ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ
Оригинальное исследование / Original article
УДК 576.354.422.4:599.735.52

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):254-260
DOI 10.18699/VJ19.502

Синапсис, рекомбинация и эпигенетическая модификация хромосом у баранов, гетерозиготных по метацентрической хромосоме 3 домашней овцы *Ovis aries* и акроцентрическим гомологам архара *Ovis ammon*

Т.И. Бикчурина[1, 2, 3], Е.К. Томгорова[3], А.А. Торгашева[1, 2, 3], В.А. Багиров[3], Н.А. Волкова[3], П.М. Бородин[1, 2, 3] ✉

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
[3] Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Дубровицы, Россия
✉ e-mail: borodin@bionet.nsc.ru

Гибридизация пород домашних животных с их дикими сородичами может служить перспективным методом повышения генетического разнообразия сельскохозяйственных животных. Ресурсные популяции, полученные на основе гибридизации различных пород домашних овец с муфлоном и архаром, являются важным источником селекционного материала. Кариотипы архара и домашней овцы различаются по робертсоновской транслокации, возникшей у общего предка муфлона и овец (*Ovis aries*) за счет центрического слияния хромосом 5 и 11 архара (*O. ammon*) с образованием хромосомы 3 овцы. Известно, что гетерозиготность по транслокациям может приводить к нарушениям синапсиса, рекомбинации и сегрегации хромосом в мейозе. Особенности протекания мейоза у баранов, гетерозиготных по транслокации, различающей кариотипы овец и архаров, до сих пор не исследованы. Мы изучали синапсис, рекомбинацию и эпигенетическую модификацию хромосом, вовлеченных в данную перестройку у гетерозигот, с использованием иммунолокализации ключевых белков мейоза. В большинстве клеток наблюдался полный синапсис между метацентрической хромосомой овцы и двумя акроцентрическими хромосомами архара с образованием тривалента. В небольшой доле клеток на стадии ранней пахитены наблюдалась задержка синапсиса в перицентромерных районах тривалента. Неспаренные участки подвергались эпигенетической модификации: фосфорилированию гистона H2A.X. Однако к концу пахитены эти нарушения полностью устранялись. Асинапсис замещался негомологичным синапсисом между перицентромерными районами акроцентрических хромосом. К концу пахитены сигнал γH2A.X сохранялся только на половом биваленте и отсутствовал на триваленте. По числу и распределению рекомбинационных сайтов, степени центромерной и кроссоверной интерференции транслокационный тривалент не отличался от нормальных бивалентов метацентрических хромосом. Таким образом, установлено, что гетерозиготность по хромосоме 3 домашней овцы и хромосомам 5 и 11 архара не вызывает существенных изменений в ключевых процессах профазы I мейоза и, следовательно, не должна приводить к снижению плодовитости у потомков от межвидовой гибридизации овец.
Ключевые слова: *Ovis aries*; иммуноокрашивание; мейоз; синаптонемные комплексы; рекомбинация; робертсоновские транслокации.

Для цитирования: Бикчурина Т.И., Томгорова Е.К., Торгашева А.А., Багиров В.А., Волкова Н.А., Бородин П.М. Синапсис, рекомбинация и эпигенетическая модификация хромосом у баранов, гетерозиготных по метацентрической хромосоме 3 домашней овцы *Ovis aries* и акроцентрическим гомологам архара *Ovis ammon*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):254-260. DOI 10.18699/VJ19.502

Chromosome synapsis, recombination and epigenetic modification in rams heterozygous for metacentric chromosome 3 of the domestic sheep *Ovis aries* and acrocentric homologs of the argali *Ovis ammon*

T.I. Bikchurina[1, 2, 3], E.K. Tomgorova[3], A.A. Torgasheva[1, 2, 3], V.A. Bagirov[3], N.A. Volkova[3], P.M. Borodin[1, 2, 3] ✉

[1] Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
[3] Federal Scientific Center for Animal Husbandry – VIZH named after academician L.K. Ernst, Dubrovitsy, Russia
✉ e-mail: borodin@bionet.nsc.ru

Hybridization of domestic animal breeds with their wild relatives is a promising method for increasing the genetic diversity of farm animals. Resource populations derived from the hybridization of various breeds of domestic sheep with mouflon and argali are an important source of breeding material. The karyotypes of argali and domestic sheep differ for a Robertsonian translocation, which occurred in the common ancestor of mouflon and domestic sheep (*Ovis aries*) due to the centric fusion of chromosomes 5 and 11 of the argali (*O. ammon*) into chromosome 3 of sheep. It is known that heterozygosity for translocation can lead to synapsis, recombination and chromosome segregation abnormalities in meiosis. Meiosis in

© Бикчурина Т.И., Томгорова Е.К., Торгашева А.А., Багиров В.А., Волкова Н.А., Бородин П.М., 2019

the heterozygotes for translocation that distinguishes the karyotypes of sheep and argali has not yet been studied. We examined synapsis, recombination, and epigenetic modification of chromosomes involved in this rearrangement in heterozygous rams using immunolocalization of key proteins of meiosis. In the majority of cells, we observed complete synapsis between the sheep metacentric chromosome and two argali acrocentric chromosomes with the formation of a trivalent. In a small proportion of cells at the early pachytene stage, we observed delayed synapsis in pericentromeric regions of the trivalent. Unpaired sites were subjected to epigenetic modification, namely histone H2A.X phosphorylation. However, by the end of the pachytene, these abnormalities had been completely eliminated. Asynapsis was replaced by a nonhomologous synapsis between the centromeric regions of the acrocentric chromosomes. By the end of the pachytene, the γH2A.X signal had been preserved only at the XY bivalent and was absent from the trivalent. The translocation trivalent did not differ from the normal bivalents of metacentric chromosomes for the number and distribution of recombination sites as well as for the degree of centromeric and crossover interference. Thus, we found that heterozygosity for the domestic sheep chromosome 3 and argali chromosomes 5 and 11 does not cause significant alterations in key processes of prophase I meiosis and, therefore, should not lead to a decrease in fertility of the offspring from interspecific sheep hybridization.
Key words: Ovis aries; immunostaining; meiosis; synaptonemal complex; recombination; Robertsonian translocation.

For citation: Bikchurina T.I., Tomgorova E.K., Torgasheva A.A., Bagirov V.A., Volkova N.A., Borodin P.M. Chromosome synapsis, recombination and epigenetic modification in rams heterozygous for metacentric chromosome 3 of the domestic sheep *Ovis aries* and acrocentric homologs of the argali *Ovis ammon*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):254-260. DOI 10.18699/VJ19.502

Введение

Гибридизация пород домашних животных с их дикими сородичами может служить перспективным методом повышения генетического разнообразия сельскохозяйственных животных, внесения в их геном факторов устойчивости к заболеваниям и неблагоприятным факторам внешней среды (Серебровский, 1935). Этот подход используется в селекции овец. Ресурсные популяции, полученные от гибридов различных пород домашних овец (*Ovis aries*: OAR) с муфлоном (*O. orientalis*) и архаром (*O. ammon*: OAM), являются источником ценных аллелей и аллельных комбинаций для последующей селекции (Deniskova et al., 2016).

При этом следует учитывать, что кариотип архара содержит две пары метацентрических хромосом ($2n = 56$), а кариотипы муфлона и домашней овцы – три пары метацентриков ($2n = 54$). Различия в диплоидном числе хромосом обусловлены робертсоновской транслокацией, возникшей у общего предка муфлона и овец за счет слияния между центромерами хромосом 5 и 11 архара (OAM5 и OAM11) с образованием хромосомы 3 овцы (OAR3): rob(OAM5;11) (Bunch et al., 1998). Здесь и далее для хромосом архара мы используем стандартную номенклатуру хромосом Bovidae (Popescu et al., 1996). Теоретически гетерозиготность по робертсоновским транслокациям должна приводить к значительным нарушения мейоза и снижению плодовитости. Нарушения мейоза могут возникать за счет пространственной сложности пресинаптического выравнивания и последующего синапсиса между метацентрическим и акроцентрическими гомологами (Borodin et al., 1998). Задержка синапсиса может вести к транскрипционной инактивации неспаренного хроматина, апоптозу и гибели генеративных клеток (Burgoyne, Mahadevaiah, 1993; Burgoyne et al., 2009). Даже в случае успешного синапсиса и нормальной рекомбинации нерасхождение хромосом, вовлеченных в тривалент, должно вести к образованию несбалансированных гамет и снижению плодовитости гетерозигот (Garagna et al., 2014).

Несмотря на это, робертсоновские транслокации являются самым распространенным вариантом эволюционных хромосомных перестроек среди млекопитающих; по ним часто наблюдаются различия между близкими видами (Ferguson-Smith, Trifonov, 2007). Полиморфизм по робертсоновским транслокациям довольно широко распространен в популяциях многих видов (Dobigny et al., 2017), в том числе внутри пород домашних овец (Broad et al., 1997). Это объясняется относительной нейтральностью такого типа перестроек. Они, как правило, не вызывают фенотипических эффектов. У простых гетерозигот, несущих метацентрическую хромосому и две гомологичные акроцентрические хромосомы, в большинстве случаев плодовитость не снижается. Более того, она остается нормальной даже в случае простой гетерозиготности по нескольким робертсоновским транслокациям (Bruère, Ellis, 1979; Dobigny et al., 2017). Снижение фертильности чаще всего обнаруживается у сложных гетерозигот по нескольким робертсоновским транслокациям, вовлекающим одни и те же плечи хромосом: гибридов с монобрахиальной гомологией (Medarde et al., 2015).

У домашних овец существует внутривидовой полиморфизм по пяти робертсоновским транслокациям: rob(6;24), rob(9;10), rob(7;25), rob(5;8) и rob(8;22) (Broad et al., 1997). Электронно-микроскопический анализ синаптонемных комплексов (СК) у самцов, гетерозиготных по транслокациям rob(6;24), rob(9,10) и rob(7;25), выявил относительно высокую частоту клеток с задержанным синапсисом в тривалентах, образованных метацентрической хромосомой и двумя акроцентрическими гомологами. Обнаружены также ассоциации между неспаренными перицентромерными районами акроцентрических элементов тривалентов и половым бивалентом (Dai et al., 1994a, b). При этом было показано, что простые гетерозиготы по одной или нескольким этим транслокациям хотя и имеют несколько повышенный уровень нерасхождения хромосом, тем не менее сохраняют нормальную плодовитость (Bruère, Ellis, 1979).

Особенности протекания мейоза у баранов, гетерозиготных по транслокации rob(OAM5;11), до сих пор не исследованы. Анализ мейоза представляется важным в свете проводимых в настоящее время экспериментов по созданию ресурсных популяций на основе гибридов различных пород домашних овец с муфлоном и архаром (Deniskova et al., 2016).

В данной работе мы исследовали синапсис, рекомбинацию и эпигенетическую модификацию хромосом,

вовлеченных в транслокацию, с использованием иммунолокализации ключевых белков мейоза. Боковые элементы синаптонемного комплекса визуализировали с использованием антител к белку SYCP3. Эпигенетические модификации районов, содержащих не репарированные двунитевые разрывы ДНК, детектировали антителами к фосфорилированной форме гистона H2A.X (γH2A.X) (Rogakou et al., 1998). Оценивались число и распределение по хромосомам рекомбинационных узелков, меченных антителами к MLH1, белку мисматч-репарации (Anderson et al., 1999). Известно, что глобальное распределение рекомбинационных событий по хромосомам зависит в основном от размера хромосомы и центромерно-теломерного градиента (Kleckner et al., 2003). Локальные особенности генетического состава хромосом определяют позиции горячих точек рекомбинации в пределах 1–2 тыс. пар оснований и не вносят значительного вклада в хромосомный паттерн рекомбинации (Lichten, Goldman, 1995). У большинства исследованных видов позвоночных выявлены районы вблизи теломер с большим числом обменов, так называемые дистальные пики рекомбинации (Ruiz-Herrera et al., 2017). Кроме того, на распределение сайтов кроссинговера влияет центромерная интерференция (подавление рекомбинации вблизи центромеры) и кроссоверная интерференция (снижение вероятности возникновения нового кроссинговера в определенной окрестности уже возникшего) (Zickler, Kleckner, 2015). Чем больше расстояние между соседними точками рекомбинации, тем сильнее интерференция. В литературе имеются ограниченные данные по числу и распределению сайтов MLH1 у домашних и диких видов овец (Muñoz-Fuentes et al., 2015; Ruiz-Herrera et al., 2017). Представляет особый интерес изучение этих характеристик у гетерозигот по транслокации rob(OAM5;11).

Материалы и методы

Препараты мейотических хромосом готовили из семенников половозрелых баранов в возрасте 6–9 месяцев, разводимых в экспериментальном хозяйстве ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста. Два барана, гетерозиготных по rob(OAM5;11), были получены в результате скрещиваний, показанных на рис. 1. В качестве представителей стандартного кариотипа использовали трех баранов романовской породы.

Семенники были выделены в ходе плановой кастрации. Содержание, анестезия и кастрация проводились в соответствии с международными и национальными правилами гуманного обращения с животными по протоколу, одобренному Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (протокол № 35 от 16.10.2016).

Препараты синаптонемных комплексов готовили по методике (Peters et al., 1997), с изменениями. Выделенные семенники освобождали от оболочки, и небольшой фрагмент семенника размером около 0.5 см^3 помещали в гипотонический экстракционный буфер (30 мМ Трис, 50 мМ сахарозы, 17 мМ цитрата натрия, 5 мМ ЭДТА, pH 8.2) на 90–110 мин. Затем семенные канальцы мацерировали в 40 мкл раствора 0.1 М сахарозы при pH 8.2. Остатки канальцев удаляли. Суспензию тестикулярных клеток ресуспендировали несколько раз и порциями по

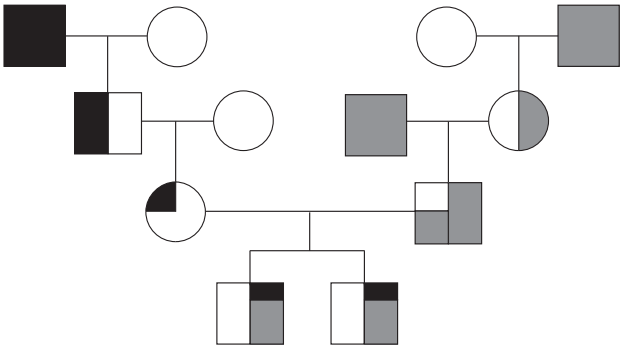

Рис. 1. Родословная гетерозигот по rob(OAM5;11).

Квадратами обозначены самцы, кругами – самки, черным цветом – геномы архара, серым – муфлона, белым – романовской овцы.

20 мкл наносили на предметные стекла, смоченные в 1 % растворе параформальдегида, распределяя по поверхности наклоном стекла. Затем препарат оставляли сушиться во влажной камере в течение 2 ч. Препараты промывали в 0.4 % Kodak PhotoFlo, высушивали и хранили до окрашивания в герметичных контейнерах при –20 °C.

Иммуноокрашивание препаратов распластанных мейотических хромосом проводили по методу (Anderson et al., 1999), с модификациями. На препараты наносили 400 мкл 10 % PBT (PBS – фосфатно-солевой буфер, 0.05 % Tween 20, 3 % BSA (Sigma-Aldrich, США)) для блокирования неспецифичного связывания антител и выдерживали при комнатной температуре в течение 45 мин. Затем инкубировали препараты 12 ч при 37 °C с первичными антителами. В зависимости от задачи были использованы: поликлональные антитела кролика к белку SYCP3 человека (Abcam, Великобритания) при разведении 1 : 500; моноклональные антитела мыши к белку MLH1 человека (Pharmingen, США) при разведении 1 : 30; поликлональные антитела кролика к белку γH2A.X человека (Abcam) при разведении 1 : 150; антитела человека к белкам центромеры человека (Sigma-Aldrich) при разведении 1 : 70 в PBT. Препараты отмывали три раза по 15 мин в PBS с 0.1 % Tween 20 и инкубировали 60 мин при 37 °C со следующими вторичными антителами, которые использовали в различных комбинациях: антителами осла к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с флуоресцентной меткой Cy3 (Jackson Laboratories, США) в разведении 1 : 500; антителами козы к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с флуоресцентной меткой FITC (Jackson Laboratories) в разведении 1 : 30; антителами козы к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с флуоресцентной меткой FITC (Jackson Laboratories) в разведении 1 : 150, и антителами козы к иммуноглобулинам человека, конъюгированными с флуоресцентной меткой AMCA (Vector Laboratories) в разведении 1 : 50. Препараты отмывали в PBS, высушивали, наносили 15 мкл раствора антифэйда (Vectashield; Vector Laboratories) для предотвращения гашения флуоресценции и накрывали покровным стеклом.

Микроскопический анализ проводили в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Препараты анализирова-

ли на микроскопе Axioplan 2 (ZEISS, Германия), снабженном CCD-видеокамерой (CV M300, JAI Corporation, Япония), набором комплектов фильтров CHROMA и программным обеспечением для обработки изображений ISIS4 (MetaSystems GmbH, Германия). Яркость и контраст изображений редактировали с помощью пакета Corel PaintShop Photo Pro X3.

Проанализировано 93 сперматоцита у представителей нормального кариотипа и 101 сперматоцит у гетерозигот по транслокации. Для этого были отобраны клетки на стадии пахитены, в которых все аутосомные биваленты стандартного кариотипа *O. aries* полностью синаптированы. Измерение длин хромосом и относительного положения сайтов MLH1 производили при помощи программы MicroMeasure 3.3 (Reeves, 2001).

Для анализа распределения сайтов MLH1 вдоль хромосом рассчитывали абсолютное положение каждого сигнала MLH1, умножая относительное положение каждого сигнала на абсолютную длину соответствующего хромосомного плеча, усредненного для всех метацентриков. При построении рекомбинационной карты хромосомные плечи были разделены на равные интервалы, соответствующие 1 мкм, и для каждого интервала подсчитана доля расположенных на нем сигналов MLH1 от общего числа сигналов на данной хромосоме во всех клетках.

Тестирование влияния гетерозиготности по хромосомной перестройке на рекомбинационные характеристики хромосом проводили с использованием ANOVA, статистические тесты – с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft). Средние значения длин СК и числа сайтов MLH1 приведены со стандартными отклонениями (±SD).

Результаты

Кариотип пахитенных клеток баранов романовской породы содержал три крупных метацентрических бивалента, неотличимых друг от друга, 23 акроцентрических бивалента, образующих непрерывный ряд по убыванию длины, и половой бивалент (рис. 2, *а*). Пахитенные сперматоциты гетерозигот по робертсоновской транслокации содержали два метацентрических

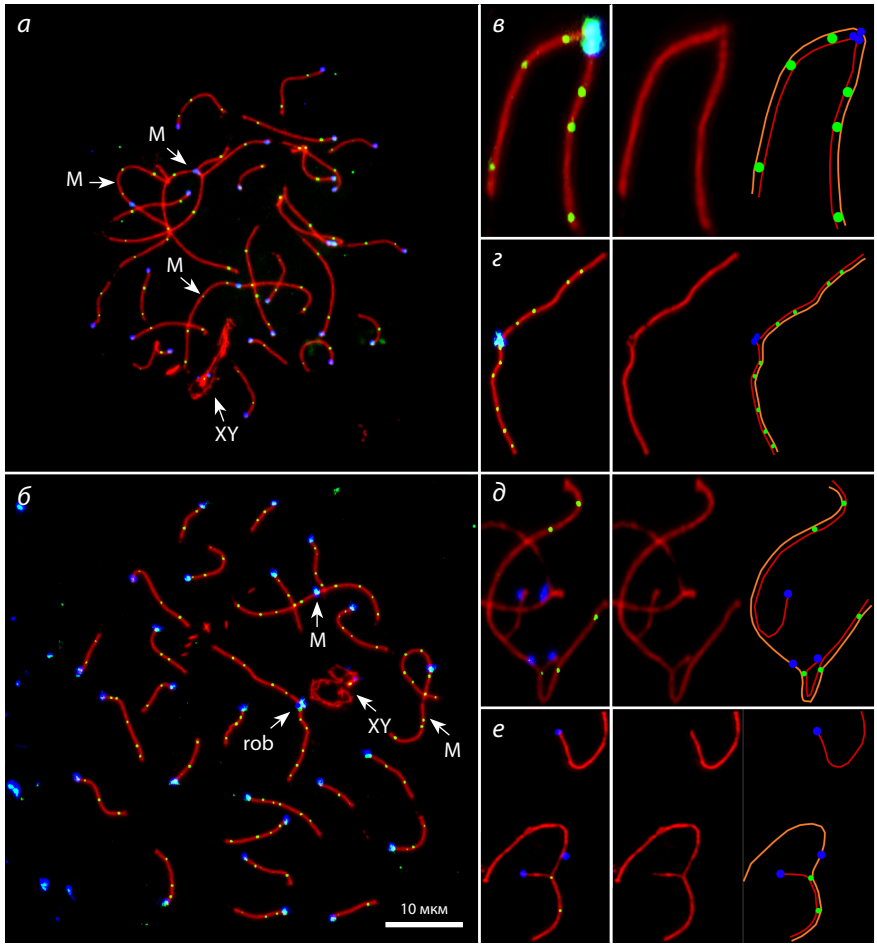

Рис. 2. Сперматоциты баранов романовской породы (*а*), гетерозигот по rob(OAM5;11) (*б*) и увеличенные изображения различных синаптических конфигураций робертсоновского тривалента (*в–е*).

в – тривалент полностью синаптирован; *г* – перицентромерные районы акроцентриков синаптированы с образованием бокового плеча; *д* – перицентромерный район тривалента частично асинаптирован; *е* – один из акроцентриков в триваленте полностью асинаптирован. В первой колонке совмещены три цветных канала, во второй представлен только красный канал, в третьей – схематичное изображение тривалента. Красный сигнал – SYCP3, зеленый – MLH1, синий – центромера. M – метацентрический бивалент, rob – робертсоновский тривалент, XY – половой бивалент.

бивалента и тривалент, образованный хромосомой 3 овцы и акроцентрическими гомологами архара (см. рис. 2, *б*). По средней длине СК триваленты не отличались от бивалентов двух других метацентрических хромосом у гетерозигот ($t = 0.87$, $p = 0.38$), но были достоверно короче бивалентов всех трех метацентрических хромосом в нормальном кариотипе ($t = 5.36$, $p < 0.001$) (см. таблицу). Поэтому в дальнейшем анализе мы сравнивали рекомбинационные характеристики транслокационного тривалента с объединенными данными по бивалентам двух метацентрических хромосом у гетерозигот.

На рис. 2, *в–е* представлены разные варианты синаптических конфигураций, обнаруженных у гетерозигот. Наиболее частым был вариант с практически полным спариванием между метацентрической хромосомой 3 и ее акроцентрическими гомологами (см. рис. 2, *в*). Иногда центромеры акроцентриков накладывались друг на друга, образуя маленькое боковое плечо (*г*). Асинапсис перицентромерных районов одного или обоих акроцентриков встречался в 5.0±2.2 % клеток (*д*). Средний размер неспаренного участка составлял 24.2±14.3 %. В одном случае мы наблюдали полный асинапсис более длинного акроцентрика (*е*).

Иммунолокализация фосфорилированной формы гистона H2A.X (γH2A.X) позволила нам визуализировать районы, содержащие нерепарированные двунитевые разрывы ДНК (рис. 3). На стадии лептотены такие районы были

Рекомбинационные характеристики хромосом 1–3 у баранов стандартного кариотипа (+/+) и хромосом 1–2 и 3 у гетерозигот по rob(OAM5;11) (+/rob)

Хромосомы	Число исследованных хромосом	Длина синаптонемного комплекса, мкм	Число сайтов MLH1	Отн. расстояние между соседними сайтами MLH1 (доля длины хромосомы)	Доля сайтов MLH1 в перицентромерных районах*, %
1–3 (+/+)	279	35.8 ± 8.4	5.7 ± 1.2	0.18 ± 0.01	6.9 ± 0.6
1–2 (+/rob)	202	31.6 ± 8.3	6.0 ± 1.4	0.17 ± 0.01	5.8 ± 0.7
3 (+/rob)	101	30.7 ± 7.8	6.2 ± 1.4	0.16 ± 0.01	4.8 ± 0.9

* На расстоянии ± 2 мкм от центромеры.

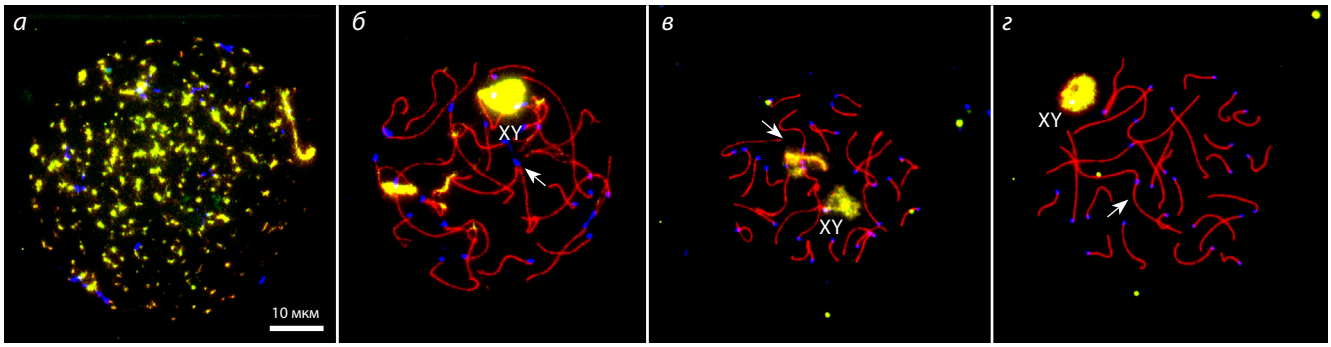

Рис. 3. Сперматоциты баранов, гетерозиготных по rob(OAM5;11) на разных стадиях профазы I.

а – сперматоцит на стадии лептотены, сигналы γH2A.X наблюдаются вдоль фрагментов боковых элементов СК; *б* – сперматоцит на стадии ранней пахитены, сигнал γH2A.X локализован на асинаптированных участках аутосом и половом биваленте и отсутствует на полностью синаптированном триваленте; *в* – сперматоцит на стадии средней пахитены, облака сигнала γH2A.X расположены на асинаптированных участках тривалента и половом биваленте; *г* – сперматоцит на стадии поздней пахитены, сигнал γH2A.X локализован только на половом биваленте. Стрелки указывают на тривалент с транслокацией. XY – половой бивалент. Красный сигнал – SYCP3, желтый – γH2A.X, синий – центромера.

многочисленны и присутствовали на всех хромосомах (см. рис. 3, *а*). В ранней пахитене мы наблюдали сигналы γH2A.X на неспаренных участках аутосом, в том числе и на асинаптированных участках акроцентрических элементов транслокационного тривалента, если их синапсис не успевал завершиться к тому времени (см. рис. 3, *б*). В редких случаях эпигенетической модификации подвергалось все плечо тривалента, включая его синаптированную часть (см. рис. 3, *в*). К концу пахитены сигнал γH2A.X сохранялся только на половом биваленте и отсутствовал на триваленте (см. рис. 3, *г*).

Визуализация рекомбинационных узелков с использованием антител к белку MLH1 (см. рис. 2) позволила оценить число кроссинговеров на интересующих нас хромосомах. Мы не обнаружили различий по среднему числу локусов MLH1 между робертсоновским тривалентом и бивалентами двух других метацентрических хромосом у гетерозигот по rob(OAM5;11) ($t = 1.33$, $p = 0.18$), тогда как биваленты трех метацентрических хромосом, включая хромосому 3, у нормальных гомозигот имели в среднем меньшее число локусов MLH1 ($t = 3.59$, $p < 0.001$).

Распределение сайтов MLH1 по хромосоме 3 в составе транслокационного тривалента было относительно равномерным и сходным с распределением, наблюдаемым на бивалентах метацентрических хромосом 1–2 у гетерозигот по хромосоме 3 и на бивалентах хромосом 1–3 у нормальных бивалентов (рис. 4). В отличие от хромосом многих других млекопитающих (Ruiz-Herrera et al., 2017), метацентрические хромосомы баранов не имели выраженных пиков в дистальных районах хромосом. Частота сайтов MLH1 в перицентромерных районах тривалента и нормальных бивалентах была снижена лишь в коротком (1–2 мкм) интервале. При этом мы не наблюдали достоверных отличий по доле сайтов MLH1 в перицентромерных районах ($p > 0.05$) между робертсоновским тривалентом и двумя метацентрическими бивалентами (см. таблицу). Не обнаружено также различий между тривалентом и бивалентами в степени выраженности кроссоверной интерференции: среднее расстояние между соседними сайтами MLH1 было практически одинаковым (см. таблицу).

Обсуждение

Мы установили, что гетерозиготы по rob(OAM5;11) характеризуются задержанным синапсисом робертсоновского тривалента в небольшой доле пахитенных сперматоцитов. Сходное явление было обнаружено при электронно-микроскопических исследованиях сперматоцитов баранов, гетерозиготных по rob(6;24), rob(9ж10) и rob(7;25) (Dai et al., 1994a, b). В цитированных работах процентное содержание аномальных сперматоцитов было выше, чем в нашем эксперименте. У носителей данных транслокаций отмечалась достаточно высокая доля ассоциаций между асинаптированными районами тривалента и половым бивалентом. Мы не наблюдали таких ассоциаций. Эти различия в синапсисе тривалентов у гетерозигот по транслокациям, полиморфным внутри вида, и транслокациям, различающим разные виды, обусловлены методическими различиями и/или особенностями хромосом, вовлеченных в эти транслокации.

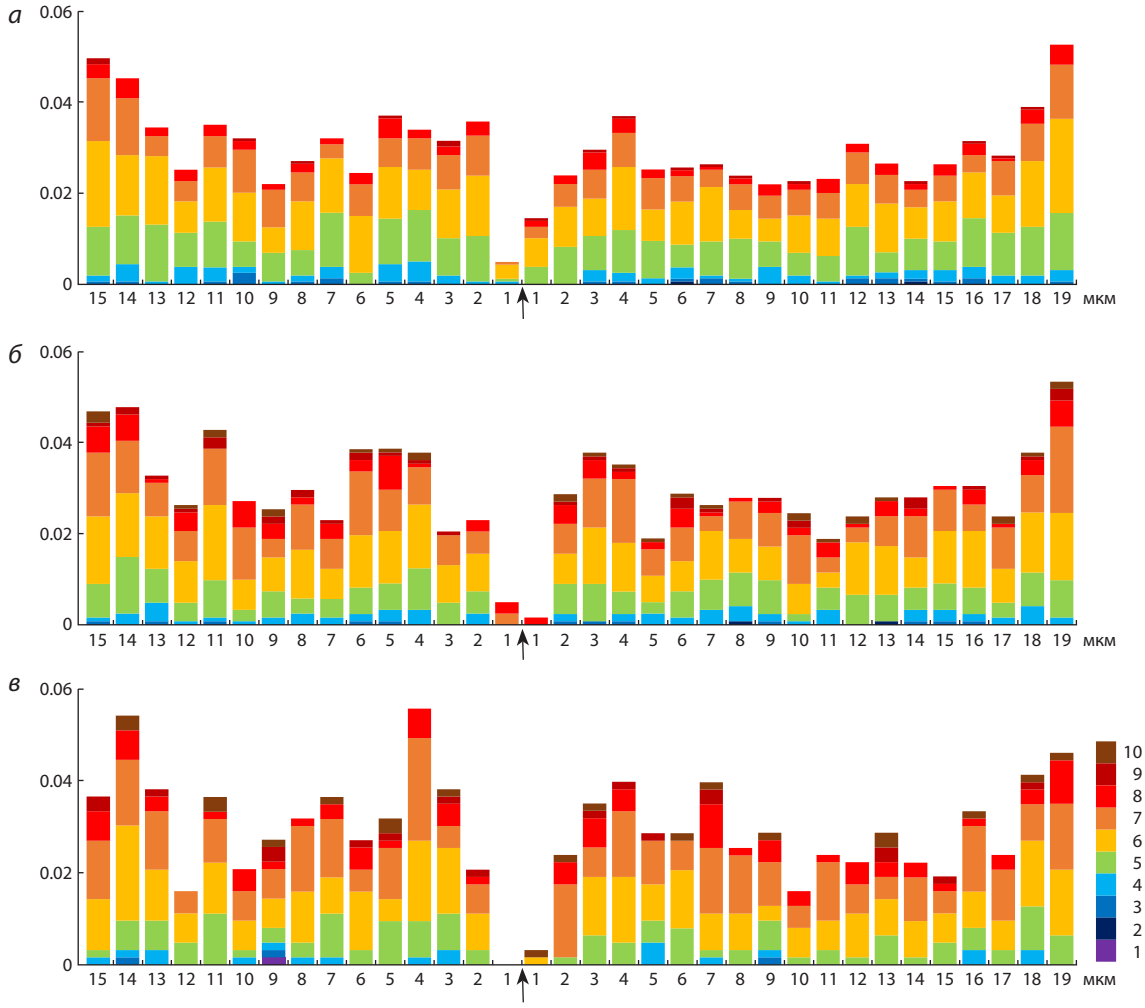

Рис. 4. Распределение сайтов MLH1 на бивалентах хромосом 1–3 у нормальных гомозигот (*а*), на бивалентах хромосом 1–2 (*б*) и на триваленте хромосомы 3 (*в*) у гетерозигот по транслокации.

По оси *X* показана позиция сайтов MLH1 на хромосоме по отношению к центромере (обозначена стрелкой), по оси *Y* – доля сайтов MLH1 в каждом интервале. Цветовая шкала (от 1 до 10) отражает частоту тривалентов и бивалентов с разным числом сайтов MLH1 в пределах каждого интервала.

Задержка синапсиса в перицентромерном районе транслокационного бивалента приводила к задержке в репарации двунитевых разрывов ДНК, которая, в свою очередь, вызывала эпигенетическую модификацию этого района: фосфорилирование гистона H2A.X по серину 139. Обычно такая модификация неспаренного хроматина приводит к транскрипционной инактивации генов, локализованных в модифицированных районах (Burgoyne et al., 2009; Turner, 2015). Если подобные события и происходили в пахитенных сперматоцитах баранов, гетерозиготных по транслокации, то они затрагивали лишь небольшую долю клеток. При этом следует учесть, что перицентромерные районы хромосомы, как правило, обогащены повторенными последовательностями и содержат мало генов. Поэтому маловероятно, что инактивация таких районов приведет к гибели клеток. Кроме того, в сперматоцитах на стадии поздней пахитены мы не наблюдали ни асинаптических участков, ни сигналов эпигенетической модификации. Скорее всего, асинапсис в таких клетках замещался негомологичным синапсисом, а модификация хроматина оказывалась обратимой. Не исключена вероятность, что клетки с задержанным синапсисом элиминировались раньше и не достигали пахитены. Однако даже если такая элиминация и происходила, она затрагивала лишь небольшую долю клеток и не должна была сказаться на плодовитости гетерозигот.

Число и распределение кроссинговеров на бивалентах нормальных метацентрических хромосом и на хромосоме 3 в транслокационном триваленте были сходны. Довольно распространенным эффектом гетерозиготности по робертсоновским транслокациям является дистализация распределения кроссинговеров вдоль плеч вовлеченных хромосом (Dumas, Britton-Davidian, 2002; Borodin et al., 2008; Dumas et al., 2015). Мы не обнаружили этого явления у баранов, гетерозиготных по rob(OAM5;11). Центромерная интерференция у них была не более выражена, чем у гомозигот по остальным метацентрическим хромосомам. В ряде случае обмены возникали в непосредственной близости от центромеры (см. рис. 2, *в*, *д* и рис. 4). По уровню кроссоверной интерференции триваленты по транслокации также не отличались от нормальных бивалентов. Нормальная рекомбинация в робертсоновском

триваленте гарантирует нормальную сегрегацию хромосом и делает маловероятным образование несбалансированных гамет.

Заключение

Таким образом, нами установлено, что гетерозиготность по хромосоме 3 домашней овцы и хромосомам 5 и 11 архара не вызывает существенных изменений в ключевых этапах мейоза и, следовательно, не должна приводить к снижению плодовитости у потомков от межвидовой гибридизации овец.

Список литературы / References

Серебровский А.С. Гибридизация животных. М.; Л.: Биомедгиз, 1935.
[Serebrovsky A.S. Hybridization of Animals. Moscow; Leningrad: Biomedgiz Publ., 1935. (in Russian)]

Anderson L.K. Reeves A., Webb L.M., Ashley T. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. Genetics. 1999;151:1569-1579.

Borodin P.M., Karamysheva T.V., Belonogova N.M., Torgasheva A.A., Rubtsov N.B., Searle J.B. Recombination map of the common shrew, *Sorex araneus* (Eulipotyphla, Mammalia). Genetics. 2008;178:621-632. DOI 10.1534/genetics.107.079665.

Borodin P.M., Rogatcheva M.B., Zhelezova A.I., Oda S. Chromosome pairing in inter-racial hybrids of the house musk shrew (*Suncus murinus*, Insectivora, Soricidae). Genome. 1998;41:79-90.

Broad T., Hayes H., Long S. Cytogenetics: Physical Chromosome Maps. In: Piper L., Ruvinsky A. (Eds.). The Genetics of Sheep. Wallingford, UK: CAB International, 1997.

Bruère A., Ellis P. Cytogenetics and reproduction of sheep with multiple centric fusions (Robertsonian translocations). J. Reprod. Fert. 1979;57(2):363-375.

Bunch T.D., Vorontsov N.N., Lyapunova E.A., Hoffmann R.S. Chromosome number of Severtzov's sheep (*Ovis ammon severtzovi*): G-banded karyotype comparisons within ovis. J. Hered. 1998;89:266-269.

Burgoyne P.S., Mahadevaiah S.K. Unpaired sex chromosomes and gametogenic failure. Chromosomes Today. 1993;11:243-263. DOI 10.1159/000133268.

Burgoyne P.S., Mahadevaiah S.K., Turner J.M. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. Nat. Rev. Genet. 2009;10:207-216. DOI 10.1038/nrg2505.

Dai K., Gillies C.B., Dollin A.E. Synaptonemal complex analysis of domestic sheep (*Ovis aries*) with Robertsonian translocations. II. Trivalent and pairing abnormalities in Massey I and Massey II heterozygotes. Genome. 1994a;37:679-689.

Dai K., Gillies C.B., Dollin A.E. Synaptonemal complex analysis of domestic sheep (*Ovis aries*) with Robertsonian translocations. III. Deficient pairing and NOR role in Massey III heterozygotes. Genome. 1994b;37:802-808.

Deniskova T.E., Sermyagin A.A., Bagirov V.A., Okhlopkov I.M., Gladyr E.A., Ivanov R.V., Brem G., Zinovieva N.A. Comparative analysis of the effectiveness of STR and SNP markers for intraspecific and interspecific differentiation of the genus Ovis. Russ. J. Genet. 2016; 52:79-84. DOI 10.1134/S1022795416010026.

Dobigny G., Britton-Davidian J., Robinson T.J. Chromosomal polymorphism in mammals: an evolutionary perspective. Biol. Rev. 2017;92(1):1-21. DOI 10.1111/brv.12213.

Dumas D., Britton-Davidian J. Chromosomal rearrangements and evolution of recombination: comparison of chiasma distribution patterns in standard and robertsonian populations of the house mouse. Genetics. 2002;162:1355-1366.

Dumas D., Catalan J., Britton-Davidian J. Reduced recombination patterns in Robertsonian hybrids between chromosomal races of the house mouse: chiasma analyses. Heredity (Edinb). 2015;114:56-64. DOI 10.1038/hdy.2014.69.

Ferguson-Smith M.A., Trifonov V. Mammalian karyotype evolution. Nat. Rev. Genet. 2007;8:950-962. DOI 10.1038/nrg2199.

Garagna S., Page J., Fernandez-Donoso R., Zuccotti M., Searle J.B. The Robertsonian phenomenon in the house mouse: mutation, meiosis and speciation. Chromosoma. 2014;123:529-544. DOI 10.1007/s00412-014-0477-6.

Kleckner N., Storlazzi A., Zickler D. Coordinate variation in meiotic pachytene SC length and total crossover/chiasma frequency under conditions of constant DNA length. Trends Genet. 2003;19:623-628. DOI 10.1016/j.tig.2003.09.004.

Lichten M., Goldman A.S. Meiotic recombination hotspots. Annu. Rev. Genet. 1995;29:423. DOI 10.1146/annurev.ge.29.120195.002231.

Medarde N., Merico V., López-Fuster M.J., Zuccotti M., Garagna S., Ventura J. Impact of the number of Robertsonian chromosomes on germ cell death in wild male house mice. Chromosome Res. 2015;23:159-169. DOI 10.1007/s10577-014-9442-8.

Muñoz-Fuentes V., Marcet-Ortega M., Alkorta-Aranburu G., Linde Forsberg C., Morrell J.M., Manzano-Piedras E., Söderberg A., Daniel K., Villalba A., Toth A., Di Rienzo A., Roig I., Vilà C. Strong artificial selection in domestic mammals did not result in an increased recombination rate. Mol. Biol. Evol. 2015;32:510-523. DOI 10.1093/molbev/msu322.

Peters A.H., Plug A.W., van Vugt M.J., de Boer P. A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. Chromosome Res. 1997;5:66-68.

Popescu C.P., Long S., Riggs P., Womack J., Schmutz S., Fries R., Gallagher D.S. Standardization of cattle karyotype nomenclature: Report of the committee for the standardization of the cattle karyotype. Cytogenet. Genome Res. 1996;74: 259-261. DOI 10.1159/000134429.

Reeves A. MicroMeasure: a new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. Genome. 2001;44:439-443.

Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J. Biol. Chem. 1998;273:5858-5868.

Ruiz-Herrera A., Vozdova M., Fernández J., Sebestova H., Capilla L., Frohlich J., Vara C., Hernández-Marsal A., Sipek J., Robinson T.J., Rubes J. Recombination correlates with synaptonemal complex length and chromatin loop size in bovids – insights into mammalian meiotic chromosomal organization. Chromosoma. 2017;126(5):615-631. DOI 10.1007/s00412-016-0624-3.

Turner J.M.A. Meiotic silencing in mammals. Annu. Rev. Genet. 2015; 49:395-412. DOI 10.1146/annurev-genet-112414-055145.

Zickler D., Kleckner N. Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2015;7(6): a016626. DOI 10.1101/cshperspect.a016626.

ORCID ID
T.I. Bikchurina orcid.org/0000-0003-0921-7970
E.K. Tomgorova orcid.org/0000-0001-5398-8815
A.A. Torgasheva orcid.org/0000-0002-8933-8336
V.A. Bagirov orcid.org/0000-0001-5398-8815
N.A. Volkova orcid.org/0000-0001-7191-3550
P.M. Borodin orcid.org/0000-0002-6717-844X

Благодарности. Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 18-16-00079. Мы благодарим Центр коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/) за предоставление микроскопической техники.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 21.11.2018. После доработки 24.12.2018. Принята к публикации 05.01.2019.