29 с рожью, так и у гибридов замещенных линий 1Rv(1A), 6R(6A), 5R(5D) с рожью, но не у гибридов 2R(2D)₁xR.

Согласно Нао с соавторами [2014], образование нередуцированных гамет через FDR с формированием реституционного ядра обеспечивает более правильное распределение хроматид во втором делении, а реституция при эквационном разделении хромосом в первом делении мейоза может приводить к анеуплоидии. Кроме того, в работе Oleszczuk, Lukaszewski [2014] предложено несколько

различных типов эквационного разделения, в результате которых образуются анеуплоидные гаметы, а также возможно наличие хромосомных перестроек. В нашей работе у всех гибридов, кроме стерильных $2R(2D)_1 \times R$, потомки F_2 различались между собой по морфологическим признакам, однако мы наблюдали одновременное присутствие двух механизмов реституции – формирование монополярного веретена и митоз-подобное деление (эквационный тип). Следовательно, различия между потомками могут быть связаны с использованием различных замещений. С другой стороны, единовременное присутствие двух механизмов реституции, приводящих к восстановлению фертильности гибридов, отмечалось также при скрещивании пшеницы *T. durum* Desf. сорта Langdon и его 10 дисомно замещенных линий с образцом AS60 *Ae. tauschii* Coss. [Zhang et al., 2008]. Однако в данном случае, не было обнаружено связи между различными замещениями и формированием анеуплоидных гамет. Таким образом, проведение дальнейших исследований по анализу гибридных геномов позволит получить более точный ответ о причинах наблюдаемых различий у растений F_2 .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертации приведены исследования поведения хромосом в мейозе у пшенично-ржаных амфигаплоидов с различными замещениями хромосом пшеницы. Установлено, что замещение 2R/2D предопределяет редукционный тип деления хромосом и стерильность гибридов, а особенностью замещений 1Rv/1A, 6R/6A, 5R/5D является индуцирование двух механизмов реституции и, как следствие, частичное восстановление фертильности. Кроме того, отличительной особенностью замещения 5R/5D является более высокая частота появления мейоцитов с блокированием первого мейотического деления.

В настоящем исследовании получены ответы на некоторые из давно волнующих генетиков вопросов с использованием современных цитогенетических методов. С помощью иммуноокрашивания и флуоресцентной *in situ* гибридизации в микроспорогенезе амфигаплоидов детально охарактеризовано четыре мейотических фенотипа поведения хромосом: редукционное, редукционно+эквационное, эквационное, а также блокирование первого деления. Данные о динамике микротрубочек и архитектуре кинетохоров унивалентных хромосом показывают, что два варианта поведения хромосом - редукционное и редукционно+эквационное, представляют собой автономные типы деления, а не промежуточные стадии первого деления мейоза.

Показано, что реституция может быть одновременно результатом, подобного митозу, эквационного деления хромосом с последующим блокированием второго деления, и блокирования первого деления при образовании монополярного веретена и сегрегации хроматид во втором мейотическом делении. При эквационном делении образуется биполярное веретено, разделение хромосом происходит в AI после выстраивания на экваторе клетки унивалентных хромосом с митотической организацией центромеры, но мейотической компактизацией и когезией хромосом. Потеря когезии сестринских хроматид в AI в данных мейоцитах происходит одноэтапно, т.е. одновременно разделяются плечи и центромеры сестринских хроматид. Таким образом, мейоз завершается и

образуются нередуцированные микроспоры. Второй тип деления, приводящий к образованию нередуцированных гамет происходит следующим образом: 1) формируется монополярное веретено в MI; 2) отсутствует сегрегация хромосом в AI; и 3) формируется биполярное веретено с последующей сегрегацией сестринских хроматид во втором делении мейоза. При этом, формирование монополярного веретена представляет собой структуру «шляпа», которая организуется из кинетохорных микротрубочек, конвергирующих на одном полюсе, а хромосомы имеют компактизацию и ориентацию кинетохора, соответствующие первому мейотическому делению.

Избыточность генома пшеницы затрудняет изучение генетической регуляции - сложно установить, какой именно ген отвечает за определенную функцию, так как в геноме присутствуют 3 гомеологичные копии, мутация одной из которых нивелируется наличием двух других. Однако реорганизация генома аллогексаплоидной пшеницы (AABBDD) при полиплоидизации, включающая элиминацию и эпигенетические изменения генов, привела к функциональной асимметрии субгеномов пшеницы. Как следствие, замещение хромосом может приводить к изменению активности генов, выражающееся в фенотипических различиях, в том числе и в поведении хромосом в мейозе, что, в дальнейшем, может помочь сузить поиск участвующих в реституции генов до определенной хромосомы. Линии с замещениями являются хорошей моделью для изучения механизмов реституции и мейотического деления в целом. Определение белков/генов, участвующих в регуляции реституции, может быть следующим важным этапом на пути получения фертильных гибридов пшеницы и последующей модификации ее генома.

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 специфичные 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белан И.А., Россеева Л.П., Россеев В.М., Бадаева Е.Д., Зеленский Ю.И., Блохина Н.П., Шепелев С.С., Першина Л.А. Изучение хозяйственно ценных и адаптивных признаков у линий сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37, несущих транслокации 1RS.1BL И 7DL-7Ai // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2012. - Т. 16. - № 1. - С. 178-186.
2. Карпеченко Г.Д. Избранные труды.- М.: Наука, 1971. - 304 с.
3. Карпеченко Г.Д. Полиплоидные гибриды *Raphanus sativus* L.× *Brassica oleracea* L. (К проблеме экспериментального видообразования) // Тр. по прикл. ботан. и селекции. - 1927. - Т. 17. - № 3. - С. 305–410.
4. 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.
5. Родионов А.В. Полиплоидия и межвидовая гибридизация в эволюции цветковых растений // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2013. - Т. 17. - № 4/2. - С. 916-929.
6. Силкова О.Г., Добровольская О.Б., Дубовец Н.И., Адонина И.Г., Кравцова Л.А., Щапова А.И., Шумный В.К. Получение пшенично-ржаных замещенных линий на основе озимых сортов ржи с идентификацией кариотипов методами С-бэндинга, GISH и SSR-маркеров // Генетика. - 2007. - Т. 43. - № 8. - С. 1149–1152.
7. Силкова О.Г., Добровольская О.Б., Дубовец Н.И., Адонина И.Г., Кравцова Л.А., Родер М.С., Салина Е.А., Щапова А.И., Шумный В.К. Создание пшенично-ржаных замещенных линий с идентификацией хромосомного состава кариотипов методами С-бэндинга, GISH и SSR-маркеров // Генетика. - 2006. - Т. 42. - № 6. - С. 793–802.
8. Силкова О.Г., Добровольская О.Б., Щапова А.И., Шумный В.К. Особенности регуляции мейотической реституции у андрогенных гаплоидов пшенично-ржаных замещенных линий 2R(2D)₁, 2R(2D)₃, 6R(6A) (*Triticum aestivum* L. сорта

- Саратовская 29/*Secale cereale* L., сорта Онохойская) // Генетика. - 2009. - Т. 45. - № 9. - С. 1211-1216.
9. Силкова О.Г., Щапова А.И., Кравцова Л.А. Механизмы мейотической реституции и их генетическая регуляция у пшенично-ржаных полигаплоидов // Генетика. - 2003. - Т. 38. - № 11. - С. 1514–1523.
10. Силкова О.Г., Щапова А.И., Шумный В.К. Мейотическая реституция у амфигаплоидов в трибе Triticeae // Генетика. - 2011. - Т. 47. - № 4. - С. 437–448.
11. Силкова О.Г., Щапова А.И., Шумный В.К. Передача генетического материала ржи в геном мягкой пшеницы методом межгеномного замещения хромосом // Вестник ВОГиС. - 2008. - Т. 12. - № 4. - С. 654-661.
12. Соснихина С.П., Михайлова Е.И., Тихолиз О.А., Прияткина С.Н., Смирнов В.Г., Войлоков А.В., Федотова Ю.С., Коломиец О.Л., Богданов Ю.Ф. Генетическая коллекция мейотических мутантов ржи *Secale cereale* L. // Генетика. - 2005. - Т. 41. - № 10. - С. 1310-1321.
13. Трубачеева Н.В., Россеева Л.П., Белан И.А., Осадчая Т.С., Кравцова Л.А., Колмаков Ю.В., Блохина Н.П., Першина Л.А. Особенности сортов яровой мягкой пшеницы Западной Сибири, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL // Генетика. - 2011. - Т. 47. - № 1. - С. 18–24.
14. Цицин Н.В. О формо- и видообразовании // Гибриды отдаленных скрещиваний и полиплоиды. - М.: Изд-во АН СССР, 1963. - С. 5–24.
15. Шамина Н.В. Аномалии цитоскелета и мейотическая реституция у высших растений // Цитология. - 2005. - Т. 47. - № 8. - С. 692–697.
16. Щапова А.И., Дударев А.Н., Гордей Г.М. Мейоз частично фертильных пшенично-ржаных гибридов // Цитология. - 1989. - Т. 31. - № 5. - С. 592–594.
17. Щапова А.И., Кравцова Л.А. Цитогенетика пшенично-ржаных гибридов. – Н: Наука. Сиб. отд-ие, 1990. - 164 с.
18. Aase H.C. Cytology of Triticum, Secale, and Aegilops hybrids with reference to phylogeny // Res. Stud. State Coll. Wash. - 1930. - V. 2. - P. 5–60.
19. Abbott R.J, Ireland H.E, Rogers H.J. Population decline despite high genetic diversity in the new allopolyploid species *Senecio cambrensis* (Asteraceae) // Mol. Ecol. - 2007. - V. 16. - P. 1023–1033.

20. Abbott R.J., Ireland H.I., Joseph L., Davies M.S., Rogers H.J. Recent plant speciation in Britain and Ireland: origins, establishment and evolution of four new hybrid species // *Proc. Roy. Irish Acad.* - 2005. - V. 105B. - P. 173–183.
21. Adams K.L., Wendel J.F. Novel patterns of gene expression in polyploid plants // *Trends Genet.* - 2005a - V. 21. - P. 539–543.
22. Adams K.L., Wendel J.F. Polyploidy and genome evolution in plants // *Curr. Opin. Plant Biol.* - 2005b. - V. 8. - № 2. - P. 135-141.
23. Adele L., Marston P. Roles of centromeres and kinetochores in meiosis // *The Kinetochores*. - New York: Springer Science+Business Media, 2009. - P. 395-431.
24. Agashe B., Prasad CK., Siddiqi I. Identification and analysis of DYAD: a gene required for meiotic chromosome organisation and female meiotic progression in *Arabidopsis* // *Development*. - 2002. - V. 129. - P. 3935-3943.
25. Ainouche M.L., Baumel A., Salmon A. *Spartina anglica* C.E. Hubbard: a natural model system for analyzing early evolutionary changes that affect allopolyploid genomes // *Biol. J. of the Linn. Soc.* - 2004. - V. 82. - P. 475–484.
26. Ainouche M.L., Fortune P.M., Salmon A., Parisod C., Grandbastien M-A., Fukunaga K., Ricou M., Misset M-T. Hybridization, polyploidy and invasion: lessons from *Spartina* Poaceae // *Biological Invasions*. - 2009. - V. 11. - P. 1159–1173.
27. Akhunov E.D., Akhunova A.R., Anderson O.D., Anderson J.A., Blake N., Clegg M.T., Coleman-Derr D., Conley E.J., Crossman C.C., Deal K.R., Dubcovsky J., Gill B.S., Gu Y.Q., Hadam J., Heo H., Huo N., Lazo G.R., Luo M.C., Ma Y.Q., Matthews D.E., McGuire P.E., Morrell P.L., Qualset C.O., Renfro J., Tabanao D., Talbert L.E., Tian C., Toleno D.M., Warburton M.L., You F.M., Zhang W., Dvorak J. Nucleotide diversity maps reveal variation in diversity among wheat genomes and chromosomes // *BMC Genomics*. - 2010. - V. 11: 702. doi: 10.1186/1471-2164-11-702.
28. Al-Kaff N., Knight E., Bertin I., Foote T., Hart N., Griffiths S., Moore G. Detailed dissection of the chromosomal region containing the *Ph1* locus in wheat *Triticum aestivum*: with deletion mutants and expression profiling // *Ann. Bot.* - 2008. - V. 101. - P. 863–872.
29. Allen A.M., Barker G.L., Berry S.T., Coghill J.A., Gwilliam R., Kirby S., Robinson P., Brenchley R.C., D'Amore R., McKenzie N., Waite D., Hall A., Bevan M., Hall N., Edwards K.J. Transcript-specific, single-nucleotide polymorphism discovery and

- linkage analysis in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Plant Biotechnol. J.* - 2011. - V. 9. - P. 1086–1099.
30. Amborella Genome Project. The Amborella genome and the evolution of flowering plants // *Science.* - 2013. - V. 342: 1241089. doi: 10.1126/science.1241089.
31. Anderson L.M., Driscoll C.J. The production and breeding behavior of a monosomic alien substitution line // *Can. J. Genet. Cytol.* - 1967. - V. 9. - P. 399-403.
32. Badaeva E.D., Dedkova O.S., Gay G., Pukhalskyi V.A., Zelenin A.V., Bernard S., Bernard M. Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution // *Genome.* - 2007. - V. 50. - № 10. - P. 907-926.
33. Bannigan A., Lizotte-Waniewski M., Riley M., Baskin T.I. Emerging molecular mechanisms that power and regulate the anastral mitotic spindle of flowering plants // *Cell Motil. Cytoskelet.* - 2008. - V. 65. - P. 1–11.
34. Barba-Gonzalez R., Lokker B.H., Lim K-B., Ramanna M.S., Van Tuyl J.M. Use of 2n gametes for the production of sexual polyploids from sterile Oriental x Asiatic hybrids of lilies (*Lilium*) // *Theor. Appl. Genet.* - 2004. - V. 109. - P. 1125-1132.
35. Barrell P.J., Grossniklaus U. Confocal microscopy of whole ovules for analysis of reproductive development: the *elongate1* mutant affects meiosis II // *Plant J.* - 2005. - V. 43. - № 2. - P. 309-320.
36. Baumel A., Ainouche M., Kalendar R., Schulman A.H. Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* C.E. Hubbard (Poaceae) // *Mol. Biol. Evol.* - 2002. - V. 19. - P. 1218–1227.
37. Beaulieu J., Jean M., Belzile F. The allotetraploid *Arabidopsis thaliana*-*Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea* as an alternative model system for the study of polyploidy in plants // *Mol. Genet. Genomics.* - 2009. - V. 281. - P. 421–435.
38. Bennett F.G.A. Resistance to powdery mildew in wheat. A review of its use in agriculture and breeding programs // *Plant Pathol.* - 1984. - V. 33. - P. 279–300.
39. Berkman P.J., Visendi P., Lee H.C., Stiller J., Manoli S., Lorenc M.T., Lai K., Batley J., Fleury D., Simková H., Kubaláková M., Weining S., Doležel J., Edwards D. Dispersion and domestication shaped the genome of bread wheat // *Plant Biotechnol. J.* - 2013. - V. 11. - № 5. - P. 564-571.
40. Bhullar R., Nagarajan R., Bennypaul H., Sidhu G.K., Sidhu G., Rustgi S., von Wettstein D., Gill K.S. Silencing of a metaphase I-specific gene results in a phenotype

- similar to that of the Pairing homeologous 1 (Ph1) gene mutations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2014. - V. 111. - № 39. - P. 14187-14192.
41. Binarova P., Dolezel J., Draber P., Heberle-Bors E., Strnad M., Bogre L. Treatment of *Vicia faba* root tip cells with specific inhibitors to cyclin dependent kinases leads to abnormal spindle formation // Plant J. - 1998. - V. 16. - P. 697–707.
 42. Birchler J. A., Yao H., Chudalayandi S., Vaiman D., Veitia R.A. Heterosis // Plant Cell. - 2010. - V. 22. - P. 2105–2112.
 43. Blanc G., Hokamp K., Wolfe K.H. A recent polyploidy superimposed on older largescale duplications in the *Arabidopsis* genome // Genome Res. - 2003. - V. 13. - P. 137–44.
 44. Boden S.A., Langridge P., Spangenberg G., Able J.A. *TaASY1* promotes homologous chromosome interactions and is affected by deletion of *Ph1* // Plant J. - 2009. - V. 57. - № 3. - P. 487-497.
 45. Boden S.A., Shadiac N., Tucker E.J., Langridge P., Able J.A. Expression and functional analysis of *TaASY1* during meiosis of bread wheat (*Triticum aestivum*) // BMC Mol. Biol. - 2007. - V. 8: 65. doi:10.1186/1471-2199-8-65
 46. Bolaños-Villegas P., Yang X., Wang H-J., Juan C-T., Chuang M-H., Makaroff C.A., Jauh G-Y. *Arabidopsis CHROMOSOME TRANSMISSION FIDELITY 7 (AtCTF7/ECO1)* is required for DNA repair, mitosis and meiosis // Plant J. - 2013. - V. 75. - P. 927–940.
 47. Bottley A., Koebner R.M.D. Variation for homoeologous gene silencing in hexaploid wheat // Plant J. - 2008. - V. 56. - P. 297–302.
 48. Bowers J.E., Chapman B.A., Rong J., Paterson A.H. Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events // Nature. - 2003. - V. 422. - № 6930. - P. 433-438.
 49. Brenchley R., Spannagl M., Pfeifer M., Barker G.L., D'Amore R., Allen A.M., McKenzie N., Kramer M., Kerhornou A., Bolser D., Kay S., Waite D., Trick M., Bancroft I., Gu Y., Huo N., Luo M.C., Sehgal S., Gill B., Kianian S., Anderson O., Kersey P., Dvorak J., McCombie W.R., Hall A., Mayer K.F., Edwards K.J., Bevan M.W., Hall N. Analysis of the bread wheat genome using whole—genome shotgun sequencing // Nature. - 2012. - V. 491. - P. 705–710.

50. Bretagnolle F., Thompson J.D. Gametes with somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants // *New Phytol.* - 1995. - V. 129. - P. 1–22.
51. Brochmann C., Brysting A.K., Alsos I.G., Borgen L., Grundt H.H., Scheen A-C., Elven R. Polyploidy in arctic plants // *Biol. J. Linn. Soc.* - 2004. - V. 82. - P. 521–536.
52. Brown R.C, Lemmon B.E. The cytoskeleton and the spatial control of cytokinesis in the plant life cycle // *Protoplasma.* - 2001. - V. 215. - P. 35–49.
53. Buggs R.J.A., Wendel J.F., Doyle J.J., Soltis D.E., Soltis P.S., Coate J.E. The legacy of diploid progenitors in allopolyploid gene expression patterns // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* - 2014. - V. 369. - № 1648: 20130354. doi: 10.1098/rstb.2013.0354
54. Cai X., Xu S.S. Meiosis-driven genome variation in plants // *Curr. Genomics.* – 2007. – V. 8. – P. 151-161.
55. Cai X., Xu S.S., Zhu X. Mechanism of haploidy-dependent meiotic cell division of polyploid wheat // *Chromosoma.* - 2010. - V. 119. - P. 275–285.
56. Chelaifa H., Monnier A., Ainouche M. Transcriptomic changes following recent natural hybridization and allopolyploidy in the salt marsh species *Spartina townsendii* and *Spartina anglica* (Poaceae) // *New Phytol.* - 2010. - V. 186. - P. 161–174.
57. Chelysheva L., Diallo S., Vezon D., Gendrot G., Vrielynck N., Belcram K., Rocques N., Márquez-Lema A., Bhatt A.M., Horlow C., Mercier R., Mézard C., Grelon M. AtREC8 and AtSCC3 are essential to the monopolar orientation of the kinetochores during meiosis // *J. Cell Sci.* - 2005. - V. 118. - P. 4621–4632.
58. Chen P.D., Tsujimoto H., Gill B.S. Transfer of Ph (I) genes promoting homoeologous pairing from *Triticum speltoides* to common wheat // *Theor. Appl. Genet.* - 1994. - V. 88. - № 1. - P. 97-101.
59. Chen Z.J. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids // *Annu. Rev. Plant Biol.* - 2007. - V. 58. - P. 377–406.
60. Chen Z.J. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor // *Trends Plant Sci.* - 2010. - V. 15. - P. 57–71.
61. Chen Z.J., Comai L., Pikaard C.S. Gene dosage and stochastic effects determine the severity and direction of uniparental ribosomal RNA gene silencing (nucleolar

- dominance) in *Arabidopsis* allopolyploids // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1998. - V. 95. - P. 14891–14896.
62. Chester M., Gallagher J.P., Symonds V.V., da Silva A.V.C., Mavrodiev E.V., Leitch A.R., Soltis P.S., Soltis D.E. Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (Asteraceae) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – V. 109. - № 4. - P. 1176-1181.
63. Comai L. The advantages and disadvantages of being polyploidy // Nat. Rev. Genet. - 2005. - V. 6. - P. 836–846.
64. Consiglio F., Carputo D., Monti L., Conicella C. Exploitation of genes affecting meiotic non-reduction and nuclear restitution: *Arabidopsis* as a model? // Sex Plant Reprod. - 2004. - V. 17. - P. 97–105.
65. Couteau F., Belzile F., Horlow C., Grandjean O., Vezon D., Doutriaux M.P. Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a *dmc1* mutant of *Arabidopsis* // Plant Cell. - 1999. - V. 11. - P. 1623–1634.
66. Cui L., Wall P.K., Leebens-Mack J.H., Lindsay B.G., Soltis D.E., Doyle J.J., Soltis P.S., Carlson J.E., Arumuganathan K., Barakat A., Albert V.A., Ma H., dePamphilis C.W. Widespread duplications throughout the history of flowering plants // Genome Res. - 2006. - V. 16. - P. 738–749.
67. d’Erfurth I., Cromer L., Jolivet S., Girard C., Horlow C., Sun Y., To J.P., Berchowitz L.E., Copenhaver G.P., Mercier R. The cyclin-A *CYCA1;2/TAM* is required for the meiosis I to meiosis II transition and cooperates with *OSD1* for the prophase to first meiotic division transition // PLoS Genet. - 2010. - V. 6: e1000989. www.plosgenetics.org
68. d’Erfurth I., Jolivet S., Froger N., Catrice O., Novatchkova M., Simon M., Jenczewski E., Mercier R. Mutations in *AtPS1* (*Arabidopsis thaliana* Parallel Spindle 1) lead to the production of diploid pollen grains // PLoS Genet. - 2008. - V. 4: e1000274. doi: 10.1371/journal.pgen.1000274.
69. d’Erfurth I., Jolivet S., Froger N., Catrice O., Novatchkova M., Mercier R. Turning meiosis into mitosis // PLoS Biol. - 2009. - V. 7. №6: e1000124. doi: 10.1371/journal.pbio.1000124
70. Darlington C.D. Recent Advances in Cytology. - Philadelphia: Blakiston, 1937. – 764 p.

71. de Keijzer J., Mulder B.M., Janson M.E. Microtubule networks for plant cell division // *Syst. Synth. Biol.* - 2014. - V. 8. - P. 187–194.
72. De Storme N., Copenhaver G.P., Geelen D. Production of diploid male gametes in *Arabidopsis* by cold-induced destabilization of postmeiotic radial microtubule arrays // *Plant Physiol.* – 2012. - V. 160. - P. 1808–1826.
73. De Storme N., Geelen D. Sexual polyploidization in plants - cytological mechanisms and molecular regulation // *New Phytol.* – 2013. - V. 198. - № 3. - P. 670-684.
74. De Storme N., Geelen D. The *Arabidopsis* mutant *jason* produces unreduced first division restitution male gametes through a parallel/fused spindle mechanism in meiosis II // *Plant Physiol.* - 2011. - V. 155. - P. 1403–1415.
75. Dhaliwal H.S., Johnson B.L. Diploidization and chromosomal pairing affinities in the tetraploid wheats and their putative amphiploid progenitor // *Theor. Appl. Genet.* - 1982. - V. 61. - № 2. - P. 117-123.
76. Efremova T.T., Maystrenko O.I., Arbuzova V.S., Laikova L.I., Panina G.M., Popova O.M., Berezova O.V. Effect of alien 5R(5A) chromosome substitution on ear-emergence time and winter hardiness in wheat-rye substitution lines // *Euphytica.* - 2006. - V. 151. - P. 145–153.
77. Eilam T., Anikster Y., Millet E., Manisterski J., Feldman M. Genome size in diploids, allopolyploids, and autopolyploids of Mediterranean Triticeae // *Journal of Botany.* – 2010. doi:10.1155/2010/341380
78. Eilam T., Anikster Y., Millet E., Manisterski J., Feldman M. Nuclear DNA amount and genome downsizing in natural and synthetic allopolyploids of the genera *Aegilops* and *Triticum* // *Genome.* - 2008. - V. 51. - № 8. - P. 616–627.
79. Erilova A., Brownfield L., Exner V., Rosa M., Twell D., Scheid O.M., Hennig L., Kohler C. Imprinting of the Polycomb group gene MEDEA serves as a ploidy sensor in *Arabidopsis* // *PLoS Genet.* - 2009. - V. 5: e1000663. doi: 10.1371/journal.pgen.1000663.
80. Falistocco E., Tosti N., Falcinelli M. Cytomixis in pollen mother cells of diploid *Dactylis*, one of the origins of 2n gametes // *Heredity.* - 1995. - V. 86. - P. 448-453.
81. Feldman M. The effect of chromosomes 5B, 5D, and 5A on chromosomal pairing in *Triticum aestivum* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1966. - V. 55. - № 1. - P. 447-453.

82. Feldman M., Levy A.A. Genome evolution due to allopolyploidization in wheat // *Genetics*. - 2012. - V. 192. - № 3. - P. 763–774.
83. Feldman M., Levy A.A. Genome evolution in allopolyploid wheat—a revolutionary reprogramming followed by gradual changes // *J. Genet. Genomics*. - 2009. - V. 36. - P. 511–518.
84. Feldman M., Liu B., Segal G., Abbo S., Levy A.A., Vega J.M. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes // *Genetics*. - 1997. - V. 147. - P. 1381–1387.
85. Filho B.R.A., Santos A.C.C., Souza F.H.D., Valls J.F.M., Pagliarini M.S. Complete asynapsis resulting in 2n pollen formation in *Paspalum jesuiticum* Parodi (Poaceae) // *Genet. Mol. Res.* - 2014. - V. 13. - № 1. - P. 255–261.
86. Flagel L.E., Wendel J.F., Udall J.A. Duplicate gene evolution, homoeologous recombination, and transcriptome characterization in allopolyploid cotton // *BMC Genomics*. - 2012. - V. 13: 302. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/302>
87. Francki M.G. Identification of Bilby, a diverged centromeric Ty1-copia retrotransposon family from cereal rye (*Secale cereale* L.) // *Genome*. - 2001. - V. 44. - P. 266–274.
88. Friebe B., Hatchett J.H., Sears R.G., Gill B.S. Transfer of Hessian fly resistance from 'Champon' rye to hexaploid wheat via a 2BS.2RL wheat-rye chromosome translocation // *Theor. Appl. Genet.* - 1990. - V. 79. - P. 385–389.
89. Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A., Gill B.S. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status // *Euphytica*. - 1996. - V. 91. - P. 59–87.
90. Fu D., Mason A.S., Xiao M., Yan H. Effects of genome structure variation, homeologous genes and repetitive DNA on polyploid crop research in the age of genomics // *Plant Sci.* - 2016. - V. 242. - P. 37–46.
91. Fukuda K., Sakamoto S. Cytological studies on unreduced male gamete formation on hybrids between tetraploid emmer wheats and *Aegilops squarrosa* L. // *Jpn. J. Breed.* - 1992. - V. 42. - P. 255–266.

92. Fukui K.N., Suzuki G., Lagudah E.S., Rahman S., Appels R., Yamamoto M., Mukai Y. Physical arrangement of retrotransposon-related repeats in centromeric regions of wheat // *Plant Cell Physiol.* - 2001. - V. 42. - P. 189–196.
93. Gaeta R.T., Pires J.C., Iniguez-Luy F., Leon E., Osborn T.C. Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype // *Plant Cell.* - 2007. - V. 19 - P. 3403-3417.
94. Garsmeur O., Schnable J.C., Almeida A., Jourda C., D'Hont A., Freeling M. Two evolutionarily distinct classes of paleopolyploidy // *Mol. Biol. Evol.* - 2013. - V. 31. - P. 448-454.
95. Gaut B.S. Patterns of chromosomal duplication in maize and their implications for comparative maps of the grasses // *Genome Res.* - 2001. - V. 11. - P. 55–66.
96. Ge X-H., Ding L., Li Z-Y. Nucleolar dominance and different genome behaviors in hybrids and allopolyploids // *Plant Cell Rep.* - 2013. - V. 32. - P. 1661–1673.
97. Giorgi B. A homoeologous pairing mutant isolated in *Triticum durum* cv Cappelli // *Mutat. Breed. Newslett.* - 1978. - V. 11. - P. 4–5.
98. Goldblatt P. Polyploidy in angiosperms: monocotyledons // *Polyploidy: Biological Relevance.* - N.Y.: Plenum Press, 1980. - P. 219–239.
99. Golubovskaya I., Avalkina N., Sheridan W.F. New insights into the role of the maize *ameiotic1* locus // *Genetics.* - 1997. - V. 147. - P. 1339–1350.
100. Golubovskaya I., Grebennikova Z.K., Avalkina N.A., Sheridan W.F. The role of the *ameiotic1* gene in the initiation of meiosis and in subsequent meiotic events in maize // *Genetics.* - 1993. - V. 135. - P. 1151–1166.
101. Golubovskaya I.N., Hamant O., Timofejeva L., Wang C.J., Braun D., Meeley R., Cande W.Z. Alleles of *afd1* dissect REC8 functions during meiotic prophase I // *J. Cell Sci.* - 2006. - V. 119. - P. 3306–3315.
102. Gómez-Rodríguez V.M., Rodríguez-Garay B., Barba-Gonzalez R. Meiotic restitution mechanisms involved in the formation of 2n pollen in *Agave tequilana* Weber and *Agave angustifolia* Haw // *Springerplus.* - 2012. - V. 1: 17. doi: 10.1186/2193-1801-1-17.
103. Grant D., Cregan P., Shoemaker R.C. Genome organization in dicots: genome duplication in *Arabidopsis* and synteny between soybean and *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. - V. 97. - P. 4168-4173.

104. Grant V. Plant speciation. - New York: Columbia Univ. Press, 1981. - 346 p.
105. Grant V. The origin of adaptations. - New York: Columbia Univ. Press, 1963. - 606 p.
106. Greer E., Martín A.C., Pendle A., Colas I., Jones A.M., Moore G., Shaw P. The *Ph1* locus suppresses Cdk2-type activity during premeiosis and meiosis in wheat // *Plant Cell*. - 2012. - V. 24. - № 1. - P. 152-162.
107. Grelon M., Vezon D., Gendrot G., Pelletier G. AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants // *EMBO J*. - 2001. - V. 20. - P. 589–600.
108. Griffiths S., Sharp R., Foote T.N., Bertin I., Wanous M., Reader S., Colas I., Moore G. Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat // *Nature*. - 2006. - V. 439. - № 7077. - P. 749-752.
109. Grover C.E., Gallagher J.P., Szadkowski E.P., Yoo M.J., Flagel L.E., Wendel J.F. Homoeolog expression bias and expression level dominance in allopolyploids // *New Phytol*. - 2012. - V. 196. - P. 966–971.
110. Gu Z., Steinmetz L.M., Gu X., Scharfe C., Davis R.W., Li W-H. Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations // *Nature*. - 2003. - V. 421. - P. 63–66.
111. Gutierrez-Caballero C., Cebollero L.R., Pendas A.M. Shugoshins: from protectors of cohesion to versatile adaptors at the centromere // *Trends Genet*. - 2012. - V. 28. - P. 351–360.
112. Hamant O., Golubovskaya I., Meeley R., Fiume E., Timofejeva L., Schleiffer A., Nasmyth K., Cande W.Z. A REC8-dependent plant Shugoshin is required for maintenance of centromeric cohesion during meiosis and has no mitotic functions // *Curr. Biol*. - 2005. - V. 15. - P. 948–954.
113. Han F., Fedak G., Guo W., Liu B. Rapid and repeatable elimination of a parental genome-specific DNA repeat (*pGc1R-1a*) in newly synthesized wheat allopolyploids // *Genetics*. - 2005. - V. 170. - P. 1239–1245.
114. Han F.P., Fedak G., Quillet T., Liu B. Rapid genomic exchanges in interspecific and intergeneric hybrids and allopolyploids of Triticeae // *Genome*. - 2003. - V. 46. - P. 716-723.
115. Han Y., Xin M., Huang K., Xu Y., Liu Z., Hu Z., Yao Y., Peng H., Ni Z., Sun Q. Altered expression of *TaRSL4* gene by genome interplay shapes root hair length in allopolyploid wheat // *New Phytol*. - 2015. doi: 10.1111/nph.13615

116. Hao M., Luo J., Zeng D., Zhang L., Ning S., Yuan Z., Yan Z., Zhang H., Zheng Y., Feuillet C., Choulet F., Yen Y., Zhang L., Liu D. QTug.sau-3B is a major quantitative trait locus for wheat hexaploidization // *G3 (Bethesda)*. - 2014. - V. 4. - P. 1943-1953.
117. Hauf S., Watanabe Y. Kinetochore orientation in mitosis and meiosis // *Cell*. - 2004. - V. 119. - P. 317–327.
118. Hegarty M.J., Barker G.L., Brennan A.C., Edwards K.J., Abbott R.J., Hiscock S.J. Changes to gene expression associated with hybrid speciation in plants: Further insights from transcriptomic studies in *Senecio* // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* - 2008. - V. 363. - P. 3055–3069.
119. Hegarty M.J., Barker G.L., Wilson I.D., Abbott R.J., Edwards K.J., Hiscock S.J. Transcriptome shock after interspecific hybridization in *Senecio* is ameliorated by genome duplication // *Curr. Biol.* - 2006. - V. 16. - P. 1652–1659.
120. Hegarty M.J., Batstone T.O.M., Barker G.L., Edwards K.J., Abbott R.J., Hiscock S.J. Nonadditive changes to cytosine methylation as a consequence of hybridization and genome duplication in *Senecio* (Asteraceae) // *Mol. Ecol.* - 2011. - V. 20. - P. 105–113.
121. Hegarty M.J., Hiscock S.J. Genomic clues to the evolutionary success of review polyploid plants // *Curr. Biol.* - 2008. - V. 18. - № 10. - P. R435–R444. doi: 10.1016/j.cub.2008.03.043
122. Hegarty M.J., Jones J.M., Wilson I.D., Barker G.L., Barker G.L., Coghill J.A., Sanchez-Baracaldo P., Liu G., Buggs R.J., Abbott R.J., Edwards K.J., Hiscock S.J. Development of anonymous cDNA microarrays to study changes to the *Senecio* floral transcriptome during hybrid speciation // *Mol. Ecol.* - 2005. - V. 14. - P. 2493–2510.
123. Heslop-Harrison J.S., Schwarzacher T. Domestication, genomics and the future for banana // *Ann. Bot.* - 2007. - V. 100. - № 5. - P. 1073-1084.
124. Heun M., Friebe B., Bushuk W. Chromosomal location of the powdery mildew resistance gene of Amigo wheat // *Phytopathology*. - 1990. - V. 80. - P. 1129–1133.
125. Houben A., Orford S.J., Timmis J.N. In Situ hybridization to plant tissues and chromosomes / *Methods in Molecular Biology*. - Totowa, NJ: Humana Press. - 2006. - V. 326. - P. 203–218.
126. Huang S., Sirikhachornkit A., Su X., Faris J., Gill B., Haselkorn R., Gornicki P. Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the

- Triticum/Aegilops complex and the evolutionary history of polyploid wheat // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2002. - V. 99. - P. 8133–8138.
127. Hulskamp M., Parekh N.S., Grini P., Schneitz K., Zimmermann I., Lolle S.J., Pruitt R.E. The STUD gene is required for male-specific cytokinesis after telophase II of meiosis in *Arabidopsis thaliana* // Dev. Biol. - 1997. - V. 187. - P. 114–124.
128. Islam A.K.M.R., Shepherd K.W. Incorporation of barley chromosomes into wheat // Biotechnology in Agriculture and Forestry. V. 13. Wheat. - Berlin: Springer-Verlag, 1990. - P. 128–151.
129. Islam A.K.M.R., Shepherd K.W. Meiotic restitution in wheat-barley hybrids // Chromosoma. - 1980. - V. 79. - P. 363-372.
130. Islam A.K.M.R., Shepherd K.W. Substituting ability of individual barley chromosomes for wheat chromosomes. 1. Substitutions involving barley chromosomes 1, 3 and 6 // Plant Breed. - 1992. - V. 109. - P. 141–150.
131. Iwata E., Ikeda S., Matsunaga S., Kurata M., Yoshioka Y., Criqui M.C., Genschik P., Ito M. GIGAS CELL1, a novel negative regulator of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome, is required for proper mitotic progression and cell fate determination in *Arabidopsis* // Plant Cell. - 2011. - V. 23. - P. 4382–4393.
132. Jackson S., Chen Z.J. Genomic and expression plasticity of polyploidy // Curr. Opin. Plant Biol. - 2010. - V. 13. - № 2. - P. 153-159.
133. Jakobsson M., Hagenblad J., Tavaré S., Sall T., Hallden C., LindHallden C., Nordborg M. A unique recent origin of the allotetraploid species *Arabidopsis suecica*: evidence from nuclear DNA markers // Mol. Biol. Evol. - 2006. – V. 23. – P. 1217–1231.
134. Jauhar P.P. Meiotic restitution in wheat polyhaploids (amphihaploids): a potent evolutionary force // Heredity. - 2007. - V. 98. - № 2. - P. 188–193.
135. Jauhar P.P., Dogramaci-Altuntepe M., Peterson T.S., Almouslem A.B. Seedset on synthetic haploids of durum wheat: cytological and molecular investigations // Crop Sci. - 2000. - V. 40. - P. 1742–1749.
136. Jenczewski E., Alix K. From diploids to allopolyploids: the emergence of efficient pairing control genes in plants // Critical Reviews in Plant Sciences. – 2004. – V. 23. - № 1. - P. 21–45.

137. Jenkins G., Phillips D., Mikhailova E.I., Timofejeva L., Jones R.N. Meiotic genes and proteins in cereals // *Cytogenet. Genome Res.* - 2008. - V. 120. - № 3-4. - P. 291-301.
138. Jiang J., Friebe B., Gill B.S. Recent advances in alien gene transfer in wheat // *Euphytica.* - 1994. - V. 73. - P. 199-212.
139. Jones N., Pasakinskien I. Genome conflict in the gramineae // *New Phytol.* - 2005. - V. 165. - P. 391–410.
140. Jones R.N., Hegarty M. Order out of chaos in the hybrid plant nucleus // *Cytogenet. Genome Res.* - 2009. - V. 126. - № 4. - P. 376-389.
141. Kashkush K., Feldman M., Levy A.A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid // *Genetics.* - 2002. - V. 160. - P. 1651–1659.
142. Kashkush K., Feldman M., Levy A.A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat // *Nat. Genet.* - 2003. - V. 33. - № 1. - P. 102-106.
143. Kaszas E., Cande W.Z. Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin // *J. Cell Sci.* - 2000. - V. 113. - P. 3217–3226.
144. Kattermann G. Dber konstante. halmbehaarte Stiimme aus Weizenroggenbastardierung mit $2n = 42$ Chromosomen // *Z. Induktive Abstammungs Vererbungslehre.* - 1938. - V. 74. - P. 354-375.
145. Kilian B., Ozkan H., Deusch O., Effgen S., Brandolini A., Kohl J., Martin W., Salamini F. Independent wheat B and G genome origins in outcrossing *Aegilops* progenitor haplotypes // *Mol. Biol. Evol.* - 2007. - V. 24. - P. 217-227.
146. Kim E.S., Bol'sheva N.L., Samatadze T.E., Nosov N.N., Nosova I.V., Zelenin A.V., Punina E.O., Muravenko O.V., Rodionov A.V. The unique genome of two-chromosome grasses *Zingeria* and *Colpodium*, its origin, and evolution // *Russian Journal of Genetics.* - 2009. - V. 45. - № 11. - P. 1329–1337.
147. Kimbara J., Endo T.R., Nasuda S. Characterization of the genes encoding for MAD2 homologues in wheat // *Chromosome Res.* - 2004. - V. 12. - P. 703–714.
148. Kitajima T.S., Kawashima S.A., Watanabe Y. Conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric from cohesion during meiosis // *Nature.* - 2004. - V. 427. - P. 510–517.

149. Kitajima T.S., Sakuno T., Ishiguro K., Iemura S., Natsume T., Kawashima S.A., Watanabe Y. Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesion // *Nature*. - 2006. - V. 441. - P. 46–52.
150. Knott D.R. Transferring alien genes to wheat // *Wheat and Wheat Improvement (second edition)*. - Madison, WI: American Society of Agronomy, 1987. - P. 462-471.
151. Koba T., Takumi S., Shimada T. Isolation, identification and characterization of disomic and translocated barley chromosome addition lines of common wheat // *Euphytica*. - 1997. - V. 96. - P. 289–296.
152. Koebner R.M.D., Shepherd K.W. Induction of recombination between rye chromosome 1RL and wheat chromosomes // *Theor. Appl. Genet.* - 1985. - V. 71. - P. 208-215.
153. Kuspira J., Unrau J. Genetic analyses of certain characters in common wheat using whole chromosome substitution lines // *Can. J. Plant Sci.* - 1957. - V. 37. - P. 300–326.
154. Lapitan N.L., Sears R.G., Gill B.S. Translocations and other karyotypic structural changes in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture // *Theor. Appl. Genet.* - 1984. - V. 68. - № 6. - P.547-454.
155. Lavania U.C., Srivastava S., Lavania S., Basu S., Misra N.K., Mukai Y. Autopolyploidy differentially influences body size in plants, but facilitates enhanced accumulation of secondary metabolites, causing increased cytosine methylation // *Plant J.* - 2012. - V. 71. - P. 539–549.
156. Law C.N., Worland A.J.W. Aneuploidy in wheat and its uses in genetic analysis // *Ann. Rep. Plant Breed. Inst.* - 1973. - V. 1972. P. 25-65.
157. Leach L.J., Belfield E.J., Jiang C., Brown C., Mithani A., Harberd N.P. Patterns of homoeologous gene expression shown by RNA sequencing in hexaploid bread wheat // *BMC Genomics*. - 2014. - V. 15: 276. doi: 10.1186/1471-2164-15-276.
158. Leach R.C., Dundas I.S. Single nucleotide polymorphic marker enabling rapid and early screening for the homoeolocus of β -amylase R1: a gene linked to copper efficiency on 5RL // *Theor. Appl. Genet.* - 2006. - V. 113. - P. 301–307.
159. Leitch A.R., Leitch I.J. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants // *Science*. - 2008. - V. 320. - № 5875. - P. 481-483.
160. Leitch I.J., Bennett M.D. Genome downsizing in polyploid plants // *Biol. J. Linn. Soc.* - 2004. - V. 82. - P. 651–663.

161. Levin D.A. The role of chromosomal change in plant evolution. - New York: Oxford University Press, 2002. – 230 p.
162. Levy A.A., Feldman M. Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization // *Bio. J. Linn. Soci.* - 2004. - V. 82. - № 4. - P. 607–613.
163. Li J., Harper L.C., Golubovskaya I., Wang C.R., Weber D., Meeley R.B., McElver J., Bowen B., Cande W.Z., Schnable P.S. Functional analysis of maize RAD51 in meiosis and double-strand break repair // *Genetics.* - 2007. - V. 176. - № 3. - P. 1469-1482.
164. Li W., Chen C., Markmann-Mulisch U., Timofejeva L., Schmelzer E., Ma H., Reiss B. The Arabidopsis *AtRAD51* gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2004. - V. 101. - P. 10596–10601.
165. Li X., Dawe R.K. Fused sister kinetochores initiate the reductional division in meiosis I // *Nat. Cell Biol.* - 2009. - V. 11. - P. 1103–1114.
166. Lim K.Y., Kovarik A., Matyasek R., Chase M.W., Clarkson J.J., Grandbastien M.A., Leitch A.R. Sequence of events leading to near-complete genome turnover in allopolyploid *Nicotiana* within five million years // *New Phytol.* - 2007. - V. 175. - P. 756–763.
167. Lim K.Y., Soltis D.E., Soltis P.S., Tate J., Matyasek R., Srubarova H., Kovarik A., Pires J.C., Xiong Z., Leitch A.R. Rapid chromosome evolution in recently formed polyploids in *Tragopogon* (Asteraceae) // *PLoS ONE.* – 2008. – V. 3. - № 10: e3353. doi: 10.1371/journal.pone.0003353
168. Lim K-B., Ramanna M.S., de Jong J.H., Jacobsen E., van Tuyl J.M. Indeterminate meiotic restitution (IMR): a novel type of meiotic nuclear restitution mechanism detected in interspecific lily hybrids by GISH // *Theor. Appl. Genet.* - 2001. - V. 103. - P. 219–230.
169. Lim K-B., Shen T-M., Barba-Gonzalez R., Ramanna M.S., Van Tuyl J.M. Occurrence of SDR 2N-gametes in *Lilium* Hybrids // *Breeding Science.* - 2004. - V. 54. - P. 13-18.
170. Lippman Z.B., Zamir D. Heterosis: revisiting the magic // *Trends Genet.* - 2007. - V. 23. - P. 60–66.

171. Liu B., Vega J.M., Feldman M. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. II. Changes in low-copy coding DNA sequences // *Genome*. - 1998b. - V. 41. - P. 535–542.
172. Liu B., Vega J.M., Segal G., Abbo S., Rodova M., Feldman M. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. I. Changes in low-copy noncoding DNA sequences // *Genome*. - 1998a. - V. 41. - P. 272-277.
173. Liu B., Wendel J.F. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids // *Mol. Phylogenet. Evol.* - 2003. - V. 29. - P. 365–379.
174. Liu C.J., Atkinson M.D., Chinoy C.N., Devos K.M., Gale M.D. Nonhomoeologous translocations between group 4, 5 and 7 chromosomes within wheat and rye // *Theor. Appl. Genet.* - 1992. - V. 83. - № 3. - P. 305-312.
175. Lukaszewski A.J., Rybka K., Korzun V., Malyshev S.V., Lapinski B., Whitkus R. Genetic and physical mapping of homoeologous recombination points involving wheat chromosome 2B and rye chromosome 2R // *Genome*. - 2004. - V. 47. - P. 36-45.
176. Luo M.C., Dubcovsky J., Dvořák J. Recognition of homeology by the wheat Ph1 locus // *Genetics*. - 1996. - V. 144. - № 3. - P. 1195-1203.
177. Lynch M. *The Origins of Genome Architecture*. – Sunderland, MA: Sinauer, 2007. – 494 p.
178. Lysak M.A., Koch M., Pecinka A., Schubert I. Chromosome triplication found across the tribe Brassiceae // *Genome Res.* – 2005. – V. 15. - P. 516–525.
179. Maan S.S., Sasakuma T. Fertility of amphihaploids in *Triticinae* // *Heredity*. - 1977. - V. 57. - P. 76-83.
180. Madlung A. Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools // *Heredity*. - 2013. - V. 110. - P. 99–104.
181. Madlung A., Tyagi A.P., Watson B., Jiang H., Kagochi T., Doerge R.W., Martienssen R., Comai L. Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids // *Plant J.* - 2005. - V. 41. - P. 221–230.
182. Madlung A., Wendel J.F. Genetic and epigenetic aspects of polyploid evolution in plants // *Cytogenet. Genome Res.* - 2013. - V. 140. - № 2-4. - P. 270-285.
183. Magnard J.L., Yang M., Chen Y.C., Leary M., McCormick S. The *Arabidopsis* gene *Tardy Asynchronous Meiosis* is required for the normal pace and synchrony of cell division during male meiosis // *Plant Physiol.* - 2001. - V. 127. - P. 1157–1166.

184. Manzanero S., Arana P., Puertas M.J., Houben A. The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis // *Chromosoma*. - 2000. - V. 109. - P. 308–317.
185. Marston A.L. Shugoshins: tension-sensitive pericentromeric adaptors safeguarding chromosome segregation // *Mol. Cell Biol.* - 2015. - V. 35. - P. 634–648.
186. Martin A.C., Shaw P., Phillips D., Reader S., Moore G. Licensing MLH1 sites for crossover during meiosis // *Nat. Commun.* - 2014. - V. 5: 4580. doi: 10.1038/ncomms5580.
187. Masoudi-Nejad A., Nasuda S., McIntosh R.A., Endo T.R. Transfer of rye chromosome segments to wheat by a gametocidal system // *Chromosome Res.* - 2002. - V. 10. - P. 349–357.
188. Matsuoka Y. Evolution of polyploid Triticum wheats under cultivation: the role of domestication, natural hybridization, and allopolyploid speciation in their diversification. // *Plant Cell Physiol.* - 2011. - V. 52. - P. 750-764.
189. Matsuoka Y., Nasuda S. Durum wheat as candidate for the unknown female progenitor of bread wheat: an empirical study with a highly fertile F₁ hybrid with *Aegilops tauschii* Coss. // *Theor. Appl. Genet.* - 2004. - V. 109. - P. 1710–1717.
190. Matsuoka Y., Nasuda S., Ashida Y., Nitta M., Tsujimoto H., Takumi S., Kawahara T. Genetic basis for spontaneous hybrid genome doubling during allopolyploid speciation of common wheat shown by natural variation analyses of the paternal species // *PLoS ONE*. - 2013. - V. 8. - № 8: e68310. doi: 10.1371/journal.pone.0068310.
191. Matthies H.J., Messina L.G., Namba R., Greer K.J., Walker M.Y., Hawley R.S. Mutations in the α -tubulin 67C gene specifically impair achiasmate segregation in *Drosophila melanogaster* // *J. Cell Biol.* - 1999. - V. 147. - P. 1137–1144.
192. Matzke M.A., Matzke A.J. Gene silencing in plants: relevance for genome evolution and the acquisition of genomic methylation patterns // *Novartis Found Symp.* - 1998. - V. 214. - P. 168-80.
193. Mayfield D., Chen Z.J., Pires J.C. Epigenetic regulation of flowering time in polyploids // *Curr. Opin. Plant Biol.* - 2011. - V. 14. - P. 174–178.
194. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge // *Science*. - 1984. - V. 226. - P. 792– 801.

195. McIntosh J.R., Molodtsov M.I., Ataullakhanov F.I. Biophysics of Mitosis // Q. Rev. Biophys. 2012. - V. 45. - № 2. - P. 147–207.
196. McIntosh R.A. The role of specific genes in breeding for durable stem rust resistance in wheat and triticale // Breeding strategies for resistance to the rust of wheat. – Mexico: CIMMYT, DF, 1988. - P. 1–9.
197. Mercier R., Armstrong S.J., Horlow C., Jackson N.P., Makaroff C.A., Vezon D., Pelletier G., Jones G.H., Franklin F.C. The meiotic protein SWI1 is required for axial element formation and recombination initiation in *Arabidopsis* // Development. - 2003. - V. 130. - № 14. - P. 3309-3318.
198. Mercier R., Vezon D., Bullier E., Motamayor J.C., Sellier A., Lefevre F., Pelletier G., Horlow C. SWITCH1 (SWI1): a novel protein required for the establishment of sister chromatid cohesion and for bivalent formation at meiosis // Genes Dev. - 2001.- V. 15. - P. 1859-1871.
199. Mok D.W.S., Peloquin S.J. The inheritance of three mechanisms of diplandroid ($2n$ pollen) formation in diploid potatoes // Heredity. - 1975. - V. 35. - P. 295–302.
200. Moore G., Shaw P. Improving the chances of finding the right partner // Curr. Opin. Genet. Dev. - 2009. - V. 19. - № 2. - P. 99-104.
201. Moore R.C., Purugganan M.D. The evolutionary dynamics of plant duplicate genes // Curr. Opin. Plant. Biol. - 2005. - V. 8. - P. 122–128.
202. Morrison J.W., Rajhathy T. Frequency of quadrivalents in autotetraploid plants // Nature. - 1960. - V. 187. - P. 528-530.
203. Motamayor J.C., Vezon D., Bajon C., Sauvanet A., Grandjean O., Marchand M., Bechtold N., Pelletier G., Horlow C. *Switch (swi1)*, an *Arabidopsis thaliana* mutant affected in the female meiotic switch // Sex. Plant. Reprod. - 2000. - V. 12. - P. 209–218.
204. Murat F., Pont C., Salse J. Paleogenomics in Triticeae for translational research // Curr. Plant Biol. - 2014. - V. 1. - P. 34–39.
205. Muravenko O.V., Fedotov A.R., Punina E.O., Fedorova L.I., Grif V.G., Zelenin A.V. Comparison of chromosome BrdU-Hoechst-Giemsa banding patterns of the A(1) and (AD)(2) genomes of cotton // Genome. - 1998. - V. 41. - P. 616–625.
206. Nannas N.J., Dawe R.K. Genetic and genomic toolbox of *Zea mays* // Genetics. - 2015. - V. 199. - № 3. - P. 655-669.

207. Naranjo T., Roca A., Goicoechea P.G. Giraldez R. Arm homoeology of wheat and rye chromosomes // *Genome*. - 1987. - V. 29. - P. 873-882.
208. Nasmyth K., Haering C.H. Cohesin: Its roles and mechanisms // *Annu. Rev. Genet.* - 2009. - V. 43. - P. 525 – 558.
209. O’Kane Jr. S.L., Schaal B.A., Al-Shehbaz I.A. The origins of *Arabidopsis suecica* (Brassicaceae) as indicated by nuclear rDNA sequences // *Syst. Bot.* – 1997. – V. 21. – P. 559–566.
210. Okamoto M. Asynaptic effect of chromosome V // *Wheat Inf. Serv.* - 1957. - V. 5. - P. 6.
211. Oleszczuk S., Lukaszewski A.J. The origin of unusual chromosome constitutions among newly formed allopolyploids // *Am. J. Bot.* - 2014. - V. 101. - P. 318–326.
212. Otto S. The evolutionary consequences of polyploidy // *Cell*. - 2007. - V. - 131. - P. 452–462.
213. Otto S.P., Whitton J. Polyploid incidence and evolution // *Annu. Rev. Genet.* – 2000. - V.34. - P. 401-437.
214. Ozkan H., Levy A.A., Feldman M. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group // *Plant Cell*. - 2001. - V. 13. - P. 1735-1747.
215. Ozkan H., Tuna M., Arumuganathan K. Nonadditive changes in genome size during allopolyploidization in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group // *Heredity*. - 2003. - V. 94. - № 3 - P. 260–264.
216. Parisod C., Holderegger R., Brochmann C. Evolutionary consequences of autopolyploidy // *New Phytol.* - 2010. - V. 186. - P. 5–17.
217. Parisod C., Salmon A., Zerjal T., Tenailon M., Grandbastien M.A., Ainouche M. Rapid structural and epigenetic reorganization near transposable elements in hybrid and allopolyploid genomes in *Spartina* // *New Phytol.* - 2009. - V. 184. - P. 1003–1015.
218. Paterson A.H., Wendel J.F., Gundlach H., Guo H., Jenkins J., Jin D., Llewellyn D., Showmaker K.C., Shu S., Udall J., Yoo M-j., Byers R., Chen W., Doron-Faigenboim A., Duke M.V., Gong L., Grimwood J., Grover C., Grupp K., Hu G., Lee T-h., Li J., Lin L., Liu T., Marler B.S., Page J.T., Roberts A.W., Romanel E., Sanders W.S., Szadkowski E., Tan X., Tang H., Xu C., Wang J., Wang Z., Zhang D., Zhang L., Ashrafi H., Bedon F., Bowers J.E., Brubaker C.L., Chee P.W., Das S., Gingle A.R., Haigler C.H., Harker D.,

- Hoffmann L.V., Hovav R., Jones D.C., Lemke C., Mansoor S., ur Rahman M., Rainville L.N., Rambani A., Reddy U.K., Rong J-k., Saranga Y., Scheffler B.E., Scheffler J.A., Stelly D.M., Triplett B.A., Deynze A.V., Vaslin M.F.S., Waghmare V.N., Walford S.A., Wright R.J., Zaki E.A., Zhang T., Dennis E.S., Mayer K.F.X., Peterson D.G., Rokhsar D.S., Wang X., Schmutz J. Repeated polyploidization of *Gossypium* genomes and the evolution of spinnable cotton fibres // *Nature*. - 2012. - V. 492. - P. 423–427.
219. Pawlowski W.P., Golubovskaya I.N., Timofejeva L., Meeley R.B., Sheridan W.F., Cande W.Z. Coordination of meiotic recombination, pairing, and synapsis by PHS1 // *Science*. - 2004. - V. 303. - P. 89–92.
220. Pawlowski W.P., Wang C-J.R., Golubovskaya I.N., Szymaniak J.M., Shi L., Hamant O., Zhu T., Harper L., Sheridan W.F., Cande W.Z. Maize AME10TIC1 is essential for multiple early meiotic processes and likely required for the initiation of meiosis // *PNAS*. - 2009. - V. 106. - № 9. - P. 3603–3608.
221. Peloquin S.J., Boiteux L.S., Carputo D. Meiotic mutants in potato: valuable variants // *Genetics*. - 1999. - V. 153. - P. 1493–1499.
222. Pershina L.A., Numerova O.M., Belova L.I., Devyatkina E.P. Biotechnological and cytogenetic aspects of producing new wheat genotypes using hybrids // *Euphytica*. - 1998. - V. 100. - № 1–3. - P. 239–244.
223. Pershina L.A., Numerova O.M., Belova L.I., Devyatkina E.P. Shumny V.K. Fertility in barley and wheat hybrids *Hordeum geniculatum* All. x *Triticum aestivum* L., their regenerants and hybrid progeny of backcrosses to *T. aestivum* L. // *Cereal Res. Comm.* - 1988. – V. 16. - P. 157-163.
224. Peto P., Boyes J. Comparison of diploid and triploid sugar beets // *Canad. J. Res.* - 1940. - V. 18. - P. 273-282.
225. Pfeifer M., Kugler K.G., Sandve S.R., Zhan B., Rudi H., Hvidsten T.R., Consortium IWGS., Mayer K.F.X., Olsen O-A. Genome interplay in the grain transcriptome of hexaploid bread wheat // *Science*. - 2014. - V. 345. - № 6194: 1250091. doi: 10.1126/science.1250091.
226. Pradillo M., López E., Linacero R., Romero C., Cuñado N., Sánchez-Morán E., et al. Together yes, but not coupled: new insights in to the roles of RAD51 and DMC1 in plant meiotic recombination // *Plant J.* - 2012. - V. 69. - P. 921–933.

227. Pumphrey M., Bai J., Laudencia-Chingcuanco D., Anderson O., Gill B.S. Nonadditive expression of homoeologous genes is established upon polyploidization in hexaploid wheat // *Genetics*. - 2009. - V. 181. - P. 1147–1157.
228. Qi L., Friebe B., Zhang P., Gill B.S. Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement // *Chromosome Research*. - 2007. - V. 15. - P. 3–19.
229. Rajaram S., Mann C.E., Ortis Ferrara G., Mujeeb-Kazi A. Adaptation, stability and high yield potential of certain 1B/1R CIMMYT wheats // *Proc. of Intern. Wheat Genet. Symp., Kyoto, Japan*. - 1983. - P. 613-621.
230. Ramanna M.S. A re-examination of the mechanisms of $2n$ gamete formation in potato and its implications for breeding // *Euphytica*. - 1979. - V. 28. - P. 537–561.
231. Ramanna M.S., Jacobsen E. Relevance of sexual polyploidization for crop improvement – A review // *Euphytica*. - 2003. - V. 133. - P. 3–18.
232. Ramsey J. Unreduced gametes and neopolyploids in natural populations of *Achillea borealis* (Asteraceae) // *Heredity*. – 2007. - V. 98. - P. 143–150.
233. Ramsey J., Schemske D.W. Neopolyploidy in flowering plants // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* - 2002. - V. 33. - P. 589–639.
234. Ramsey J., Schemske D.W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* - 1998. - V. 29. - P. 467–501.
235. Ranney T.G. Polyploidy: from evolution to new plant development // *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society*. - 2006. - V. 56. - P. 137-142.
236. Rausch J.H., Morgan M.T. The effect of self-fertilization, inbreeding depression, and population size on autopolyploid establishment // *Evolution*. - 2005. - V. 59. - P. 1867–1875.
237. Ravi M., Marimuthu M.P., Siddiqi I. Gamete formation without meiosis in *Arabidopsis* // *Nature*. - 2008. - V. 451. - № 7182. - P. 1121-1124.
238. Renny-Byfield S., Ainouche M., Leitch I.J., Lim K.Y., Le Comber S.C., Leitch A.R. Flow cytometry and GISH reveal mixed ploidy populations and *Spartina* nonaploids with genomes of *S. alterniflora* and *S. maritima* origin // *Ann. Bot.* – 2010. - V. 105. – № 4. – P. 527-533.
239. Renny-Byfield S., Kovarik A., Chester M., Nichols R.A., Macas J., Novak P., Leitch A.R. Independent, rapid and targeted loss of a highly repetitive DNA sequence

- derived from the paternal genome donor in natural and synthetic *Nicotiana tabacum* // PLoS ONE. - 2012. - V. 7: e36963. doi: 10.1371/journal.pone.0036963
240. Renny-Byfield S., Kovarik A., Kelly L.J., Macas J., Novak P., Chase M.W., Nichols R.A., Pancholi M.R., Grandbastien M-A., Leitch A.R. Diploidization and genome size change in allopolyploids is associated with differential dynamics of low- and high-copy sequences // Plant J. - 2013. - V. 74. - P. 829–839.
241. Renny-Byfield S., Wendel J.F. Doubling down on genomes: polyploidy and crop plants // Am. J. Bot. - 2014. - V. 101. - № 10. - P. 1711-1725.
242. Rhoades M.M., Dempsey E. Induction of chromosome doubling at meiosis by the elongate gene in maize // Genetics. - 1966. - V. 54. - P. 505–522.
243. Rieseberg L.H., Archer M.A., Wayne R.K. Transgressive segregation, adaptation and speciation // Heredity. - 1999. - V. 83. - P. 363–372.
244. Rieseberg L.H., Kim S-C., Randell R.A., Whitney K.D., Gross B.L., Lexer C., Clay K. Hybridization and the colonization of novel habitats by annual sunflowers // Genetica. - 2007. - V. 129. - P. 149–165.
245. Rieseberg L.H., Widmer A., Arntz A.M., Burke J.M. The genetic architecture necessary for transgressive segregation is common in both natural and domesticated populations // Phil. Trans. R. Soc. B. - 2003. - V. 358. - P. 1141–1147.
246. Riley R., Chapman V. Genetic control of cytologically diploid behavior of hexaploid wheat // Nature. - 1958. - V. 182. - P. 713-715.
247. Riley R., Chapman V., Young R.M., Belfield A.M. Control of meiotic chromosome pairing by the chromosomes of homoeologous group 5 of *Triticum aestivum* // Nature. - 1966. - V. 212. - P. 1475-1477.
248. Roder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat // Genetics. - 1998. - V. 149. - P. 2007–2023.
249. Rommel M. Cytogenetics of autotetraploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) Part I: Tetraploid varieties // Der Züchter. - 1965. - V. 35. - № 5. - P. 219-222.
250. Ronceret A., Doutriaux M.P., Golubovskaya I.N., Pawlowski W.P. PHS1 regulates meiotic recombination and homologous chromosome pairing by controlling the transport of RAD50 to the nucleus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2009. - V. 106. - P. 20121–20126.

251. Rosenberg O. Die Semiheterotypische Teilung und Ihre Bedeutung für die Entstehung verdoppelter Chromosomenzahlen // *Hereditas.* - 1927. - V. 8. - P. 305-358.
252. Ross K.J., Franz P., Armstrong S.J., Vizir I., Mulligan B., Franklin F.C.H., Jones G.H. Cytological characterization of four meiotic mutants of *Arabidopsis* isolated from T-DNA transformed lines // *Chromosome Res.* - 1997. - V. 5. - P. 551-559.
253. Rubiales D., Reader S.M., Martin A. Chromosomal localition of resistance to *Septoria tritici* in *Hordeum chilense* determined by the study of chromosomal addition and substitution lines in 'Chinese Spring' wheat // *Euphytica.* - 2000. - V. 115. - P. 221-224.
254. Rufas J.S., Santos J.L., Diez M., Suja J.A. Meiotic chromosome structure: relationship between the synaptonemal complex and the chromatid cores // *Genome.* - 1992. - V. 35. - P. 1054-1061.
255. Salina E.A., Adonina I.G., Badaeva E.D., Kroupin P.Y., Stasyuk A.I., Leonova I.N., Shishkina A.A., Divashuk M.G., Starikova E.V., Khuat T.M.L., Syukov V.V., Karlov G.I. A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases // *Euphytica.* - 2015. - V. 204. - № 1. - P. 91-101.
256. Salina E.A., Lim K.Y., Badaeva E.D., Shcherban A.B., Adonina I.G., Amosova A.V., Samatadze T.E., Vatolina T.Y., Zoshchuk S.A., Leitch A.R. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section *Sitopsis* and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids // *Genome.* - 2006. - V. 49. - № 8. - P. 1023-1035.
257. Salina E.A., Numerova O.M., Ozkan H., Feldman M. Alterations in subtelomeric tandem repeats during early stages of allopolyploidy in wheat // *Genome.* - 2004. - V. 47. - P. 860-867.
258. Salmon A., Flagel L., Ying B., Udall J.A., Wendel J.F. Homoeologous nonreciprocal recombination in polyploid cotton // *New Phytol.* - 2010. - V. 186. - P. 123-134.
259. Salse J., Chagué V., Bolot S., Magdelenat G., Huneau C., Pont C., Belcram H., Couloux A., Gardais S., Evrard A., Segurens B., Charles M., Ravel C., Samain S., Charmet G., Boudet N., Chalhou B. New insights into the origin of the B genome of hexaploid wheat: evolutionary relationships at the SPA genomic region with the S

- genome of the diploid relative *Aegilops speltoides* // BMC Genomics. - 2008. - V. 9: 555.
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/555>
260. Sears E.A. Nullisomic analysis in common wheat // Am. Nat. - 1953. - V. 87. - P. 245–252.
261. Sears E.R. An induced mutant with homoeologous pairing in common wheat // Can. J. Genet. Cytol. - 1977. - V. 19. - P. 585-593.
262. Sears E.R. Chromosome engineering in wheat // Stadler Symposia. Univ. Missouri, Columbia. - 1972. - V. 4. - P. 23–28.
263. Sears E.R. Genetic control of chromosome pairing in common wheat // Annu. Rev. Genet. - 1976. - V. 10. - P. 31–51.
264. Sears E.R. Misdivision of univalents in common wheat // Chromosoma. - 1952. - V. 4. - P. 535–550.
265. Sears E.R. The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat // Bookhaven Symp. Biol. - 1956. - V. 9. - P. 1-22.
266. Sears E.R. Transfer of alien genetic material to wheat // Wheat Science–Today and Tomorrow. - Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, 1981. - P. 75–89.
267. Sears E.R. Wheat cytogenetics // Annu. Rev. Genet. - 1969. – V. 3. - P. 451-468.
268. Sears E.R., Okamoto M. Intergenomic chromosome relationships in hexaploid wheat // Proceedings, 10th International Congress of Genetics, Montreal. - 1958. - P. 258-259.
269. Segui-simarro J.M., Austin II J.R., White E.A., Staehelin L.A. Electron tomographic analysis of somatic cell plate formation in meristematic cells of Arabidopsis preserved by high-pressure freezing // Plant Cell. - 2004. - V. 16. - № 4. - P. 836–856.
270. Shamina N.V., Silkova O.G., Seriukova E.G. Monopolar spindlers in meiosis of intergeneric cereal hybrids // Cell Biol. Int. - 2003. - V. 27. - P. 657–664.
271. Shao T., Tang D., Wang K., Wang M., Che L., Qin B., Yu H., Li M., Gu M., Cheng Z. OsREC8 is essential for chromatid cohesion and metaphase I monopolar orientation in rice meiosis // Plant Physiol. - 2011. - V. 156. - P. 1386-1396.
272. Shimada T., Inomata N., Okamoto M., Asami H. Telocentric chromosomes obtained from calluses of nulli-5B tetra-5D of Chinese Spring wheat // Wheat Inf. Serv. - 1974. - V. 39. - P. 11–12.

273. Siddiqi I., Ganesh G., Grossniklaus U., Subbiah V. The dyad gene is required for progression through female meiosis in *Arabidopsis* // *Development*. - 2000. - V. 127. - P. 197-207.
274. Sidhu G.K., Rustgi S., Shafqat M.N., von Wettstein D., Gill K.S. Fine structure mapping of a gene-rich region of wheat carrying Ph1, a suppressor of crossing over between homoeologous chromosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 2008. - V. 105. - № 15. - P. 5815-5820.
275. Silkova O.G., Adonina I.G., Krivosheina E.A., Shchapova A.I., Shumny V.K. Chromosome pairing in meiosis of partially fertile wheat/rye (ABDR) hybrids // *Plant Reproduction*. - 2013. - V. 26. - P. 33–41.
276. Silkova O.G., Shchapova A.I., Shumny V.K. Patterns of meiosis in ABDR amphihaploids depend on the specific type of univalent chromosome division // *Euphytica*. - 2011. - V. 178. - P. 415–426.
277. Silva N., Mendes-Bonato A.B., Sales J.G.C., Pagliarini M.S. Meiotic behavior and pollen viability in *Moringa oleifera* (Moringaceae) cultivated in southern Brazil // *Genet. Mol. Res.* - 2011. - V. 10. - № 3. - P. 1728-1732.
278. Singh M., Goel S., Meeley R.B., Dantec C., Parrinello H., Michaud C., Leblanc O., Grimanelli D. Production of viable gametes without meiosis in maize deficient for an ARGONAUTE protein // *Plant Cell*. - 2011. - V. 23. - № 2. - P. 443-458.
279. Smith E.L., Schlehner A.M., Young Jr. H.C. Edwards L.H. Registration of Agent wheat // *Crop Sci.* - 1968. - V. 8. - P. 511-512.
280. Soltis D.E., Albert V.A., Leebens-Mack J., Bell C.D., Paterson A.H., Zheng C., Sankoff D., Depamphilis C.W., Wall P.K., Soltis P.S. Polyploidy and angiosperm diversification // *Am. J. Bot.* - 2009. - V. 96. - № 1. - P. 336-348.
281. Soltis P.S., Soltis D.E. The role of hybridization in plant speciation // *Annu. Rev. Plant Biol.* - 2009. - V. 60. - P. 561-588.
282. Song Q., Chen Z.J. Epigenetic and developmental regulation in plant polyploids // *Curr. Opin. Plant Biol.* - 2015. - V. 24. - P. 101–109.
283. Soyano T., Nishihama R., Morikiyo K., Ishikawa M., Machida Y. NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis // *Genes. Dev.* - 2003. - V. 17. - № 8. - P. 1055-1067.

284. Spielman M., Preuss D., Li F.L., Browne W.E., Scott R.J., Dickinson H.G. TETRASPORE is required for male meiotic cytokinesis in *Arabidopsis thaliana* // Development. - 1997. - V. 124. - № 13. - P. 2645-2657.
285. Stack S.M., Anderson L.K. A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles // Chromosome Res. - 2001. - V. 9. - P. 175–198.
286. Stebbins G.L. Types of polyploids: their classification and significance // Adv. Genet. - 1947. - V. 1. - P. 403–429.
287. Stebbins G.L. Variation and Evolution in Plants. - New York: Columbia Univ. Press, 1950. - 166 p.
288. Stupar R.M., Hermanson P.J., Springer N.M. Nonadditive expression and parent-of-origin effects identified by microarray and allele-specific expression profiling of maize endosperm // Plant Physiol. - 2007. - V. 145. - P. 411–425.
289. Suja J., Rufas J. Chromatid cores in meiotic chromosome structure and segregation // Recombination and Meiosis. – Berlin: Springer-Verlag, 2007. - P. 31–56.
290. Tate J., Joshi P., Soltis K., Soltis P., Soltis D. On the road to diploidization? Homeolog loss in independently formed populations of the allopolyploid *Tragopogon miscellus* (Asteraceae) // BMC Plant Biol. - 2009. - V. 9: 80. doi: 10.1186/1471-2229-9-8
291. Tate J.A., Ni Z., Scheen A-C., Koh J., Gilbert C.A., Lefkowitz D., Chen Z.J., Soltis P.S., Soltis D.E. Evolution and expression of homeologous loci in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae), a recent and reciprocally formed allopolyploid // Genetics. - 2006. - V. 173. - P. 1599–1611.
292. Tayalé A., Parisod C. Natural pathways to polyploidy in plants and consequences for genome reorganization // Cytogenet. Genome Res. - 2013. doi: 10.1159/000351318
293. te Beest M., Le Roux J.J., Richardson D.M., Brysting A.K., Suda J., Kubesova M., Pysek P. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions // Annals of Botany. - 2012. - V. 109. P. 19–45.
294. Theurkauf W.E., Hawley R.S. Meiotic spindle assembly in *Drosophila* females: Behavior of nonexchange chromosomes and the effects of mutations in the nod kinesin-like protein // J. Cell Biol. - 1992. - V. 116. - P. 1167–1180.
295. Udall J.A., Wendel J.F. Polyploidy and crop improvement. The Plant Genome / A Supplement to Crop Science. - 2006. doi:10.2135/cropsci2006.07.0489tpg.

296. Uhlmann F., Lottspeich F., Nasmyth K. Sister chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1p // *Nature*. - 1999. - V. 400. - P. 37–42.
297. Vega J.M., Feldman M. Effect of the pairing gene Ph1 and premeiotic colchicine treatment on intra- and interchromosome pairing of isochromosomes in common wheat // *Genetics*. – 1998a. - V. 150. - № 3. - P. 1199-1208.
298. Vega J.M., Feldman M. Effect of the pairing gene Ph1 on centromere misdivision in common wheat // *Genetics*. – 1998b. - V. 148. - № 3. - P. 1285-1294.
299. Wagenaar E.B. Meiotic restitution and the origin of polyploidy. I. Influence of genotype on polyploid seedset in a *Triticum crassum* x *Triticum turgidum* hybrid // *Can. J. Genet. Cytol.* - 1968. - V. 10. - P. 836–843.
300. Wang J., Tian L., Lee H-S., Wei N.E., Jiang H., Watson B., Madlung A., Osborn T.C., Doerge R.W., Comai L., Chen Z.J. Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids // *Genetics*. - 2006. - V. 172. - P. 507–517.
301. Wang M., Wang K.J., Tang D., Wei C.X., Li M., Shen Y., Chi Z.C., Gu M.H., Cheng Z.K. The central element protein ZEP1 of the synaptonemal complex regulates the number of crossovers during meiosis in rice // *Plant Cell*. - 2010. - V. 22. - P. 417-430.
302. Wang Y., Magnard J.L., McCormick S., Yang M. Progression through meiosis I and meiosis II in *Arabidopsis* anthers is regulated by an A-type cyclin predominately expressed in prophase I // *Plant Physiol.* - 2004. - V. 136. - P. 4127–4135.
303. Wang Y., Wang X., Paterson A.H. Genome and gene duplications and gene expression divergence: a view from plants // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* - 2012. - V. 1256. - P. 1–14.
304. Wang Y.P., Cheng X., Shan Q.W., Zhang Y., Liu J.X., Gao C.X., Qiu J.L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew // *Nature Biotechnology*. - 2014. - V. 32. - P. 947–951.
305. Wendel J.F. New World cottons contain Old World cytoplasm // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. - 1989. - V. 86. - P. 4132-4136.
306. Werner J.E., Peloquin S.J. Frequency and mechanisms of 2n egg formation in haploid *Tuberosum*-wild species F₁ hybrids // *Am. Potato J.* - 1987 - V. 64. - P. 641–654.
307. Wicker T., Mayer K.F., Gundlach H., Martis M., Steuernagel B., Scholz U., Simková H., Kubaláková M., Choulet F., Taudien S., Platzer M., Feuillet C., Fahima T.,

- Budak H., Dolezel J., Keller B., Stein N. Frequent gene movement and pseudogene evolution is common to the large and complex genomes of wheat, barley, and their relatives // *Plant Cell*. - 2011. - V. 23. - № 5. - P. 1706-1718.
308. Wijnker E., Schnittger A. Control of the meiotic cell division program in plants // *Plant Reprod.* - 2013. - V. 26. - P. 143–158.
309. Xiong Z., Gaeta R.T., Pires J.C. Homoeologous shuffling and chromosome compensation maintain genome balance in resynthesized allopolyploid *Brassica napus* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. - 2011. - V. 108. - P. 7908–7913.
310. Xu S.J., Joppa L.R. First division restitution in hybrids of Langdon durum disomic substitution lines with rye and *Aegilops squarrosa* // *Plant Breed.* - 2000. - V. 119. - P. 233–241.
311. Xu S.J., Joppa L.R. Mechanisms and inheritance of first division restitution in hybrids of wheat, rye, and *Aegilops squarrosa* // *Genome*. - 1995. - V. 38. - P. 607–615.
312. Yang C., Zhao L., Zhang H., Yang Z., Wang H., Wen S., Zhang C., Rustgi S., von Wettstein D., Liu B. Evolution of physiological responses to salt stress in hexaploid wheat // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. - 2014. - V. 111. - P. 11882–11887.
313. Yang C-Y., Spielman M., Coles J.P., Li Y., Ghelani S., Bourdon V., Brown R.C., Lemmon B.E., Scott R.J., Dickinson H.G. TERTASPORE encodes a kinesin required for male meiotic cytokinesis in *Arabidopsis* // *Plant J.* - 2003. - V. 34. - P. 229–240.
314. Yousafzai F.K., Al-Kaff N., Moore G. Structural and functional relationship between the *Phl* locus protein 5B2 in wheat and CDK2 in mammals // *Funct. Integr. Genomics*. - 2010. - V. 10. - P. 157–166.
315. Zamariola L., De Storme N., Tiang C.L., Armstrong S.J., Franklin F.C., Geelen D. SGO1 but not SGO2 is required for maintenance of centromere cohesion in *Arabidopsis thaliana* meiosis // *Plant Reprod.* - 2013. - V. 26. - P. 197 – 208.
316. Zamariola L., Tiang C.L., De Storme N., Pawlowski W., Geelen D. Chromosome segregation in plant meiosis // *Front. Plant Sci.* - 2014 - V. 5: 279 doi: 10.3389/fpls.2014.00279.
317. Zeller F.J., Hsam S.L.K. Broadening the genetic variability of cultivated wheat by utilizing rye chromatin // *Proc. 6th Int. Wheat Genet. Symp. Kyoto, Japan*. - 1984. - P. 161–173.

318. Zeller F.S. 1B/1R wheat-rye chromosome substitutions and translocations // Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp., Mo. Agric. Stn. Columbia, MO. - 1973. - P. 209.
319. Zeng Q., Chen J.G., Ellis B.E. AtMPK4 is required for male-specific meiotic cytokinesis in Arabidopsis // Plant J. - 2011. - V. 67. - № 5. - P. 895-906.
320. Zhang H., Bian Y., Gou X., Dong Y., Rustgi S., Zhang B., Xu C., Li N., Qi B., Han F., von Wettstein D., Liu B. Intrinsic karyotype stability and gene copy number variations may have laid the foundation for tetraploid wheat formation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 2013a. - V. 110. - P. 19466–19471.
321. Zhang H., Bian Y., Gou X., Zhu B., Xu C., Qi B., Li N., Rustgi S., Zhou H., Han F., Jiang J., von Wettstein D., Liu B. Persistent whole-chromosome aneuploidy is generally associated with nascent allohexaploid wheat // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 2013b. - V. 110. - P. 3447–3452.
322. Zhang L., Chen Q., Yuan Z., Xiang Z., Zheng Y., Liu D. Production of aneuploid and euploid sporocytes by meiotic restitution in fertile hybrids between durum wheat Langdon chromosome substitution lines and *Aegilops tauschii* // J. Genet. Genomics. - 2008. - V. 35. - P. 617–623.
323. Zhang L., Yen Y., Zheng Y., Liu D. Meiotic restriction in emmer wheat is controlled by one or more nuclear genes that continue to function in derived line // Sex. Plant Reprod. - 2007. - V. 20. - P. 159-166.
324. Zhang P., Wanlong L., Fellers J., Friebe B., Gill B.S. BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements // Chromosoma. - 2004. - V. 112. - P. 288–299.
325. Zhang Y., Xu G.H., Guo X.Y., Fan L.J. Two ancient rounds of polyploidy in rice genome // J. Zhejiang Univ. Sci. B. - 2005. - V. 6. - № 2. - P. 87-90.
326. Zhao C., Cui F., Wang X., Shan S., Li X., Bao Y., Wang H. Effects of 1BL/1RS translocation in wheat on agronomic performance and quality characteristics // Field Crops Research. - 2012. - V. 127. - P. 79–84.
327. Zhou R., Moshgabadi N., Adams K.L. Extensive changes to alternative splicing patterns following allopolyploidy in natural and resynthesized polyploids // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2011. - V. 108. - P. 16122–16127.
328. Zhu C., Dixit R. Functions of the Arabidopsis kinesin superfamily of microtubule-based motor proteins // Protoplasma. - 2012. - V. 249. - P. 887–899.