

## ГЕНЕТИКА

УДК 576.316:599.323.4

**СК-КАРИОТИПИРОВАНИЕ НА ОСНОВЕ  
ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОГО АНАЛИЗА  
СПЕРМАТОЦИТОВ ЛИСИЦ (*VULPES FULVUS*)****Л.Д. Сафронова<sup>1</sup>, Е.Г. Сергеев<sup>2</sup>, М.А. Монахова***(кафедра генетики; e-mail:safronova@sevin.ru)*

В данном исследовании представлен электронно-микроскопический (ЭМ) анализ синаптонемного комплекса (СК) сперматоцитов самцов серебристо-черных лисиц (*Vulpes fulvus*) на стадии пахитены и описание СК-кариотипа. Впервые проведено кариотипирование мейотических клеток (пахитенных сперматоцитов). Знание нормального СК-кариотипа необходимо для выявления нарушения синапсиса аутосомных и половых бивалентов в течение пахитены. Показано, что ЭМ анализ СК сперматоцитов — исследование синаптонемного комплекса у сельскохозяйственных животных — является очень хорошим инструментом для проведения сравнительного анализа нормального СК-кариотипа лисиц с носителями аномалий хромосом, в том числе и у пушных зверей.

**Ключевые слова:** цитогенетика лисицы (*Vulpes fulvus*), мейоз, электронная микроскопия, синаптонемный комплекс, сперматогенез.

Цитогенетический анализ у животных до недавнего времени основывался на изучении хромосом в метафазе соматических клеток. С появлением метода, разработанного М. Дрессером и М. Мозесом [1], стало возможно изучать кариотип, используя синаптонемный комплекс (СК), формирующийся между конъюгирующими хромосомами в зиготене-пахитене в профазе I мейоза. Число СК в клетке равно гаплоидному набору хромосом.

Метод кариотипирования на основе СК получил широкое применение при исследовании мейоза как у животных, так и у человека. Развитие этого метода и оригинальные теоретические разработки были сделаны Мозесом [2, 3]. Этот метод имеет высокую разрешающую способность, позволяет исследовать характер поведения мейотических хромосом и обнаруживать структурные перестройки, которые не выявляются при общепринятом анализе мейотических хромосом в диакинезе. Электронно-микроскопический (ЭМ) анализ СК дает точную информацию о повреждениях хромосом в раннем мейозе и графическое изображение хромосом, отражающее процесс конъюгации, и позволяет выявлять тонкие повреждения хромосом. С помощью ЭМ анализа СК уже изучен мейоз у многих млекопитающих: домового мыши, крысы, мунтжака, китайского хомячка, лемуру, слепушонка, собаки, домашней кошки и др. [2, 4—6], а также имеется ряд исследований,

проведенных на сельскохозяйственных животных (свинья, курица, лошадь) [7, 8] на стадии пахитены-диплотены. Задачей настоящего исследования является ЭМ анализ СК сперматоцитов серебристо-черной лисицы (*Vulpes fulvus*) на стадиях пахитены, а также проведение СК-кариотипирования на основе этого анализа. Знание нормального СК-кариотипа необходимо для выявления нарушения синапсиса хромосом в мейозе, обусловленного хромосомными абберациями.

**Материалы и методы**

В исследованиях использовали серебристо-черных лисиц (*V. fulvus*), содержащихся в клеточных условиях. Для эксперимента при забое были взяты семенники двух половозрелых (старше двух лет) самцов из популяции зверохозяйства “Пушкинский” Московской обл. Исследованные животные были фенотипически нормальными.

Ввиду растянутости гона у серебристо-черных лисиц была проведена оценка оптимальных сроков взятия материала для исследования мейоза. Наиболее подходящим временем для получения мейотических препаратов с достаточным количеством различных стадий сперматогенеза является последняя декада января [9].

Для электронно-микроскопического анализа синаптонемных комплексов сперматоциты выделяли

<sup>1</sup> Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, г. Москва.

<sup>2</sup> ГНУ НИИ пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева, РАСХН, г. Москва.

по методу Дрессера и Мозеса [1] из клеточной суспензии семенников. Анализ гетерогенной популяции сперматоцитов 1-го порядка, находящихся на разных стадиях профазы 1-го мейоза проводили по Дрессеру и Мозесу [1]. Окрашенные 50%-м раствором нитрата серебра клетки отбирали под световым микроскопом, вырезали с помощью алмазного метчика и анализировали под электронным микроскопом JEM-100C (Япония). Препараты анализировали в течение ранней—поздней пахитены по классификации Мозеса [2]. Всего просмотрено более 40 клеток. Длины СК аутосомных и половых бивалентов сперматоцитов на стадии средней пахитены измерены с помощью программы Leica Application Suite V3 на электронных микрофотографиях. СК-кариотипирование клеток на ранней—средней стадии пахитены (15 клеток), а также на стадии поздней пахитены осуществляли на основе идентификации СК аутосом по относительной длине каждого СК. Раскладка и нумерация СК бивалентов проводилась согласно произведенным измерениям в порядке убывания их линейных размеров.

### Результаты и обсуждение

Представлены результаты электронно-микроскопического анализа синаптонемных комплексов сперматоцитов самцов серебристо-черных лисиц (*V. fulvus*) на стадиях пахитены. ЭМ анализ СК сперматоцитов серебристо-черных лисиц обнаружил 16 аутосомных бивалентов нормального типа и Х-У половой бивалент (рис. 1). Синаптонемные комплексы аутосомных бивалентов имели структуру, типичную для млеко-

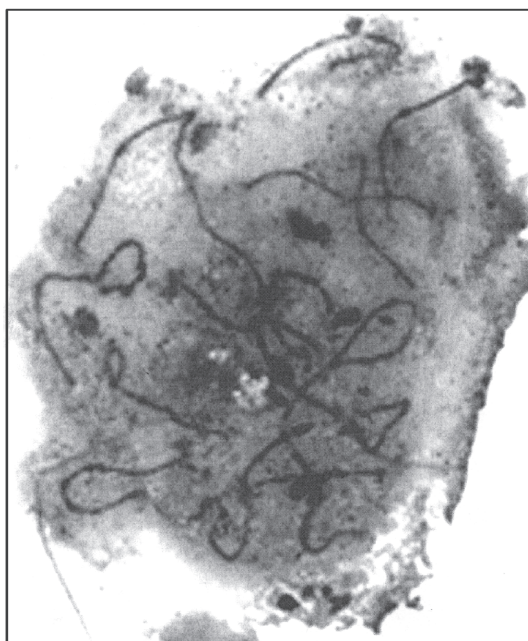


Рис. 1. Электронная микрофотография сперматоцитов самца серебристо-черной лисицы *V. fulvus*. Нормальный синапсис аутосомных бивалентов с четко видимыми осями боковых элементов. Ув.  $\times 2000$

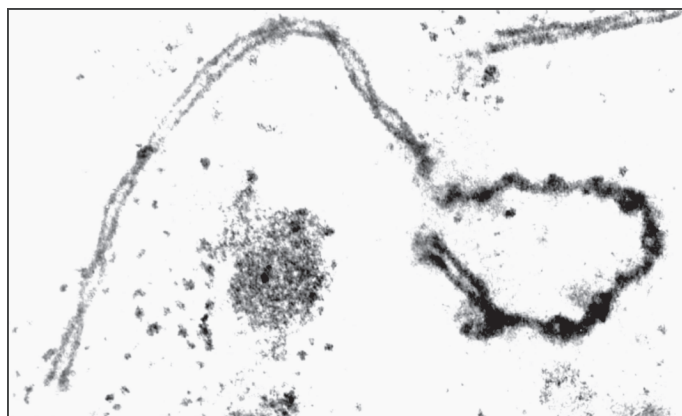


Рис. 2. ХУ-половой бивалент (синапсис осей Х и У половых хромосом, участок СК (РА район на стадии средней пахитены)) СК осей половых бивалентов оказывался сильно утолщенным (и укороченным) и свободные сегменты имели вид бусинок (средняя пахитена); ассиметричное перекручивание (твистирование) осей аутосомных боковых элементов. Ув.  $\times 2000$

питающих (рис. 1, 2), боковые элементы были протяженными, центральный элемент был выявлен, хотя не во всех СК. На электронных фото визуализирован нормальный синапсис аутосомных бивалентов с четко видимыми осями боковых элементов, но в некоторых случаях имелись аномалии: ассиметричное перекручивание (твистирование) боковых осей аутосомных бивалентов (рис. 2), особенно в терминальных участках, соответствующих гетерохроматиновым районам хромосом, интенсивно окрашенных нитратом серебра.

Синаптирование половых бивалентов характеризовалось различной протяженностью РА района — участка СК — в течение пахитены (рис. 1). В средней пахитене синапсис осей Х и У был полным (протяженным) или почти полным в ранней пахитене. В поздней пахитене в некоторых случаях несинаптируемые оси половых бивалентов были утолщены и укорочены по сравнению с аутосомами, некоторые оси половых хромосом имели очень грубую перекрученную структуру. В то же время у некоторых млекопитающих в поздней пахитене половые хромосомы чаще всего спутаны в клубок [10]. Однако у лисиц на осевых элементах половых бивалентов наблюдалось значительное число утолщений СК в виде бусинок (рис. 2). В средней пахитене СК осей половых бивалентов оказывались сильно утолщенными (и укороченными), и свободные сегменты имели вид бусинок. Также наблюдали складчатость или ауто-синапсис (self-folding) осевых элементов половых хромосом (грубая, темноокрашенная структура), особенно характерная для Х-хромосомы. В некоторых случаях Х-хромосомы были замкнуты в виде кольца. Иногда осевые элементы половых бивалентов были расплетены в ряде сегментов.

Таким образом, ЭМ анализ СК сперматоцитов серебристо-черных лисиц (*V. fulvus*) обнаружил 16 ауто-

сомных бивалентов нормального типа и X-Y один половой бивалент (рис. 1). Синаптонемные комплексы аутосомных бивалентов имели структуру, типичную для млекопитающих. Половой бивалент у лисиц интенсивно окрашен так же, как у многих млекопитающих. Но на стадии средней пахитены наблюдались отличия в структуре СК полового бивалента сперматоцитов серебристо-черных лисиц (*V. fulvus*) по сравнению с некоторыми животными, например домовою мышью, крысой [2, 11].

В данном исследовании использовался метод мониторинга животных — цитогенетический мониторинг пушных зверей. Ранее показано, что падение продуктивности (или численности) животных (носителей и их потомства) обусловлено хромосомными аномалиями, которые ведут к их гибели [12]. Распространение хромосомных аномалий в популяциях животных может давать ощутимый экономический ущерб. Поэтому необходим цитогенетический мониторинг, который определяет изменения в геноме, играющие важную роль в популяционно-генетических процессах и онтогенезе.

Цитогенетический мониторинг у животных до недавнего времени основывался на изучении хромосом в метафазе соматических клеток. Для этого проводилось кариотипирование родительских видов на митотических хромосомах. В настоящее время получил применение метод, позволяющий изучать ка-

риотип в мейозе (на мейотических хромосомах) с использованием ЭМ анализа СК. Данный метод дает возможность исследовать хромосомные аномалии на ранних стадиях мейоза (в пахитене-диplotене). В связи с большой чувствительностью метода выявляются микроабберрации, которые не обнаруживаются при световой микроскопии.

М. Свитонски и И. Густавссон [13] обнаружили транслокационное центрическое слияние с помощью ЭМ анализа синаптонемного комплекса в кариотипе песца (*Alopex lagopus*), у некоторых из них наблюдался гетеромофизм в поздней зиготене и ранней пахитене.

Иммунофлуоресцентный анализ синаптонемных комплексов у сперматоцитов красной лисицы (*V. fulvus*) проведен Е.А. Башевой [14]. С использованием иммунолокализации белка MLH1, маркирующего сайты кроссинговера на синаптонемных комплексах, получена точная оценка общей длины генетической карты аутосом самцов лисицы (1530 сМ). Анализ распределения сайтов кроссинговера по бивалентам лисицы позволил выявить общие с другими млекопитающими характеристики паттернов рекомбинации — высокую частоту рекомбинации в дистальных районах бивалентов и низкую в проксимальных.

Таким образом, на цитологическом уровне можно определить причину снижения плодовитости

животных. Часто значительные нарушения в структуре мейотических хромосом приводят к нарушению сперматогенеза. В связи с этим ЭМ анализ СК сперматоцитов самцов имеет большое практическое значение при изучении фертильности сельскохозяйственных животных. Поэтому для выявления нарушений СК первоначально необходимо знание нормального СК-кариотипа. Впервые нами представлено описание кариотипа на основе СК распластанных пахитенных сперматоцитов серебристо-черных лисиц (*V. fulvus*) (рис. 3).

Итак, ЭМ анализ СК сперматоцитов — исследование синаптонемного комплекса у сельскохозяйственных животных — является очень хорошим инструментом для проведения сравнительного анализа нормального СК-кариотипа и с носителями аномалий хромосом у пушных зверей (лисиц).

\* \* \*

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Биоресурсы (грант № 111.13).

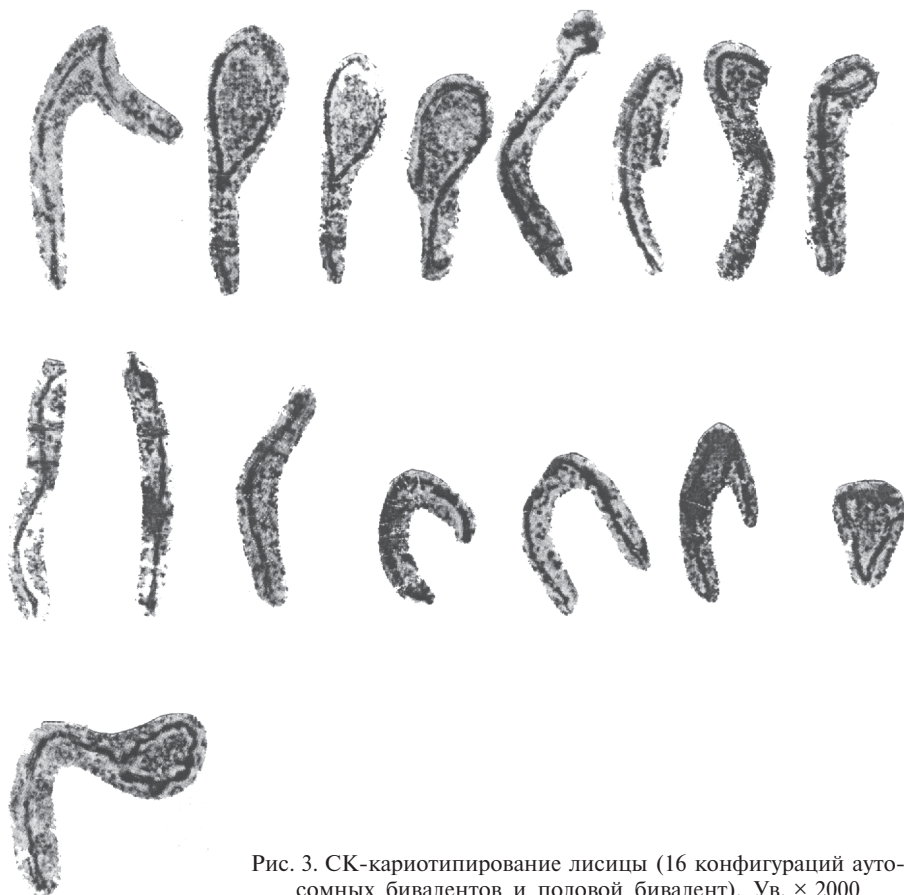


Рис. 3. СК-кариотипирование лисицы (16 конфигураций аутосомных бивалентов и половой бивалент). Ув. × 2000

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dresser M.E., Moses M.J. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). IV. Light and electron microscopy of synapsis and nucleolar development by silver staining // *Chromosoma* (Berl.). 1980. Vol. 76. P. 1—22.
2. Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л. Кариотипирование на основе синаптонемных комплексов и применение этого метода в цитогенетике // *Генетика*. 1985. Т. 21. № 5. С. 793—802.
3. Moses M.J. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). I. Morphology of the autosomal complement in spread preparations // *Chromosoma*. 1977. Vol. 60. P. 99—125.
4. Сафронова Л.Д. Электронно-микроскопический анализ синаптонемных комплексов у самцов-гибридов // *Онтогенез*. 1999. Т. 30. № 4. С. 255—266.
5. Демин Ю.С., Сафронова Л.Д., Черезжанова Л.В., Сафронов В.А. Исследование синаптонемных комплексов у млекопитающих. Сообщение 1. Природа и механизм образования центрических слияний хромосом (Робертсоновских транслокаций) // *Генетика*. 1984. Т. 20. № 9. С. 1499—1506.
6. Gilles C.B., Cowan S.K. A pachytene synaptonemal complexes complement of cat // *Genetics*. 1985. Vol. 67. P. 99.
7. Kaelbing M., Fechheimer M.S. Synaptonemal complexes and chromosome complement of domestic fowl, *Gallus domesticus* // *Cytogenet. Cell. Genet.* 1983. Vol. 35. P. 87—92.
8. Сафронова Л.Д., Пименова Т.И. Кариотипы крупного рогатого скота (*Bos Taurus*) и лошадей (*Equus Caballus*) на основе синаптонемных комплексов // *Генетика*. 1988. Т. 24. № 4. С. 708—714.
9. Графодатский А.С., Раджабли С.И. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных животных: Атлас. Новосибирск: Наука, 1988. С. 88—89.
10. Solary A.J. The relationships between chromosome axes in the chiasmatic XY pair of the American hamster (*Cricetulus migratorius*) // *Chromosoma*. 1974. Vol. 48. P. 89—106.
11. Сафронова Л.Д., Левенкова Е.С., Мейер М.Н. Электронная микроскопия мейоза экспериментальных гибридов крыс *Rattus rattus* и *Rattus flavipectus* // *Систематика и филогения грызунов и зайцеобразных*. М.: КМК, 2000. С. 149—151.
12. Демин Ю.С., Сафронова Л.Д. Цитогенетический мониторинг в животноводстве // *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 1984. № 5. С. 702—715.
13. Switonski M., Gustavsson I. Centric-fusion translocation and whole-arm heterochromatin in the cariotipe of the bluefox (*Alopex lagopus* L.) synaptonemal complex analysis // *Cytogen. Cell. Genet.* 1991. N 57. P. 1—8.
14. Башева Е.А. Иммунофлуоресцентный анализ синаптонемных комплексов у сперматоцитов красной лисицы (*Vulpes fulvus*) // *Пятый съезд ВОГиС, посвященный 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина*. Ч. II. Москва, 21—28 июня. М., 2009. С. 367.

Поступила в редакцию  
5.08.10

# SC-KARYOTYPING ON ELECTRONIC MICROSCOPY (EM) OF ANALYSIS OF SYNAPTONEMAL COMPLEXES (SC) SPERMATOCYTES OF FOX (*VULPES FULVUS*)

L.D. Safronova, E.G. Sergeev, M.A. Monachova

It present electronic microscopy (EM) of analysis of synaptonemal complexes (SC) spermatocytes of ale silver fox *Vulpes fulvus* at the pachytene stage. It was carried out karyotypeing and discribe of SC-karyotypes of pachytene cells. The knowledge of normal SC-karyotypa it need for recognize revealed synaptic abnormalities of sex chromosomes and autosomes in pachytene. It was showed that electronic microscopy (EM) of analysis of synaptonemal complexes (SC) spermatocytes — it was very good tool for studying cause of distortion fertility of carriers anomalies for further investigations of foxes.

**Key words:** meiosis, synaptonemal complex, spermatogenes, SC-karyotype.

## Сведения об авторах

Сафронова Лариса Дмитриевна — докт. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории проблем микроэволюции млекопитающих Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН. Тел.: 8-499-135-97-06; e-mail: safronova@sevin.ru

Сергеев Евгений Геннадьевич — канд. с.-х. наук, зав. сектором селекции пушных зверей и кроликов ГНУ НИИ пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева Россельхозакадемии. Тел.: 8-495-501-53-55; e-mail: seg008@rambler.ru

Монахова Маргарита Александровна — канд. биол. наук, доцент кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-90; e-mail: monakhova@list.ru