

На правах рукописи

Матвеевский Сергей Николаевич

**ПРИЗНАКИ ПОЛОВОГО ДИМОРФИЗМА МЕЙОЗА И ИЗМЕНЧИВОСТЬ
КАРИОТИПА У СЛЕПУШОНОК РОДА ELLOBIUS
(RODENTIA, MAMMALIA)**

03.02.07 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва

2011

Работа выполнена в лаборатории цитогенетики Учреждения Российской академии наук Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Оксана Леонидовна Коломиец

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Владимир Юрьевич Поляков

кандидат биологических наук
Нина Шамильевна Булатова

Ведущее учреждение:

Учреждение Российской академии наук
Институт биологии развития им. Н.К.
Кольцова РАН, г. Москва

Защита диссертации состоится «17» февраля 2011 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 при Учреждении Российской Академии наук Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, ул. Губкина, д. 3.

Факс: (499) 132-89-62, e-mail: aspirantura@vigg.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Автореферат разослан «17» января 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Т.А. Синельщикова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Проблема полового диморфизма в мейозе млекопитающих не теряет своей актуальности уже более 100 лет. Хорошо известны кардинальные различия во времени начала мейотических событий у самцов и самок млекопитающих. В отличие от мужского мейоза, протекающего у половозрелых особей, у самок профазы I мейоза начинается в период пренатального развития, прерывается на стадии диктиотены до наступления половой зрелости, и мейоз завершается только после оплодотворения.

В последнее время исследования полового диморфизма в мейозе и процессов, определяющих эволюцию кариотипов, все чаще проводятся на основе анализа структуры синаптонемных комплексов (СК) мейотических хромосом в сочетании с методами иммунофлуоресценции и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) (Wallace, Hulten, 1985; Speed, 1986; Angel, 1997; Hodges et al., 2001; Pavlova et al., 2008; Бородин и др., 2010).

Синаптонемный комплекс (СК) – специфическая структурно-функциональная единица мейотического ядра, формирующаяся и дегенерирующая в процессе профазы I мейоза у эукариот. С участием СК протекают ключевые процессы профазы I мейоза – синапсис, рекомбинация и десинапсис гомологичных хромосом. Использование современных методов электронно-микроскопического и иммуноцитохимического анализа тотальных препаратов СК позволяет устанавливать гомологию хромосом или ее отсутствие у внутри- и межвидовых гибридов. Этот метод оказался чрезвычайно эффективным для исследования синапсиса хромосом у животных, отловленных в зонах гибридизации хромосомных форм, и внутривидовых гибридов разнохромосомных форм, полученных при искусственном скрещивании. На основе анализа СК удается идентифицировать признаки репродуктивной изоляции на ранних стадиях видообразования (Moses, 1979; Bogdanov et al., 1986; Pavlova et al., 2008; Коломиец и др., 1985, 1986; Бородин и др., 2005).

Следует подчеркнуть, что подавляющее большинство работ, посвященных исследованию СК у внутри- и межвидовых гибридов животных, направленных на изучение эволюции кариотипов, проведено на распластанных ядрах сперматоцитов I порядка. Работы, посвященные исследованию СК в ядрах ооцитов малочисленны, что объясняется трудностями получения и малым объемом материала для исследования у самок млекопитающих.

Поиск признаков репродуктивной изоляции – морфологических и молекулярных маркеров ареста мейоза на разных стадиях профазы I мейоза, иными словами, анализ работы контрольно-пропускных пунктов (check-points) мейоза, является важнейшим направлением исследований механизмов презиготической селекции клеток с нарушениями синапсиса, рекомбинации или десинапсиса хромосом. Представления об этих механизмах расширяют представления о процессах эволюции кариотипов и причинах нарушения фертильности животных.

С развитием новых цитогенетических и молекулярно-генетических методов, средств и приемов исследований стало очевидным, что процессы синапсиса, рекомбинации и десинапсиса гомологичных хромосом в мейозе у самок и самцов млекопитающих, хотя и контролируются сходными молекулярными механизмами,

однако различаются строгостью контрольно-пропускных пунктов мейоза у самок и самцов. Первоначально это было установлено для гетерозигот по хромосомным транслокациям. В настоящее время эта закономерность установлена и для носителей многих мейотических мутаций (Morelli, Cohen, 2005).

Следует отметить, что к настоящему времени обнаружены признаки полового диморфизма в структурной организации и поведении СК у растений (Chelusheva et al., 2008).

Настоящая работа посвящена исследованию признаков полового диморфизма в мейозе и изменчивости кариотипа у слепушонок рода *Ellobius* (Rodentia, Mammalia). Слепушонки – уникальная модель для изучения полового диморфизма, генетических механизмов определения пола, закономерностей хромосомного видообразования. Слепушонки характеризуются необычной для млекопитающих дивергенцией аутосом и половых хромосом: афганская *E. fuscocapillus* ($2n=36$, XY♂/XX♀; NFa=56); закавказская *E. lutescens* ($2n=17$, XO♂/XO♀, NF=34), обыкновенная *E. talpinus* ($2n=54$, XX♂/XX♀, NF=54), восточная *E. tancrei* ($2n=54-30$, XX♂/XX♀, NF=56) и алайская *E. alaicus* ($2n=52-50$, XX♂/XX♀, NF=56) (Matthey, 1953; Воронцов, Раджабли, 1967; Иванов, 1967; Воронцов и др., 1969; Ляпунова, Воронцов, 1978; Ляпунова и др., 1984; Vakiloushinskaya, 2003).

Цели и задачи работы. Цель настоящей работы заключается в выявлении признаков полового диморфизма, изменчивости кариотипов и хромосомных механизмов дивергенции видов на основе анализа структуры и поведения СК у видов и гибридов рода *Ellobius*.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Выявить признаки полового диморфизма в профазе I мейоза:
 - а. У *E. talpinus*, вида с изоморфными (XX) хромосомами;
 - б. У гибридов, полученных от скрещивания видов-двойников *E. talpinus* ($2n=54$, NF=54) и *E. tancrei* ($2n=54$, NF=56).
2. Установить закономерность ранее высказанной гипотезы о происхождении единственного неробертсоновского субметацентрика в кариотипе разнохромосомных форм *E. tancrei* в результате инверсии;
3. Выявить причины, приводящие к нарушению фертильности гибридов F₁ между видами-двойниками *E. talpinus* и *E. tancrei*;
4. Для подтверждения монобрахиальной гомологии робертсоновских субметацентриков проанализировать СК у внутривидовых гибридов F₁ ($2n=49$, NF=56 и $2n=50$, NF=56) *E. tancrei* и определить причины снижения их плодовитости;
5. Провести иммуноцитохимическое исследование СК у самцов *E. lutescens* – вида, специфической особенностью кариотипа которого является наличие единственной и морфологически идентичной у самок и самцов половой (XO) хромосомы.

Научная новизна. В работе впервые проведено сравнительное электронно-микроскопическое и иммуноцитохимическое исследование СК у самок и самцов *E. talpinus* – вида с изоморфными по распределению G-бэндов половыми (XX) хромосомами у представителей обоих полов. Выявлены признаки полового

диморфизма в структуре и поведении аутосом и половых хромосом в профазе I мейоза у *E. talpinus*.

На основе особенностей синапсиса между XX хромосомами в профазе I мейоза у самцов *E. talpinus* получены доказательства гетероморфизма этих хромосом у самцов. Впервые подтверждена на уровне мейоза монобрахиальная гомология робертсоновских субметацентриков у некоторых кариоморф *E. tancrei*.

На основе результатов анализа СК у межвидовых гибридов между видами-двойниками *E. tancrei* и *E. talpinus* сделано заключение о том, что в процессе дивергенции этих видов единственный неробертсоновский субметацентрик, присутствующий в кариотипах всех форм *E. tancrei*, произошел в результате формирования неоцентромеры, а не инверсии, как предполагалось ранее. Впервые выявлена неоцентромера в хромосомном наборе *E. tancrei*.

Практическая и теоретическая значимость. Полученные в работе результаты и экспериментальные подходы к решению проблем микроэволюции и репродуктивной изоляции оригинальны, они расширяют область применения электронно-микроскопического и иммуноцитохимического исследований СК у человека и животных с нарушением фертильности; могут быть использованы для решения проблем репродукции с/х животных с целью получения новых пород, а также для изучения закономерностей видообразования при возникновении робертсоновских (Rb) транслокаций с моно- и дибрахиальной гомологией Rb-метацентриков.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Половые хромосомы (XX), изоморфные по картине распределения G-бэндов, у представителей обоих полов *E. talpinus* и *E. tancrei*, гомологичны у самок, но гетерологичны у самцов.
2. Единственный неробертсоновский субметацентрик в кариотипе *E. tancrei* возник в результате формирования неоцентромеры в структуре акроцентрика предкового вида.
3. Робертсоновские слияния акроцентрических хромосом в разных популяциях *E. tancrei* происходят независимо друг от друга.
4. У стерильных самцов межвидовых гибридов F₁ (*E. talpinus* × *E. tancrei*) происходит арест мейоза на стадии пахитены.

Апробация работы. Результаты исследования представлены на 13-ой Пущинской международной школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2009), V съезде ВОГИС (Москва, 2009), международной конференции "Хромосома-2009" (Новосибирск, 2009), XVII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2010» (Москва, 2010), международной конференции "Целостность вида у млекопитающих: изолирующие барьеры и гибридизация" (Петергоф, 2010), международном совещании «Териофауна России и сопредельных территорий» (Москва, 2011). Результаты диссертации были доложены на отчетных сессиях (февраль, 2009; март, 2010) и межлабораторном семинаре «Геномика» (октябрь, 2010) ИОГен РАН.

Декларация личного участия автора. Автор самостоятельно получил тотальные препараты СК изучаемых животных, проводил их окрашивание нитратом серебра и антителями, дальнейший анализ на электронном и флуоресцентном микроскопах. Суммарное личное участие автора составило 85%.

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 9 работ, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и 6 тезисов докладов. Одни тезисы находятся в печати.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 172 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы и список литературы. Работа включает 63 рисунка, 19 таблиц. В списке литературы 322 источника, в том числе 227 на иностранном языке.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю д.б.н. О.Л. Коломиец за чуткое руководство, живое участие, всестороннюю помощь; д.б.н. И.Ю. Баклушинской и профессору Е.А. Ляпуновой за предоставление уникального биологического материала для исследований и постоянные консультации; к.б.н. С.А. Романенко и профессору А.С. Графодатскому за предоставление данных, касающихся типов Rb-слияний у слепушонок. Автор искренне признателен сотрудникам лаборатории цитогенетики, профессору Ю.Ф. Богданову, к.б.н. С.Я. Дадашеву, Т.Ф. Мазуровой, В.Е. Спангенбергу, к.б.н. И.С. Мажейке, к.б.н. Т.М. Гришаевой, Т.В. Сизовой и д.б.н. В.Л. Чубыкину за содействие и продуктивное обсуждение полученных результатов; аспирантам и дипломникам лаборатории – М.М. Ацаевой, Л.В. Штепа и А.Г. Давтян за техническую помощь в работе.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В Обзоре литературы рассматриваются и систематизируются признаки проявления полового диморфизма на уровне мейоза; обсуждаются особенности первой профазы мейоза у млекопитающих с хромосомным полиморфизмом робертсоновского типа, в том числе и у видов, для которых описан робертсоновский веер, а также влияние робертсоновских транслокаций на плодовитость потомства и их роль в формировании репродуктивной изоляции. В данном разделе подробно проанализированы ранее проведенные исследования по изучению первой профазы мейоза у видов рода *Ellobius*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Все животные, отловленные из природных популяций и полученные в результате многолетнего разведения в виварии и гибридизации, предоставлены для исследования сотрудниками ИБР РАН – д.б.н. И.Ю. Баклушинской и проф., д.б.н. Е.А. Ляпуновой. При выполнении работы были изучены 7 новорожденных самок и 3 взрослых самца *E. talpinus*; один самец кариоморфы *E. tancrei* с $2n=54$; одна новорожденная самка и два самца кариоморфы *E. tancrei* с $2n=34$; 4 новорожденных самки и один самец внутривидовых гибридов F_1 *E. tancrei* ($2n=49$, $NF=56$) от скрещивания кариоморф с $2n=48$ (♂) и $2n=50$ (♀); две новорожденных самки и два самца внутривидовых гибридов F_1 *E. tancrei* ($2n=50$, $NF=56$) от скрещивания кариоморф с $2n=50$ (♂) и $2n=50$ (♀); 3 самца *E. lutescens*; 4 новорожденных самки и один самец межвидовых гибридов F_1 с $2n=54$, $NF=55$ от скрещивания видов-двойников *E. talpinus* ($2n=54$, $NF=54$, ♀) и *E. tancrei* ($2n=54$, $NF=56$, ♂), а также три самца межвидовых гибридов F_1 с $2n=44$, $NF=55$ от скрещивания видов-двойников *E. talpinus* ($2n=54$, $NF=54$, ♀) и *E. tancrei* ($2n=34$, $NF=56$, ♂).

Получение суспензии ооцитов. Суспензию ооцитов получали по разработанному нами методу (Kolomiets et al., 2010). Извлечение яичников из тела новорожденных самок проводили, наблюдая в бинокляр. Яичник переносили на поверхность предметного стекла в каплю среды Игла. Накрывали покровным стеклом и слегка надавливали на него тупой деревянной палочкой до высвобождения клеток из яичника. Покровное стекло приподнимали иглой и полученную суспензию собирали пипеткой и переносили в пробирку. Далее суспензию гомогенизировали с помощью автоматической пипетки.

Получение суспензии сперматоцитов проводили по методу Counce и Meyer (1973) в модификации Dresser и Moses (1980).

Распластывание (спредирование) сперматоцитов и ооцитов проводили на поверхности капли гипотонического раствора (0,2 М сахарозы) по методу Navarro et al. (1981).

Контрастирование препаратов СК для дальнейшего электронно-микроскопического исследования проводили 50% или 70% водным раствором $AgNO_3$ (по: Fletcher, 1979).

Антитела. Использовали первичные кроличьи поликлональные антитела к С-концу белка SCP3 человека фирмы *Abcam* (ab №15093, Cambridge, Великобритания) в разведении 1:300. Выбор этих антител был обусловлен тем, что они связываются с СК человека, мыши, крысы и свиньи, т.к. С-конец белка SCP3 у

разных видов животных и человека высоко консервативен. В качестве вторичных мы использовали козьи антитела против IgG кролика, конъюгированные с Cy3 в разведении 1:400, или с FITC (*Jackson Immunoresearch*, США) в разведении 1:400, или Alexa Fluore 488, 1:800 (*Abcam*, Кэмбридж, Великобритания).

Центромеру выявляли с использованием первичных антител человека против центромерных белков (ACA) (*Antibody Incorporated*, Калифорния, США) или афинно очищенных аутоантител к центромерному белку CENPA человека (*Abcam*, Кэмбридж, Великобритания) в разведении 1:100 и вторичных козьих антител против IgG человека Alexa Fluore 546, 1:200 (*Abcam*, Кэмбридж, Великобритания).

Иммуноокрашивание тотальных препаратов СК проводили по методу Anderson et al. (1999).

Электронно-микроскопический и иммунофлуоресцентный анализ препаратов СК проводили с помощью электронного микроскопа JEM-100B (Япония) и универсального флуоресцентного микроскопа Axio Imager D1 (Carl Zeiss, Германия) соответственно.

Длина СК была высчитана с помощью программного пакета MicroMeasure 3.3 (Колорадо, США). Вычисления проводились на IBM PC/AT Pentium-IV в среде Microsoft Windows XP с использованием пакетов прикладных программ «Statistica 8.0» (StatSoft. Inc., 2008) и Microsoft Excel версии 2003 г. (Microsoft Corp., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Половой диморфизм в профазе I мейоза у *Ellobius talpinus*

Электронно-микроскопически и иммуноцитохимически установлены основные события, протекающие в профазе I мейоза в ооцитах и сперматоцитах обыкновенной слепушонки *E. talpinus*. В ооцитах на стадии прелептотены, когда только начинается формирование осевых элементов, а гомологичные хромосомы еще не спарены, центромерные сигналы рассеяны по всему ядру, лишь единичные центромеры соединены попарно или сближены (рис. 1а). SCP3-сигналы выявляются на коротких линейных участках, что соответствует сформированным коротким фрагментам осевых элементов. На стадии ранней зиготены происходит инициация синапсиса гомологов, наблюдаются длинные участки СК, а теломеры группируются вблизи одного полюса ядра, таким образом, начинается формирование «хромосомного букета» (рис. 1б). На стадии средней пахитены (рис. 1г) четко видны 27 сформированных СК-бивалентов. В сперматоцитах данного вида не выражена конфигурация «букета» хромосом. На стадии пахитены визуализируются 26 СК и один половой XX-бивалент (рис. 2в, г).

В профазе I мейоза у *E. talpinus* обнаружены признаки полового диморфизма. Изоморфные по G-бэндам у самцов и самок половые XX-хромосомы (Romanenko et al., 2007) имеют различия в строении и поведении в мейозе. У самок этих видов СК полового (XX) бивалента морфологически не отличается от аутосомных СК (рис. 1в, 2а, б).

Половой бивалент в сперматоцитах, начиная с зиготены, располагается на периферии ядра, осевые элементы окружены облаком электронно-плотного

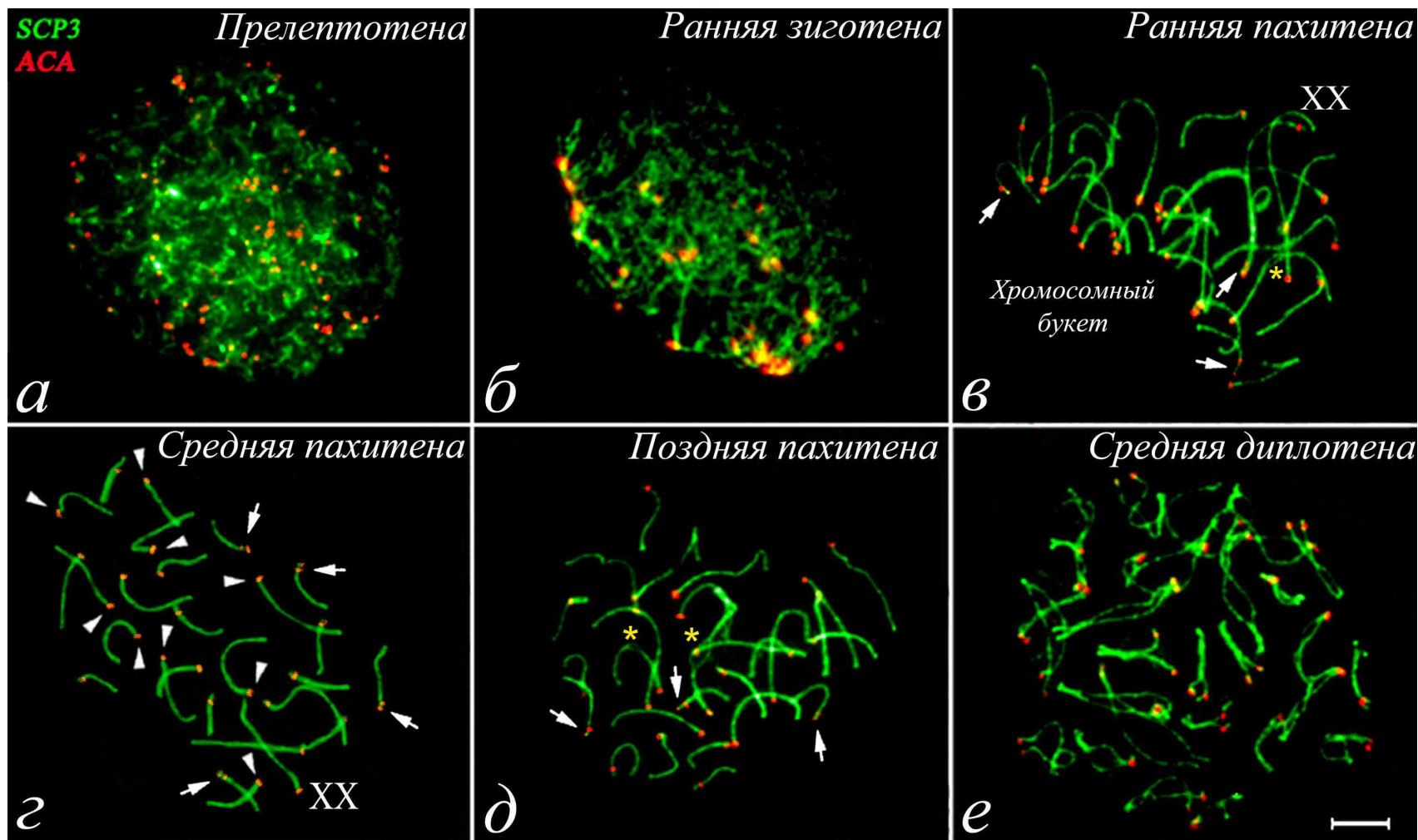


Рис. 1. Распластанные ядра ооцитов *E. talpinus* на разных стадиях профазы I мейоза.

Иммуноокрашивание проведено с использованием антител к белкам SCP3 (зеленый сигнал) и антител к центромерным белкам (красный сигнал, ACA). Стрелки указывают на двойной центромерный сигнал в области теломер СК. Головки стрелок указывают на отсутствие SCP3-сигнала у коротких плеч хромосом. Звездочки определяют зоны асинapsиса/десинапсиса осевых элементов. Вар а–е = 3 μ m. Пояснения в тексте.

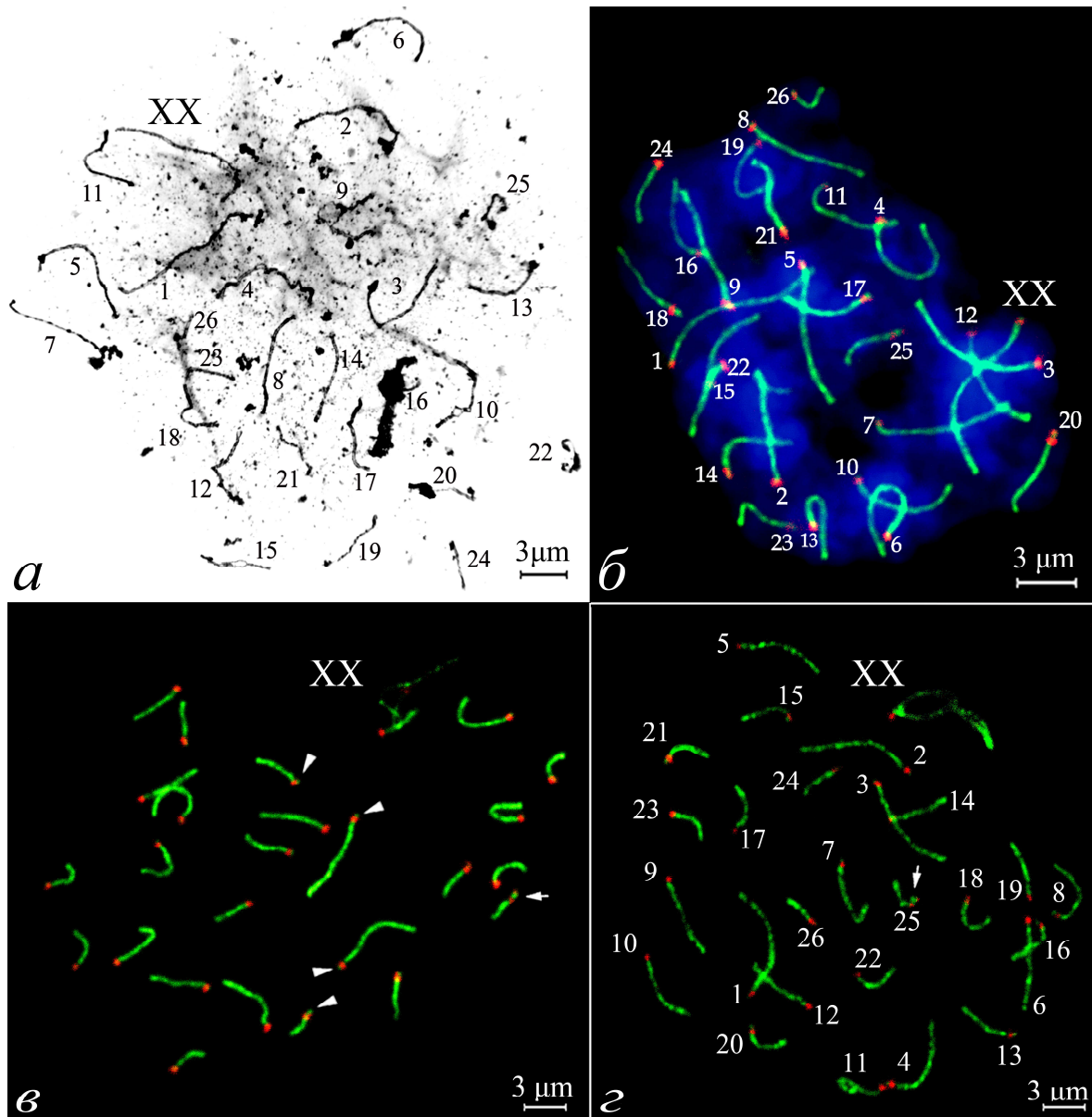


Рис. 2. Распластанные ядра ооцитов и сперматоцитов *E. talpinus*.

Цифры на фотографиях соответствуют номерам метафазных хромосом в кариотипе *E. talpinus*. (Romanenko et al., 2007). Стрелки указывают на два центромерных сигнала в теломерных участках СК акроцентриков; головки стрелок – на наличие SCP3-сигнала в коротких плечах СК акроцентриков. **а.** Электронно-микроскопическая фотография распластанный ядра ооцита на стадии пахитены; **б–в.** Иммуноокрашивание антителами к белку SCP3 (зеленый сигнал) и к центромерным белкам (красный сигнал, АСА). Хроматин окрашен красителем DAPI (синий сигнал); **б.** Распластанный ядро ооцита на стадии средней пахитены; **в.** Распластанный ядро сперматоцита на стадии средней пахитены; **г.** Распластанный ядро сперматоцита на стадии поздней пахитены.

материала (рис. 3). XX хромосомы формируют закрытый бивалент с двумя короткими прителомерными фрагментами СК. В центральной части полового бивалента тонкие осевые элементы XX хромосом не синаптируют, а напротив, отдаляются друг от друга, формируя обширную зону асинапсиса. Первоначально на одном из осевых элементов формируется электронно-плотное ядрышко-подобное тельце (рис. 3). По мере продвижения профазы I мейоза происходит перекручивание половых хромосом, и асинаптированные участки осей пересекаются, постепенно на осевых элементах формируются короткие шипы.

Конфигурация букета. Наиболее ранним проявлением полового диморфизма у обыкновенной слепушонки *E. talpinus* в профазе I мейоза было формирование конфигурации «букета» хромосом в ооцитах; спаривание и синапсис хромосом, минуя фигуру «букета», наблюдалось в сперматоцитах.

Длина СК. Средние значения длин СК в ооцитах выше, чем в сперматоцитах (рис. 4), что соответствует данным литературы, касающихся длины СК у самок и самцов других позвоночных животных (Wallace, Hulten, 1985; Loidl, Schweizer 1992; Wallace, Wallace, 2003; Campos-Ramos et al., 2009; и др.). Суммарная длина СК самок – 155 ± 7 , самцов – 119 ± 11 μm .

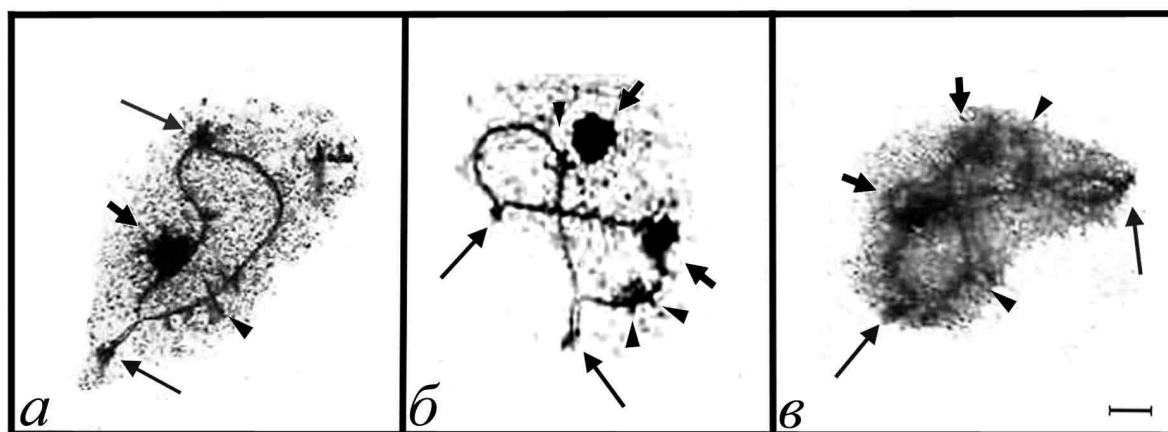


Рис. 3. Динамика структуры полового бивалента в сперматоцитах *E. talpinus* в профазе I мейоза.

Утолщенные короткие стрелки указывают на электронно-плотные ядрышкоподобные тельца, длинные стрелки – на короткие прителомерные фрагменты СК, головки стрелок – на «шипы» осевых элементов; Bar = 1 μm **а.** Поздняя зиготена. Закрытый половой бивалент с обширной зоной асинапсиса между осевыми элементами XX хромосом; **б.** Пахитена; **в.** Диплотена. Половой бивалент имеет сложную конфигурацию и окружен облаком электронно-плотного материала.

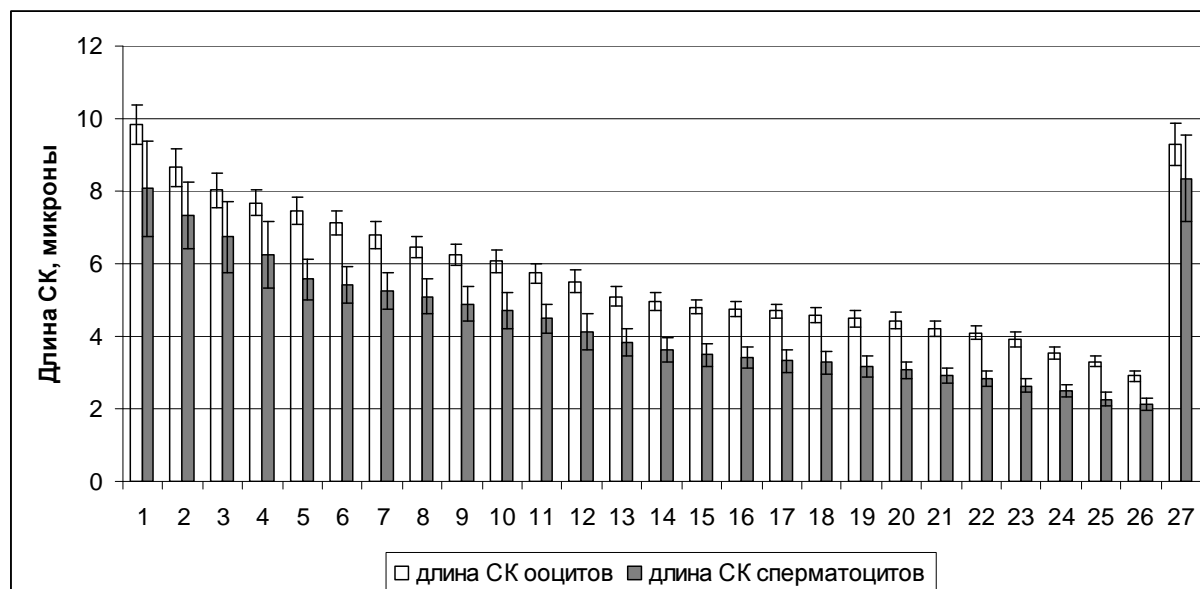


Рис.4. Сравнительная диаграмма длин СК ооцитов и сперматоцитов *E. talpinus* на стадии пахитены.

СК некоторых кариоморф и гибридов между ними *E. tancrei*

Самцы кариоморфы *E. tancrei* с $2n=54$, $NF=56$. Нами выявлены сперматоциты на всех стадиях первой профазы мейоза. На стадии средней пахитены сформированы 25 СК акроцентриков, один СК субметацентриков (пара №7) и один половой XX-бивалент, который имеет сходное строение с половым бивалентом самцов *E. talpinus* (рис. 5).

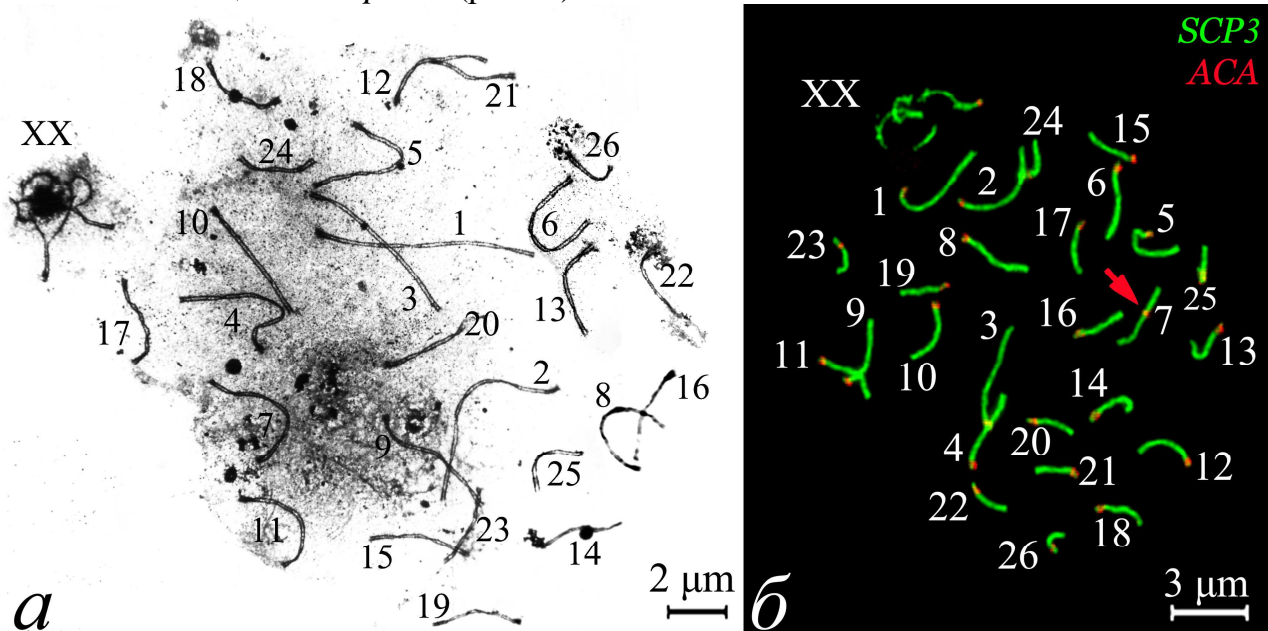


Рис. 5. Распластанные ядра сперматоцитов кариоморфы *E. tancrei* с $2n=54$. **а.** Электронно-микроскопическая фотография; **б.** Иммуноокрашивание антителами к белку SCP3 (зеленый сигнал) и к центромерным белкам (красный сигнал, АСА). Красная стрелка указывает на СК единственной субметацентрической пары хромосом.

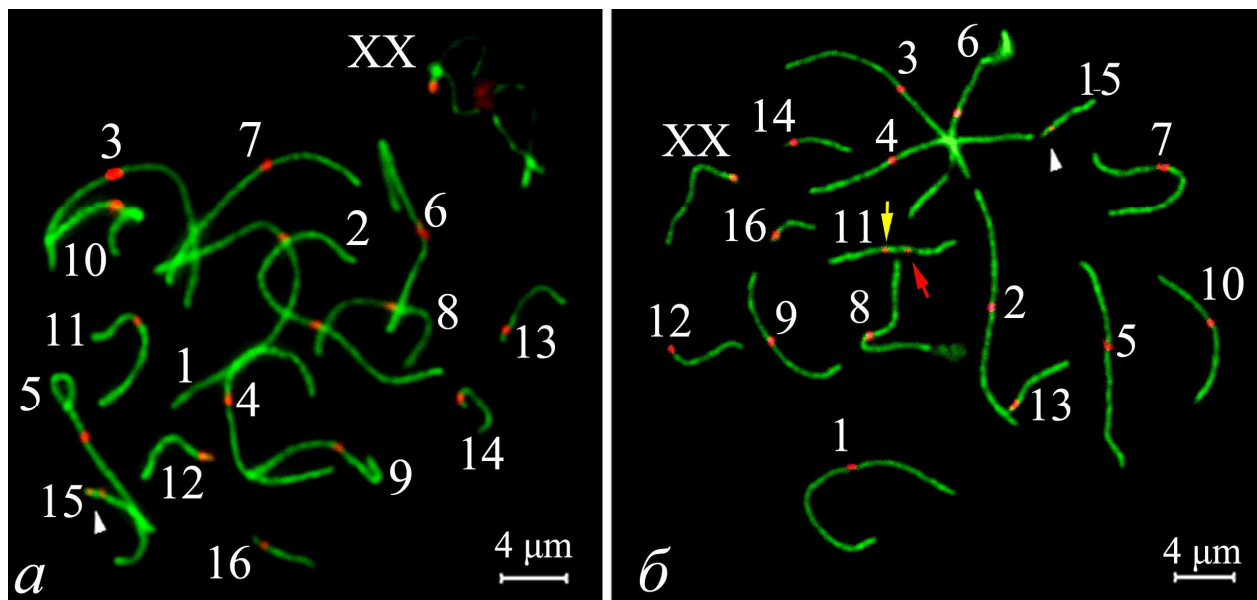


Рис. 6. Распластанные ядра сперматоцитов и ооцитов кариоморфы *E. tancrei* с $2n=34$, $NF=56$.

Цифры соответствуют номеру метафазных хромосом в кариотипе. **а.** Сперматоцит. Половой бивалент имеет характерную морфологию и выселен на периферию ядра; **б.** Ооцит. В структуре СК 11 пары хромосом выявлены «основной» (красная стрелка) и «дополнительный» (желтая стрелка) центромерные сигналы. Головка стрелки указывает на наличие двух АСА-сигналов в теломерном участке СК акроцентрических хромосом.

Самцы и самки кариоморфы *E. tancrei* с $2n=34$, $NF=56$.

Иммуноцитохимически в пахитене профазы I мейоза идентифицированы 11 СК субметацентриков, 6 СК акроцентриков, в т.ч. самая крупная акроцентрическая пара хромосом – половой XX-бивалент (рис. 6). В ооцитах самый короткий СК субметацентриков (пара № 11) сформирован уже на стадии ранней пахитены и имеет в структуре два центромерных сигнала – «основной» и «дополнительный», смещенный в сторону длинного плеча. В сперматоцитах в структуре СК № 11 выявлена одна центромера. С помощью метода Zoo-FISH С.А. Романенко (личное сообщение) было установлено, что субметацентрическая пара хромосом № 11 идентична неробертсоновской субметацентрической паре хромосом № 7 54-хромосомной формы *E. tancrei*.

Самцы и самки внутривидовых гибридов F_1 *E. tancrei* с $2n=49$, $NF=56$.

Родительские кариоморфы $2n=48$ и $2n=50$, отловленные с разных берегов р. Сурхоб (Памиро-Алай), имеют негомологичные робертсоновские транслокации (Баклушинская и др., 2010). Электронно-микроскопически и иммуноцитохимически определены основные события на стадиях прелептотены – диплотены профазы I мейоза в ооцитах и сперматоцитах данных гибридов *E. tancrei*. На стадии средней пахитены в ооцитах и сперматоцитах выявляются 21 СК: один СК метацентрической пары, один СК субметацентрической пары, 19 СК акроцентрических пар хромосом; один СК-пентавалент и один половой XX-бивалент. Половой бивалент самцов имеет сходное строение с половым бивалентом самцов *E. talpinus* и 54-хромосомной *E. tancrei*. Половой бивалент самок не отличается по строению от СК аутосом.

СК-пентавалент сформирован тремя метацентриками и двумя акроцентриками. На основе данных Zoo-FISH, полученных ранее С.А. Романенко (Баклушинская и др., 2010), удалось идентифицировать все хромосомы пентавалента (рис. 7). Три метацентрика родительских форм в своем составе содержат гомологичные плечи (рис. 7а), которые синаптируют в профазе I мейоза друг с другом и вместе с двумя негомологичными акроцентриками формируют СК-пентавалент (рис. 7б). Между прицентромерными участками негомологичных акроцентриков образуется короткий фрагмент СК, что обусловлено наличием в этих участках хромосом блоков неспецифичного С-гетерохроматина. Между 11-ым участком одного метацентрика (M1) и 23-им участком другого (M3) метацентрика имеется короткая зона негомологичного синапсиса (рис. 7в).

Самцы и самки внутривидовых гибридов F_1 *E. tancrei* с $2n=50$, $NF=56$.

Родительские кариоморфы $2n=50$, отловленные в разных ущельях горной системы Памиро-Алай, имеют негомологичные робертсоновские транслокации. На стадии пахитены в ооцитах гибридов наблюдается цепочка СК, в которой идентифицированы: тетравалент A1–M1–M2–A2, два тривалента A3–M3–A4, A5–M4–A6 и СК-биваленты B1, B2, B3, B4 (рис. 8).

В сперматоцитах гибридов из-за сильных зон растяжения не удалось определить элементы цепочки СК. Половой XX-бивалент у самок ведет себя как обычная аутосома, у самцов соответствует мужскому типу, как выявлено у самцов ранее описанных видов и гибридов слепушонок.

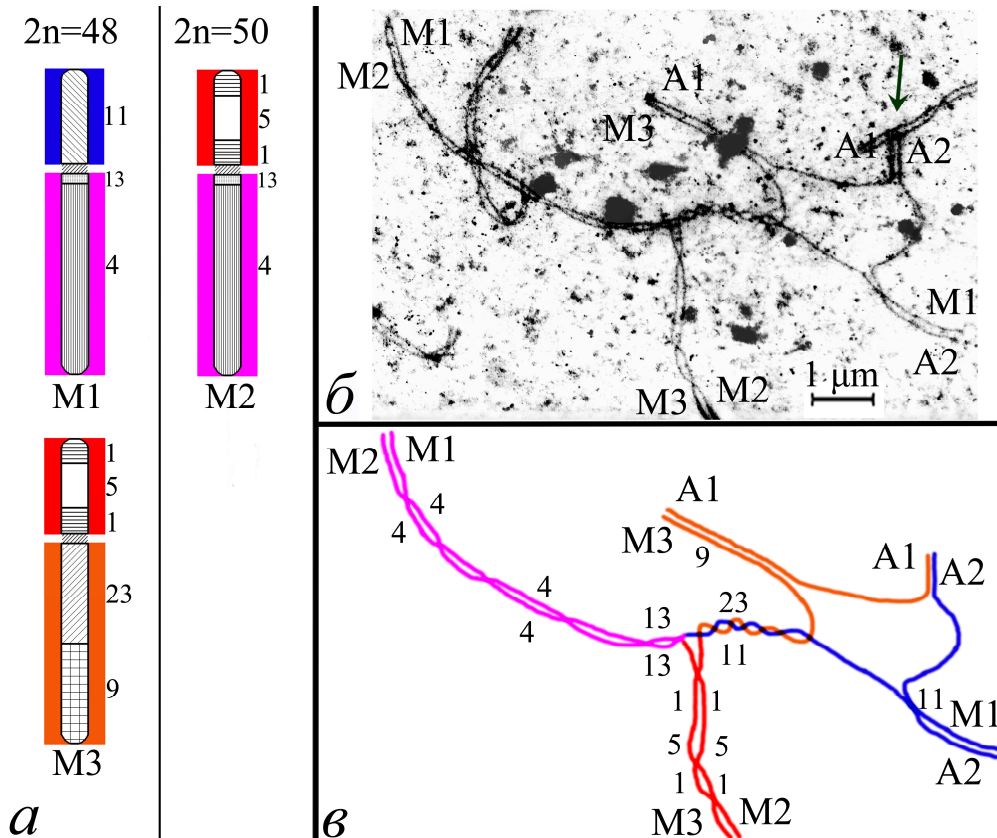


Рис. 7. Особенности структуры кариотипа самцов гибрида F_1 *E. tancrei* с $2n=49$.

а. Схема демонстрирует монобрахиальную гомологию субметацентриков родительских форм $2n=48$ и $2n=50$. Гомология хромосом определена с помощью метода Zoo-FISH. Цифры справа соответствуют хромосомам *Microtus agrestis* (схема построена по данным G-окраски метафазных хромосом и Zoo-FISH, Romanenko et al., 2007); **б.** Электроннограмма. Закрытый СК-пентавалент в ядре сперматоцита сформирован из трех монобрахиально гомологичных субметацентриков (M1–M3) и двух акроцентриков (A1, A2). Стрелкой обозначен короткий СК между прицентромерными участками негомологичных акроцентриков; **в.** Схема синapsиса хромосом в структуре СК-пентавалента.

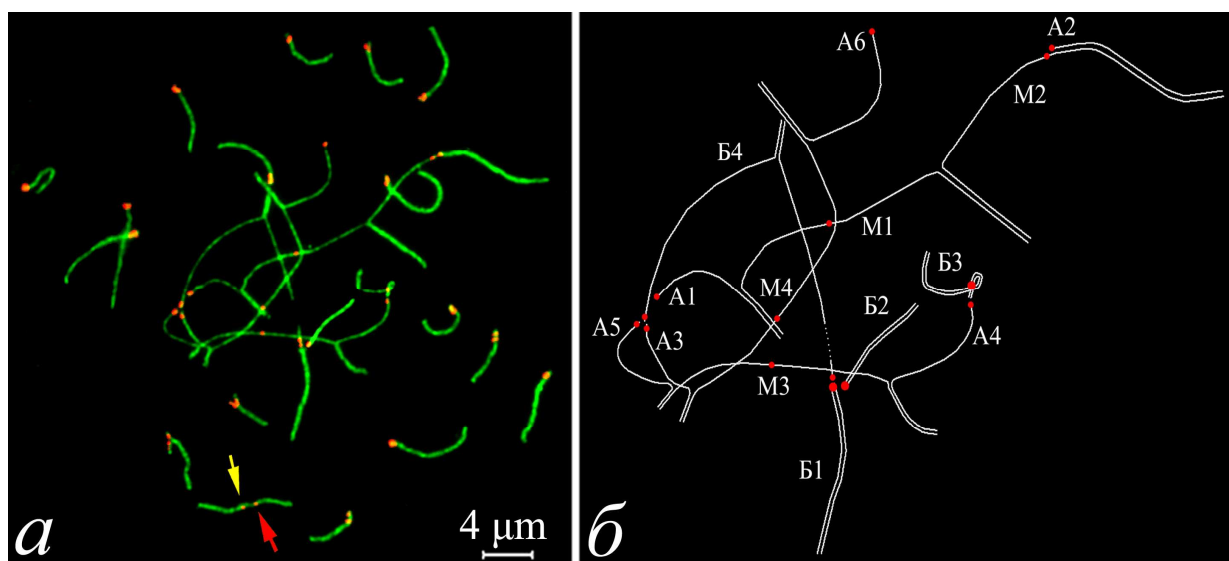


Рис.8. Особенности синapsиса хромосом в пахитене гибридов F_1 *E. tancrei* с $2n=50$.

а. Распластанное ядро ооцита. В структуре СК субметацентрической пары определены основной (красная стрелка) и дополнительный (желтая стрелка) центромерные сигналы. Видна цепочка СК; **б.** Схема. В формировании цепочки (на рис а) принимают участие тетравалент A1–M1–M2–A2, два тривалента A3–M3–A4, A5–M4–A6 и СК-биваленты B1, B2, B3, B4.

В сперматоцитах гибридов СК неробертсоновской субметацентрической пары хромосом имеет один центромерный сигнал, в ооцитах – всегда два центромерных сигнала («основной» и «дополнительный», смещенный в сторону длинного плеча) (рис. 8а).

Таким образом, наши данные подтверждают монобрахиальную гомологию робертсоновских субметацентриков (СК-пентавалент у 49-хромосомных гибридов и СК-тетравалент у 50-хромосомных гибридов). Скорее всего, группы популяций восточной слепушонки, обитающие в разных частях веера, формировались независимо друг от друга, и хотя гибридизация играла важную роль в их истории, ее распространение было ограничено географическими барьерами. Возникновение негомологичных робертсоновских транслокаций, как оказалось, явление более частое и важное для слепушонок, чем предполагалось ранее. Особенности биологии слепушонок, такие как подземный образ жизни, строительство сложных многоярусных колоний, обуславливают сравнительно низкие темпы расселения, что при наличии социальной структуры с преимуществом размножения отдельных особей (наблюдения И.Ю. Баклушинской, ИБР РАН), а также фрагментированного горными хребтами и реками ареала, несомненно, способствуют закреплению перестроек хромосомных наборов.

Для исследованных внутривидовых гибридов ранее было отмечено снижение плодовитости в 2 раза (Ляпунова и др., 1990). Это объясняется тем, что расхождение хромосом из сложных СК-комплексов затруднено вследствие нарушения архитектоники ядра, которое ведет к образованию несбалансированных гамет и, следовательно, к снижению фертильности.

Таким образом, подтверждается важное значение монобрахиальной гомологии как для создания механизмов генетического разнообразия и дивергенции, так и для формирования механизмов репродуктивной изоляции, на что указывают ранее проведенные исследования (Caranna, 1982; Caranna et al., 1985; Baker, Bickham, 1986; Searle, 1988; Sites, Moritz, 1987; Bidau, 1990; Pagacova et al., 2009).

Особенности сперматогенеза и оогенеза межвидовых гибридов *E. talpinus* × *E. tancrei*

Светомикроскопический анализ клеток суспензии семенников. В суспензии семенников контрольной фертильной 34-хромосомной формы *E. tancrei* выявлены как сперматоциты I порядка, так и зрелые сперматозоиды. В суспензии семенников межвидовых гибридов *E. talpinus* × *E. tancrei* с $2n=54$ обнаружены сперматоциты I порядка и единичные сперматозоиды. У межвидовых гибридов *E. talpinus* × *E. tancrei* с $2n=44$ выявлено меньшее количество сперматоцитов I порядка (по сравнению с вышеуказанными животными) и не обнаружены сперматозоиды.

Светомикроскопический анализ гистологических срезов семенников. В семенниках контрольной кариоморфы *E. tancrei* ($2n=34$) обнаружены сперматозоиды, но в семенных канальцах обоих межвидовых гибридов (как с $2n=54$, так и с $2n=44$) сперматозоиды не выявлены.

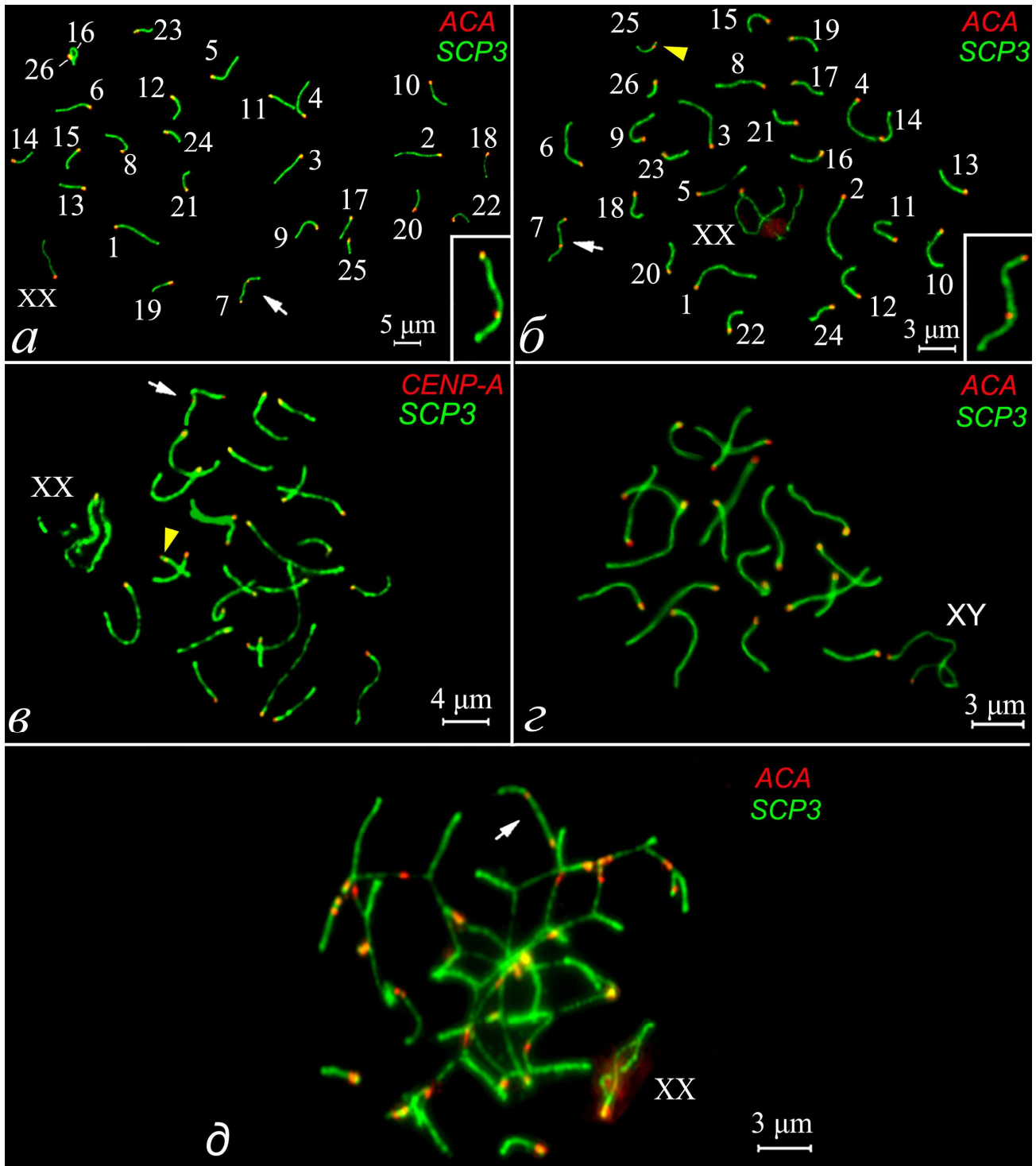


Рис. 9. Распластанные ядра ооцитов и сперматоцитов межвидовых гибридов *E. talpinus*×*E. tancrei* и сперматоцитов мыши *Mus domesticus*.

Цифры соответствуют номерам метафазных хромосом в кариотипе. Белая стрелка указывает на «гибридный» СК, желтая головка стрелки – на два центромерных сигнала в структуре СК короткой акроцентрической хромосомы №25. а,б,г,д – Иммуноокрашивание антителами АСА и SCP3; в – антителами CENPA и SCP3. а. Ядро ооцита на стадии средней пахитены *E. talpinus*×*E. tancrei* (2n=54, NF=55); во врезке – увеличенный «гибридный» СК; б. Ядро сперматоцита на стадии пахитены *E. talpinus*×*E. tancrei* (2n=54, NF=55). Половой XX-бивалент открыт, ЯПТ окрашивается антителами АСА. Во врезке – увеличенный «гибридный» СК; в. Ядро сперматоцита на стадии пахитены *E. talpinus*×*E. tancrei* (2n=54, NF=55). В структуре полового бивалента ЯПТ не окрашено; г. Сперматоцит на стадии пахитены *M. domesticus*; д. Ядро сперматоцита на стадии пахитены *E. talpinus*×*E. tancrei* (2n=44, NF=55).

Анализ СК. Электронно-микроскопически и иммуноцитохимически определены основные события на стадиях лептотены – диплотены профазы I мейоза в ооцитах и сперматоцитах межвидовых гибридов *E. talpinus* × *E. tancrei* с $2n=54$. На стадии средней пахитены в ооцитах и сперматоцитах данного гибрида сформированы 26 СК и один половой бивалент (рис. 9а, б). У самцов и самок гибридов в структуре СК седьмой пары хромосом впервые установлено наличие двух центромерных сигналов, расположение одного из них соответствует акроцентрическому гомологу (от *E. talpinus*), другого – субметацентрическому гомологу (от *E. tancrei*) (рис. 9а, б, врезка). По всей длине данной пары хромосом формировался типичный для гомологичных хромосом СК, ни в одном из ядер в структуре такого «гибридного» СК не было выявлено инверсионной петли.

До настоящего исследования было принято считать, что единственный неробертсоновский субметацентрик всех изученных форм *E. tancrei* возник из акроцентрической хромосомы предкового кариотипа путем перицентрической инверсии (Ляпунова, Воронцов, 1978; Якименко, Воронцов, 1982; Якименко, Ляпунова, 1986). Однако, инверсионная петля в структуре СК между хромосомами 7-ой пары этого гибрида не выявлена, что опровергает гипотезу о том, что формирование субметацентрика в процессе дивергенции видов *E. talpinus* и *E. tancrei* было связано с инверсией перицентромерного участка исходного (предкового) акроцентрика. На основании полученных результатов мы считаем, что в процессе дивергенции *E. talpinus* и *E. tancrei* изменение положения центромеры было обусловлено формированием нецентромеры.

Половой бивалент в ядрах сперматоцитов межвидовых гибридов в целом имеет сходное строение с XX бивалентами у самцов *E. talpinus* ($2n=54$, $NF=54$) и *E. tancrei* ($2n=54$, $NF=56$). Однако в 69% пахитенных сперматоцитов половой бивалент открыт. В 64% ядер он не смещается на периферию ядра, иными словами половой бивалент не формирует половое тельце. Выявлены единичные случаи ассоциации XX-бивалента с аутосомой. В половых бивалентах самцов межвидовых гибридов нами установлено неспецифичное связывание антител против центромерных белков (АСА) с ядрышкоподобными тельцами (ЯПТ) (рис. 9б). Интенсивность связывания антител АСА увеличивается, начиная со стадии средней пахитены к диплотене. Более того, на стадии диплотены атипичный АСА-сигнал становится более обширным и отмечается не только в районе ЯПТ, но и в центромерной области, синаптических участках, а также, что чрезвычайно важно, в ряде случаев распространяется на аутосомные биваленты. Все эти признаки: ассоциация полового бивалента с аутосомными СК, нарушение формирования полового тельца, открытость полового бивалента, наличие в единичных клетках отдельно лежащих осевых элементов на стадии пахитены, соответствуют признакам пахитенного ареста в сперматогенезе млекопитающих. Таким образом, пахитенный арест является причиной отсутствия сперматозоидов в суспензии клеток и гистологических срезах семенников.

В контрольном эксперименте при иммуноокрашивании аффинно очищенными антителами человека к центромерному белку CENPA и антителами кролика SCP3 против основного белка СК в сперматоцитах межвидовых гибридов выявлен «гибридный» СК, однако, не было обнаружено неспецифического связывания антител с ЯПТ в структуре полового бивалента (рис. 9в). По-видимому,

центромерные белки, на которые получены поликлональные антитела АСА, имеют общие антигенные детерминанты с белками, участвующими в формировании белкового покрывала при пахитенном аресте. При окрашивании антителами АСА и SCP3 пахитенных сперматоцитов мыши в структуре СК хромосом выявляются одиночные центромерные сигналы (рис. 9з). В сперматоцитах *E. talpinus* и межвидовых гибридов *E. talpinus* × *E. tancrei* в теломерном участке маркерного СК коротких акроцентрических хромосом № 25 выявляются два центромерных сигнала на расстоянии 0,1–0,3 μm .

У межвидового гибрида с $2n=44$ в сперматоцитах на стадии пахитены выявлены цепочки СК и «гибридный» СК, в структуре которого также не обнаружена инверсионная петля (рис. 9д).

Особенности строения СК неробертсоновских субметацентриков у разных кариоморф *E. tancrei* и гибридов между ними

Впервые при иммуноцитохимическом окрашивании СК с помощью антител против основного белка СК SCP3 и антител против центромерных белков (АСА) разнохромосомных кариоморф *E. tancrei* и внутривидовых гибридов между ними обнаружено необычное явление. В структуре СК, который формируется между не-Rb субметацентриками, выявляются дополнительные центромерные сигналы. Измерения СК позволили определить, что есть «основные» центромеры, которые всегда располагаются в диапазоне центромерных индексов от 0,34 до 0,36. «Дополнительные» центромерные сигналы смещены либо в сторону короткого, либо длинного плеча (табл.).

Дополнительные центромерные сигналы, если они обнаруживались у определенной группы слепушонок, выявлялись во всех исследованных сперматоцитах и ооцитах. Вероятно, появление дополнительных центромер связано с особенностями эволюции неробертсоновского субметацентрика. Мы предполагаем, что в структуре хромосом существуют особые районы – кластеры нецентромер. К примеру, эти участки у приматов часто соответствуют анцестральным инактивированным центромерам, и в некоторых таких областях могут сохраняться особенности, которые были свойственны их предкам десятки миллионов лет назад, что может вызывать появление нецентромер (Mehta et al., 2010).

Скорее всего, происхождение единственного неробертсоновского субметацентрика у разнохромосомных форм *E. tancrei* путем формирования нецентромеры и появление «дополнительных» центромерных сигналов в структуре СК у некоторых кариоморф и внутривидовых гибридов *E. tancrei* взаимосвязаны между собой и являются уникальными особенностями эволюции данной пары хромосом. Решение этого интересного вопроса нуждается в дополнительных генетико-молекулярных исследованиях.

Анализ СК самцов *Ellobius lutescens*

Впервые иммуноцитохимически определены основные события первой профазы мейоза в сперматоцитах *E. lutescens*. На стадии лептотены, когда осевые элементы практически сформированы и гомологи не синаптированы, выявляются 17 центромерных сигналов. На стадии зиготены начинается синапсис осевых

Таблица. Основные характеристики СК неробертсоновских субметацентрических хромосом у видов и гибридов *Ellobius*

Животное	N	L, µm	S.a., µm	L.a., µm	C.i.	A.r.	C.d.1, µm	C.d.2, µm
<i>E. tancrei</i> , ♂ 2n=54, NF=56	5	5,3±2	1,8±0,5	3,5±1,5	0,34±0,05	1,9±0,4	–	–
<i>E. tancrei</i> , ♂ 2n=34, NF=56	5	7,3±1	2,4±0,4	4,8±0,7	0,34±0,01	2±0,07	–	–
<i>E. tancrei</i> , ♀ 2n=34, NF=56	6	6,3±1,9	2,3±0,9	4,01±1,3	0,36±0,05	1,8±0,5	1,1±0,8 (18%)	–
Гибрид <i>E. tancrei</i> , ♂, 2n=50, NF=56	9	5,5±0,4	1,9±0,2	3,6±0,3	0,35±0,05	1,9±0,1	–	–
Гибрид <i>E. tancrei</i> , ♀, 2n=50, NF=56	9	7,4±2,3	2,6±0,8	4,9±1,6	0,35±0,02	1,9±0,2	0,8±0,3 (11%)	–
Гибрид <i>E. tancrei</i> , ♂, 2n=49, NF=56	6	6±0,4	2,2±0,1	3,8±0,36	0,36±0,02	1,8±0,1	–	0,7±0,2 (11%)
Гибрид <i>E. tancrei</i> , ♀, 2n=49, NF=56	6	7,3±4,4	2,4±0,95	4,9±3,6	0,34±0,08	2±0,7	1±1,6 (14%)	0,7±0,3 (9%)
Межвид. гибрид <i>E. talpinus</i> × <i>E. tancrei</i> * ♂, 2n=54, NF=55	10	5,5±0,5	1,9±0,1	3,6±0,4	0,35±0,02	1,9±0,1	–	–
Межвид. гибрид <i>E. talpinus</i> × <i>E. tancrei</i> * ♀, 2n=54, NF=55	10	7,3±1	2,5±0,4	4,8±0,7	0,34±0,01	1,9±0,1	–	–

Обозначения: L (length) – общая средняя длина СК субметацентриков; S.a. (short arm) – средняя длина короткого плеча; L.a. (long arm) – средняя длина длинного плеча; C.i. (centromere index) – центромерный индекс (C.i.=S.a./L); A.r. (arm ratio) – соотношение плеч (A.r.=L.a./S.a.); C.d. (centromere distance) – расстояние между центромерными сигналами (в скобках указано расстояние между центромерными сигналами в % от общей длины СК), C.d.1 – смещение «дополнительного» центромерного сигнала в сторону длинного плеча, C.d.2 – смещение «дополнительного» центромерного сигнала в сторону короткого плеча; N – количество промеренных СК; * – у межвидовых гибридов измерялись субметацентрические гомологи в структуре «гибридных» СК. Все показатели сопровождаются значениями стандартного отклонения (mean±SD).

элементов и формируются СК между гомологами. В средней пахитене наблюдаются 8 СК аутосом и один утолщенный унивалент X-хромосомы, который имеет неравномерные утолщения, выявляемые с помощью антител к белку SCP3- по своей длине и приобретает O- или U-подобные конфигурации. Ранее такая конфигурация X-унивалента выявлена электронно-микроскопически (Kolomiets et al., 1991). Вероятно, описанные особенности полового унивалента способствуют его изоляции от аутосом.

Также установлено, что в единичных сперматоцитах наблюдается ассоциация СК седьмой пары аутосом с половым унивалентом. По данным Кастро-Сиерры и Вульфа ассоциация аутосомных бивалентов и половых унивалентов наблюдалась в 26% сперматоцитов (Castro-Sierra, Wolf, 1968).

На стадии поздней пахитены и диплотены наблюдаются десинапсис и бреши в структуре аутосомных СК.

Особенности динамики ауtosомных СК-бивалентов слепушонок

На стадии пахитены в структуре СК в сперматоцитах и ооцитах слепушонок при иммуноокрашивании антителами к белку SCP3 наблюдалось чередование более ярких и менее ярких сегментов. Позже на стадиях поздней пахитены – ранней диплотены выявлены различия в динамике удаления белка SCP3 из структуры СК.

У самок *E. talpinus* элиминация белка SCP3 с СК происходит на стадии диплотены и сопровождается одновременным десинапсисом гомологов, поэтому бреши визуализируются главным образом на осевых элементах хромосом.

У самцов *E. talpinus*, начиная со стадии поздней пахитены, в структуре ауtosомных СК-бивалентов появляются бреши. Удаление белка SCP3 начинается с участков, соответствующих С- и G-бэндам митотических хромосом. Ранее эта закономерность в динамике белка SCP3 была описана у самцов *Mus musculus* и *Mesocricetus auratus* (Давтян, Коломиец, 2008).

Это наблюдение хорошо коррелирует с моделью, предложенной А. Чандли. Данная модель отражает особенности синапсиса хромосом в мейозе, в зависимости от того, на каком из участков хромосом, соответствующих R-, G- или С-бэндам митотических хромосом, осуществляется синапсис гомологов в профазе I мейоза. А. Чандли рассматривает рано реплицирующиеся участки, соответствующие R-бэндам, как сайты инициации синапсиса, и оценивает их как сайты эффективного синапсиса. Под эффективностью синапсиса подразумевается осуществление кроссинговера в участках, соответствующих R-бэндам митотических хромосом. Участки, соответствующие G-, и С-бэндам, поздно реплицируются в S-фазе, рассматриваются как участки неэффективного синапсиса (Chandley, 1986). Как следует из наших результатов, именно с участков СК, соответствующих G-, и С-бэндам митотических хромосом – сайтов неэффективного синапсиса – белок SCP3 удаляется в первую очередь.

ВЫВОДЫ:

1. Выявлены следующие признаки полового диморфизма в профазе I мейоза у *E. talpinus* и *E. tancrei* – видов с XX хромосомами, изоморфными по картине распределения G-бэндов, у самок и самцов

- а.** В ооцитах на стадии лептотены осевые элементы хромосом образуют конфигурацию «букета», в сперматоцитах такая конфигурация не выражена;
- б.** В ооцитах половые XX хромосомы синаптируют по всей длине полового бивалента, что свидетельствует о гомологии этих хромосом у самок;
- в.** В сперматоцитах половые XX хромосомы формируют СК только в прителомерных участках, что свидетельствует о гетероморфизме этих хромосом.

2. На основании проведенного впервые анализа синапсиса хромосом у самок и самцов гибридов F₁ между видами-двойниками *E. talpinus* (2n=54 NF=54) x *E. tancrei* (2n=54; NF=56) сделаны следующие выводы:

а. Получены доказательства, что наиболее вероятным механизмом появления неробертсоновского субметацентрика в кариотипе *E. tancrei* было формирование неоцентромеры в структуре акроцентрика предкового вида;

б. В большинстве ядер сперматоцитов гибридов выявлены признаки пахитенного ареста, что коррелирует с данными гистологического исследования ткани семенников гибридов и стерильностью межвидовых гибридов.

3. Впервые на основе анализа СК продемонстрирована монобрахиальная гомология робертсоновских субметацентриков у разных кариоморф слепушонок, что свидетельствует о независимости их формирования в разных популяциях *E. tancrei*.

4. Впервые проведено иммуноцитохимическое исследование СК у самцов *E. lutescens* ($2n=17$, X0) и выявлены специфические особенности в распределении белка SCP3 в структуре полового X-унивалента.

5. У внутривидовых гибридов и некоторых кариоморф *E. tancrei* в структуре СК неробертсоновского субметацентрика впервые выявлены дополнительные центромерные сигналы по обе стороны от основной центромеры, что косвенно свидетельствует о наличии в хромосомах этой пары кластеров неоцентромер.

6. Выявлена закономерность элиминации белка SCP3 из структуры СК – удаление этого белка начинается в сайтах хромосом, соответствующих C- и G-бэндам митотических хромосом.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Kolomiets O.L., Matveevsky S.N., Bakloushinskaya I.Yu. Sexual dimorphism in prophase I of meiosis in mole vole (*Ellobius talpinus* Pallas) with isomorphic (XX) chromosomes in males and females // Comparative Cytogenetics. 2010. Vol. 4. № 1. P. 55 – 66.

2. Баклушинская И.Ю., Романенко С.А., Графодатский А.С., Матвеевский С.Н., Ляпунова Е.А., Коломиец О.Л. Роль хромосомных перестроек в эволюции слепушонок рода *Ellobius* (Rodentia, Mammalia) // Генетика. 2010. Т. 46. № 9. С. 1290–1293.

3. Спангенберг В.Е., Дадашев С.Я., Матвеевский С.Н., Коломиец О.Л., Богданов Ю.Ф. Каким образом хромосомы прикрепляются к синаптонемным комплексам? // Генетика. 2010. Т. 46. № 10. С. 1363–1366.

Тезисы конференций:

4. Матвеевский С.Н., Баклушинская И.Ю., Ляпунова Е.А., Давтян А.Г., Коломиец О.Л. Половой диморфизм в профазе I мейоза у слепушонки *Ellobius talpinus* Pallas // В сб.: V съезд ВОГИС (Москва, 21–28 июня). Ч. II. 2009. С. 249.

- 5. Матвеевский С.Н.** Различия в структурной организации и поведении половых (XX) бивалентов у самцов двух видов-двойников рода *Ellobius* и гибридов между ними в профазе I мейоза // В сб.: Биология – наука XXI века: 13-ая Пущинская международная школа-конференция молодых ученых. Пущино, 28 сентября – 2 октября 2009 г. Пущино. 2009. С. 29.
- 6. Баклушинская И.Ю., Романенко С.А., Графодатский А.С., Матвеевский С.Н., Коломиец О.Л., Ляпунова Е.А.** Роль робертсоновских транслокаций в эволюции слепушонок рода *Ellobius* (Rodentia, Mammalia)// В сб.: Материалы международной конференции "Хромосома–2009". Новосибирск, 31 августа – 6 сентября 2009 г. Новосибирск. 2009. С. 60 – 61.
- 7. Богданов Ю.Ф., Дадашев С.Я., Спангенберг В.Е., Матвеевский С.Н., Коломиец О.Л.** ДНК-белковые взаимодействия и эволюция мейоза // В сб.: Материалы международной конференции "Хромосома–2009". Новосибирск, 31 августа – 6 сентября 2009 г. Новосибирск . 2009. С. 81.
- 8. Матвеевский С.Н.** Хромосомная "хореография" в профазе I мейоза // В сб.: Материалы XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2010». Секция «Генетика». М. 2010. С. 88.
- 9. Матвеевский С.Н., Баклушинская И.Ю., Ляпунова Е.А., Коломиец О.Л.** Нарушение мейоза у гибридов F₁ от скрещивания видов-двойников слепушонок (Rodentia, *Ellobius*) // В сб.: Материалы международной конференции "Целостность вида у млекопитающих: изолирующие барьеры и гибридизация". Петергоф, 12–17 мая 2010 г. Петергоф. 2010. С. 58.