



Синапсис и рекомбинация аутосом и половых хромосом у двух видов крачек (Sternidae, Charadriiformes, Aves)

А.П. Лисачев¹, Л.П. Малиновская^{1,2}, А.В. Друзяка³, П.М. Бородин^{1,2}, А.А. Торгашева¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

Интенсивность мейотической рекомбинации и закономерности распределения точек кроссинговера вдоль хромосом значительно варьируют между видами животных, в том числе близкородственными. Предложено несколько гипотез об адаптивном значении этих различий и их эволюции. Высказаны предположения о том, что рекомбинационные характеристики видов обусловлены филогенетической историей видов и их экологией. Однако большая часть исходных данных получена на млекопитающих, у которых характеристики рекомбинации находятся под влиянием значительной кариологической изменчивости. В этой связи изучение характеристик рекомбинации у таксонов с более стабильными кариотипами, таких как рептилии и птицы, представляется актуальным. В данной работе использовали метод флуоресцентной иммунолокализации белка бокового элемента синаптонемного комплекса (SYCP3), белков центромеры и белка мисматч-репарации MLH1, маркирующего сайты кроссинговера, на препаратах распластанных профазных ооцитов для изучения особенностей синапсиса и рекомбинации у двух видов птиц – черной крачки (*Chlidonias niger*) и речной крачки (*Sterna hirundo*). Мы впервые охарактеризовали кариотип *Ch. niger* ($2n = 74$, FN = 94), уточнили описание кариотипа *S. hirundo* ($2n = 68$, FN = 90) и идентифицировали предположительные перестройки, отличающие кариотипы данных видов друг от друга. Обнаружено, что черная и речная крачки достоверно отличаются по среднему числу кроссоверов на клетку (53.0 ± 4.2 у черной и 44.1 ± 5.0 у речной крачек) и по распределению кроссоверов на гомологичных хромосомах. Показано, что различия по числу кроссоверов обусловлены различиями в длине синаптонемных комплексов – суммарной длине аутосомных комплексов и длине индивидуальных бивалентов. Было установлено, что на число обменов и различия в их распределении влияют хромосомные перестройки: различие рекомбинационных характеристик между перестроенными гомеологами было выше, чем между неперестроенными. Мы описали особенности синапсиса гетероморфных Z- и W-хромосом, локализовали псевдоаутосомный район и оценили его физический размер. Выяснено, что несмотря на перестройки аутосом, отличающие друг от друга указанные виды, строение и синаптические характеристики половых хромосом не изменились за 9 млн лет, прошедших со времени дивергенции родов *Sterna* и *Chlidonias*.

Ключевые слова: Sternidae; мейоз; иммуноокрашивание; синаптонемные комплексы; хромосомные перестройки; половые хромосомы.

Synapsis and recombination of autosomes and sex chromosomes in two terns (Sternidae, Charadriiformes, Aves)

A.P. Lisachov¹, L.P. Malinovskaya^{1,2}, A.V. Druzyaka³, P.M. Borodin^{1,2}, A.A. Torgasheva¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Animal Systematics and Ecology SB RAS, Novosibirsk, Russia

The frequency of recombination and the patterns of crossover site distribution along the chromosomes vary considerably among animal species, including closely related species. Several hypotheses concerning the adaptive value and evolution of these variations were proposed. It was supposed that the recombination patterns of the species' genomes are influenced by their phylogenetic history and ecology. However, most original data were obtained from mammals. The mammals show high karyological variability, which strongly influences the recombination patterns. Therefore it is important to study recombination rate and distribution in more karyologically stable taxa, such as reptiles and birds. We used immunolocalization of SYCP3, the protein of the lateral element of the synaptonemal complex (SC), centromere proteins and the mismatch-repair protein MLH1, which is associated with the recombination nodules, at the synaptonemal complex spreads of prophase oocytes of two tern species, black tern (*Chlidonias niger*) and common tern (*Sterna hirundo*). We first described the karyotype of *Ch. niger* ($2n = 74$, FN = 94) and identified suggestive rearrangements by which its karyotype differs from that of *S. hirundo* ($2n = 68$, FN = 90). We found that these species significantly differed by the numbers of the MLH1 foci per cell (*Ch. niger*: 53.0 ± 4.2 ; *S. hirundo*: 44.1 ± 5.0). We showed that the difference in the crossover numbers per cell was determined by the difference in the SC length (total and of individual bivalents) and by chromosomal rearrangements, which also influenced the distributions of crossover sites along the chromosomes. The difference in recombination patterns was higher between the rearranged homeologues than between the non-rearranged ones. We investigated the synaptic patterns of the heteromor-

Received 03.02.2017

Accepted for publication 14.02.2017

© AUTHORS, 2017

A.P. Lisachov and L.P. Malinovskaya equal contribution to manuscript preparation.

e-mail: lisachev@bionet.nsc.ru; l.malinovskaia@g.nsu.ru

phic Z and W chromosomes, localized the pseudoautosomal regions and estimated their lengths. In spite of several autosomal rearrangements, which differentiate these species, the structure and synaptic patterns of the sex chromosomes have not changed over 9 MY, which have passed since the moment of divergence between the genera *Sterna* and *Chlidonias*.

Key words: Sternidae; meiosis; immunostaining; synaptonemal complex; chromosomal rearrangements; sex chromosomes.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Лисачев А.П., Малиновская Л.П., Друзяка А.В., Бородин П.М., Торгашева А.А. Синапсис и рекомбинация аутосом и половых хромосом у двух видов крачек (Sternidae, Charadriiformes, Aves). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(2):259-268. DOI 10.18699/VJ17.245

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Lisachov A.P., Malinovskaya L.P., Druzyaka A.V., Borodin P.M., Torgasheva A.A. Synapsis and recombination of autosomes and sex chromosomes in two terns (Sternidae, Charadriiformes, Aves). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(2):259-268. DOI 10.18699/VJ17.245

Мейотическая рекомбинация, или кроссинговер, играет две основные роли в половом размножении. Во-первых, для правильной сегрегации гомологичных хромосом в первом делении мейоза необходимо наличие как минимум одного кроссовера на хромосому. Во-вторых, рекомбинация перестраивает сочетания аллелей на гомологичных хромосомах, увеличивая генетическое разнообразие потомства (Eyre-Walker, Hurst, 2001). Число и распределение кроссоверов вдоль хромосомы зависят от ее длины, структуры хроматина и интерференции (Pardo-Manuel de Villena, Sapienza, 2001; Lynn et al., 2002). Чем длиннее хромосома, тем больше кроссоверов на ней образуется. В эухроматине рекомбинация выше, чем в гетерохроматине (McKee, Handel, 1993). Явление интерференции заключается в том, что возникновение кроссоверного обмена понижает вероятность возникновения другого обмена рядом с ним (Kleckner et al., 2004). Рекомбинация обычно подавляется в районе, прилегающем к центромере (Youds, Boulton, 2011).

Характеристики уровня рекомбинации и распределения кроссоверов на хромосомах изучены у многих видов млекопитающих (Segura et al., 2013; Dumont, 2017). Обнаружено, что у них количество обменов на клетку и их распределение по длине хромосом значительно варьируют. Существует ряд объяснений такой вариации, связанных с филогенией (Segura et al., 2013), экологией (Otto, Michalakis, 1998), динамикой популяций (Barton, Otto, 2005). Однако млекопитающие характеризуются большим разнообразием кариотипов, а различия в числе и строении хромосом оказывают значительное влияние на рекомбинацию (Pardo Manuel de Villena, Sapienza, 2001). Поэтому для лучшего понимания эволюционной роли интенсивности рекомбинации и распределения рекомбинационных событий на хромосомах актуально изучение других групп позвоночных, в частности птиц. Птицы имеют крайне стабильные кариотипы по сравнению с млекопитающими (Ellegren, 2010), следовательно, в вариацию между видами птиц по характеристикам рекомбинации кариологические различия вносят намного меньший вклад.

Для некоторых видов птиц характеристики рекомбинации уже описаны (Pigozzi, Solari, 1999; Pigozzi, 2001; Calderon, Pigozzi, 2006; del Priore, Pigozzi, 2016). Обнаружено, что частота рекомбинации у них, как правило,

значительно выше, чем у млекопитающих. Однако число исследованных видов птиц на настоящий момент невелико и составляет около полутора десятков. Особый интерес представляет сравнение рекомбинации у родственных видов птиц. Оно позволит выявить изменения характеристик рекомбинации на небольших эволюционных промежутках.

Важное отличие птиц от млекопитающих – наличие ZW-системы половых хромосом (Graves, 2014). Z-хромосома курицы, модельного вида птиц, – макрохромосома, шестая по порядку длины; W-хромосома курицы меньше и содержит большое количество гетерохроматина. У других видов птиц ZW-хромосомы гомологичны половым хромосомам курицы. Это показано хромосомным пейнтингом и генетическим картированием (Nanda et al., 1999, 2008; Shetty et al., 1999).

Относительная длина псевдоаутосомного и дифференцированного районов варьирует в разных группах птиц. У более древних бескилевых птиц, таких как страус нанду (*Rhea americana*), псевдоаутосомный район может занимать до 80 % длины половых хромосом (Pigozzi, Solari, 1997). У новонёбных птиц его длина обычно намного меньше, он занимает лишь концевой район одного из плеч Z- и W-хромосом (Zhou et al., 2014).

В мейозе у самок птиц половые хромосомы синаптируют по всей длине, несмотря на отсутствие гомологии и разницу в размерах, в отличие от XY-хромосом млекопитающих, которые синаптируют не полностью (Turner, 2007). Длинная Z- и короткая W-хромосомы начинают спариваться в гомологичном псевдоаутосомном районе. Затем Z-хромосома укорачивается и оборачивается вокруг W-хромосомы, после этого происходит полное спаривание. В конце пахитены и в диплотене десинапсис половых хромосом происходит в обратном порядке: сначала расплетаются негомологичные участки, а затем псевдоаутосомный район (Solari, 1992; Solari, Pigozzi, 1993).

В отличие от XY-хромосом млекопитающих, которые могут подвергаться значительным модификациям (утрата рекомбинации и полный асинапсис в мейозе (Borodin et al., 2012), добавление новых фрагментов аутосом (Zhou et al., 2008), утеря Y-хромосомы (Kolomiets et al., 1991; Matveevsky et al., 2016)), ZW-хромосомы птиц более консервативны. Известен лишь один пример транслокации на

них аутосомного материала (Pala et al., 2012). Однако относительно малое число видов птиц, у которых строение Z- и W-хромосом изучено современными методами, не позволяет детально описать разнообразие и эволюцию половых хромосом в различных отрядах и семействах. Анализ синапсиса и рекомбинации в мейозе – один из лучших методов исследования половых хромосом, так как выявляет локализацию и границы псевдоаутосомных и дифференцированных районов. Таким образом, изучение мейотического поведения половых хромосом у неисследованных в этом отношении видов птиц представляет значительный интерес.

В качестве модельных видов для изучения рекомбинации у родственных видов птиц и строения половых хромосом мы выбрали два вида крачек (Sternidae, Charadriiformes) – речную (*Sterna hirundo*) и черную (*Chlidonias niger*). По данным секвенирования генов мтДНК, время дивергенции между ними составляет 8–9 млн лет (Bridge et al., 2005). Эти птицы широко распространены и многочисленны, хорошо известны их биология и экология. У данных видов различаются составы употребляемых кормов, генетическая и пространственная структуры популяций (Szczys et al., 2012, 2016). Однако кариотип *S. hirundo* ранее был исследован лишь при помощи рутинной окраски (Hammar, 1970), а кариотип *Ch. niger* не был охарактеризован, аутосомы и половые хромосомы не описаны.

Для анализа характеристик рекомбинации аутосом и половых хромосом у крачек использовали иммунолокализацию белка бокового элемента синаптонемного комплекса (СК) SYCP3, белков центромеры и белка мисматч-репарации MLH1, маркирующего зрелые рекомбинационные узелки (Anderson et al., 1999).

Материалы и методы

В качестве материала для исследования использованы самки в возрасте 1–3 суток, отловленные на Карасукской биостанции Института систематики и экологии животных СО РАН (окрестности г. Карасук, Новосибирская область). Отлов, содержание и эвтаназию проводили в соответствии с протоколами, одобренными Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

Препараты СК готовили по методике А.Н. Peters с коллегами (1997). Выделенные яичники помещали в гипотонический экстракционный буфер (30 мМ Трис, 50 мМ сахарозы, 17 мМ цитрата натрия, 5 мМ ЭДТА, pH = 8.2) на 30–60 мин. Затем фрагменты яичника мацерировали в 40 мкл раствора 100 мМ сахарозы при pH = 8.2. Остатки стромы яичника удаляли, а суспензию наносили порциями по 20 мкл на предметные стекла, смоченные в 1 % растворе параформальдегида, и распределяли наклоном стекла. Затем препарат оставляли сушиться во влажной камере в течение 1–2 ч. Высушенные препараты промывали в 0.4 % Kodak PhotoFlo.

Иммуноокрашивание проводили по методике L.K. Anderson с коллегами (1999) с небольшими модификациями. На препараты наносили 500 мкл 10 % PBT (PBS (фосфатно-солевой буфер), 0.05 % Tween-20, 3 % BSA (Sigma-Aldrich, США)) для блокирования неспецифичного связывания антител и выдерживали в течение 45 мин. Затем

инкубировали 12 ч при 4 или 37 °С с поликлональными антителами кролика к SYCP3 человека (Abcam, Великобритания) при разведении 1 : 1000, моноклональными антителами мыши к белку MLH1 человека (Pharmingen, США) при разведении 1 : 50, антителами человека к белкам центромеры человека (Sigma-Aldrich) при разведении 1 : 100 в PBT. Препараты отмывали три раза по 15 мин в PBS с 0.1 % Tween-20 и инкубировали 60 мин при 37 °С с антителами осли к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с флуоресцентной меткой Cy3 (Jackson Laboratories, США) в разведении 1 : 200, антителами козы к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с флуоресцентной меткой FITC (Jackson Laboratories, США) в разведении 1 : 400, антителами козы к иммуноглобулинам человека, конъюгированными с флуоресцентной меткой AMCA (Vector Laboratories, США) в разведении 1 : 100, согласно стандартному протоколу. Препараты отмывали в PBS, высушивали, наносили 15 мкл раствора антифэйда (Vectashield; Vector Laboratories, США) для предотвращения гашения флуоресценции и накрывали покровным стеклом.

Микроскопический анализ проводили в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Препараты анализировали на микроскопе Axioptan 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 использованием пакета Corel PaintShop Photo Pro X3.

Длины хромосом и относительного положения точек рекомбинации измеряли при помощи программы Micro-Measure 3.3 (Reeves, 2001). Статистические тесты проводили с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft). Средние значения длин СК и числа сайтов MLH1 приведены со стандартными отклонениями (\pm S.D.).

Результаты и обсуждение

Кариотипы исследованных видов. Ранее кариотип черной крачки не был описан. В ооцитах черной крачки присутствовали 37 бивалентов (36 аутосомных и ZW-бивалент, $2n = 74$, FN = 94). Среди аутосомных бивалентов отмечено 14 макрохромосом и 22 микрохромосомы. Суммарная длина аутосом составила 288.3 ± 47.5 мкм (рис. 1, а, б). Длины, морфология и условные обозначения макробивалентов черной крачки представлены в табл. 1.

Наряду с хромосомами, которые можно идентифицировать однозначно, присутствовали три группы хромосом с одинаковым размером и морфологией: акроцентрики 5–6, метацентрики 7–10 и акроцентрики 11–14. Микрохромосомы имели длину 2–5 мкм, из 22 микрохромосом 3 были метацентрическими, остальные – акроцентрическими.

У черной крачки клеток с полным асиапсисом половых хромосом не обнаружено, поэтому было невозможно точно измерить свободные Z- и W-хромосомы. Z-хромосома на ранних стадиях синапсиса была близка по размеру хромосоме 2 (максимальная длина 32.4 мкм), ее центромерный индекс (ЦИ) составлял 0.45 ± 0.04 . W-хромосома на ранних стадиях синапсиса имела длину примерно 50 % от

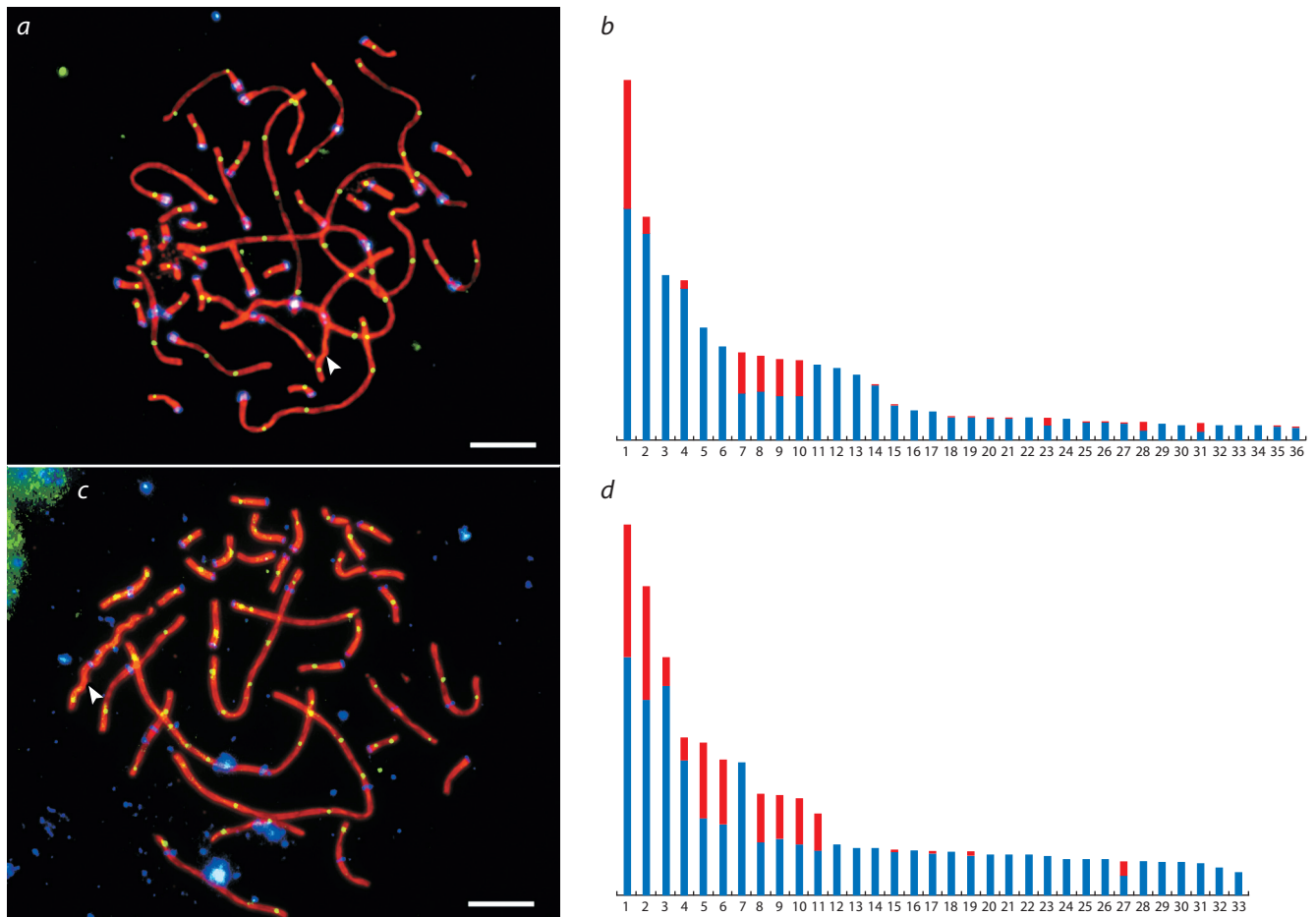


Fig. 1. Chromosome sets of the black (*a, b*) and common (*c, d*) terns.

(*a, c*) Pachytene oocytes. Red, SYCP3; green, MLH1; blue, centromere. The arrow shows the sex bivalent. Scale bar 5 μm . (*b, d*) Idiograms of the autosomal sets. Red, short arm; blue, long arm.

Table 1. Macroivalents in the black and common terns

Bivalent	CI	Length		Number of MLH1 foci
		absolute, μm	relative, %*	
<i>Chlidonias niger</i>				
CNI1	0.34 ± 0.04	47.3 ± 9.7	16.2	5.1 ± 1.3
CNI2	0.08 ± 0.01	27.5 ± 5.3	9.5	3.2 ± 0.9
CNI3	0	22.5 ± 4.1	7.8	2.7 ± 0.8
CNI4	0.04 ± 0.01	19.4 ± 3.6	6.7	2.5 ± 0.7
CNI5-6	0	14.7 ± 2.8	5.1	2.1 ± 0.5
CNI7-10	0.45 ± 0.03	10.9 ± 1.9	3.8	1.8 ± 0.5
CNI11-14	0	8.9 ± 1.8	3.1	1.5 ± 0.4
<i>Sterna hirundo</i>				
SHI1	0.35 ± 0.02	36.5 ± 7.6	15.2	4.2 ± 1.2
SHI2	0.36 ± 0.02	28.6 ± 6.0	12.0	3.6 ± 1.1
SHI3	0.09 ± 0.01	22.1 ± 4.6	9.2	2.8 ± 0.9
SHI4	0.15 ± 0.02	14.4 ± 3.0	6.1	1.8 ± 0.7
SHI5-6	0.48 ± 0.02	12.9 ± 2.7	5.4	2.0 ± 0.5
SHI7	0	12.0 ± 2.4	5.0	1.9 ± 0.6
SHI8-11	0.47 ± 0.02	8.2 ± 1.3	3.5	1.5 ± 0.5

* Autosomal SC length basis.

длины Z-хромосомы (15.4 ± 2.8 мкм) и имела ЦИ 0.35 ± 0.04 .

Кариотип речной крачки включал 34 бивалента ($2n = 68$, FN = 90), среди которых 33 аутосомных и ZW-бивалент. Он соответствовал кариотипу, описанному ранее (Hammar, 1970). Среди аутосомных бивалентов 11 представляли собой макрохромосомы, 22 – микрохромосомы. Общая длина СК аутосом составила 237.9 ± 38.9 мкм (см. рис. 1, в, з). Длины, ЦИ и условные обозначения макрохромосом речной крачки приведены в табл. 1.

У речной крачки также наблюдались как надежно идентифицируемые хромосомы, так и группы морфологически неразличимых хромосом – метацентрики 5–6 и акроцентрики 8–11. Длина микробивалентов, как и у черной крачки, составляет 2–5 мкм. Из 22 пар микрохромосом 21 пара является акроцентрической, а одна – метацентрической.

Длина свободной Z-хромосомы до спаривания (или после десинапсиса) составила 23.2 ± 4.3 мкм, ее ЦИ был равен 0.44 ± 0.05 . Несинаптированная W-хромосома имела абсолютную длину 10.3 ± 2.6 мкм и ЦИ 0.36 ± 0.04 .

Предковый кариотип птиц, предположительно, характеризовался гаплоидным числом хромосом $n = 40$, включающим приблизительно 10 макро- и 30 микрохромосом (Burt, 2002; Griffin et al., 2007; Ellegren, 2009; Romanov et al., 2014). Данный кариотип или близкие к нему ($n = 38–42$) сохраняются у двух третей исследованных видов птиц. Кариотипы крачек, описанные нами ($n = 34, 37$), выходят за пределы этой вариации, однако близки к предковым для птиц значениям. Отклонения от предкового кариотипа характерны, помимо крачек, для дневных хищников, попугаев ($n = 25$) (Ellegren, 2010), а также авдотковых (Burhinidae), принадлежащих к тому же, что и крачки, отряду ржанкообразных ($n = 21$) (Nie et al., 2015).

С целью реконструкции хромосомных перестроек, которые обусловили различия между кариотипами черной и речной крачек, мы сопоставили ЦИ и размеры их бивалентов. Для восьми хромосом черной крачки найдены аналоги среди хромосом речной крачки. Это хромосома 1 (CNI1 и SHI1),

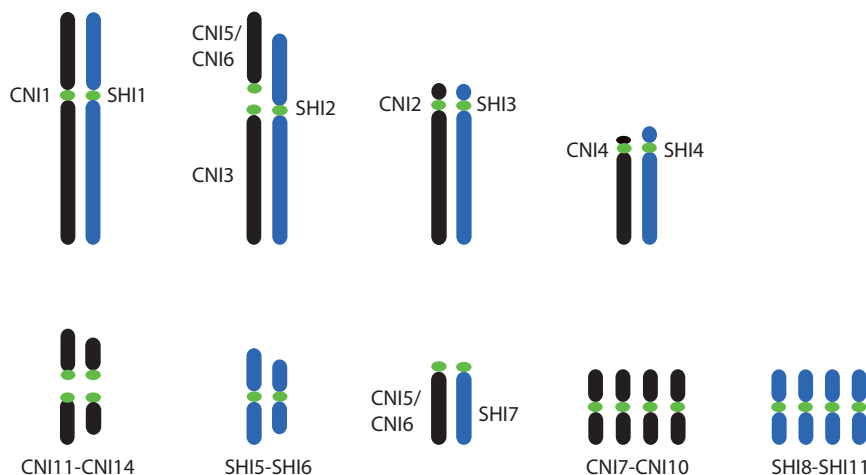


Fig. 2. The presumed homeologous correspondence between the macrochromosomes of the black tern (*Chlidonias niger*, CNI) and the common tern (*Sterna hirundo*, SHI).

The lengths of the chromosomes correspond to their relative lengths in the karyotypes.

средние субacroцентрические хромосомы (CNI2 и CNI4, SHI3 и SHI4), одна малая акроцентрическая хромосома (CNI5 или CNI6 и SHI7) и группа из четырех малых метацентрических хромосом (CNI7–CNI10 и SHI8–SHI11). CNI4 и SHI4 при сходном размере имеют разный ЦИ (0.04 у черной крачки и 0.15 – у речной). Это может быть вызвано смещением центромеры или перицентрической инверсией. При одинаковом числе микрохромосом у черной крачки три из них – метацентрики, а у речной только одна. Это также может быть связано с инверсиями или смещением центромеры.

Для шести макрохромосом черной крачки (acroцентрической хромосомы CNI3, одной из средних акроцентрических хромосом CNI5 или CNI6 и малых акроцентрических хромосом CNI11–CNI14) аналогов в кариотипе речной крачки не обнаружено. В кариотипе черной крачки отсутствовали аналоги трех макрохромосом речной крачки (субметацентрической хромосомы SHI2, метацентрической хромосомы SHI5 и SHI6). Можно предположить, что шесть акроцентрических хромосом черной крачки гомологичны трем субметацентрическим и метацентрическим хромосомам речной крачки. Сопоставление размеров хромосом позволяет предположить, что плечи малых метацентриков SHI5, SHI6 соответствуют четырем акроцентрикам CNI11–CNI14, q-плечо субметацентрика SHI2 – акроцентрику CNI3, а его p-плечо – одному из акроцентриков, CNI5 или CNI6 (рис. 2).

Следовательно, макрохромосомные фракции кариотипов исследованных видов крачек, вероятно, отличаются друг от друга тремя слияниями или разделениями хромосом и как минимум одной перицентрической инверсией или смещением центромеры. Так как кариотип речной крачки близок к кариотипу чайки *Larus fuscus*, вида из другого семейства того же подотряда Lariformes в составе отряда ржанкообразных (Hammar, 1970), мы предполагаем, что ее кариотип соответствует кариотипу общего предка двух видов, а кариотип черной крачки возник за счет разделения предковых метацентрических хромосом от него. Для проверки этого предположения необходимо исследовать другие виды крачек с использованием хромосомного пэйнтинга.

Существует несколько гипотез о причинах стабильности кариотипов птиц. Одна из них связывает малое число перестроек с потерей повторенных последовательностей при уменьшении размера генома. Как известно, хромосомные перестройки чаще происходят в локусах tandemных повторов. Также предполагают, что у птиц во время мейотического чекпойнта элиминируются почти все клетки, гетерозиготные по перестройкам, что делает носителей измененных кариотипов стерильными. Еще одно возможное объяснение состоит в адаптивности разбиения генома на большое количество хромосом для увеличения частоты рекомбинации генов (Griffin, Burt, 2014; Romanov

Table 2. Recombination characteristics in birds

Species	<i>n</i>	<i>C</i> , pg	SC length, μm	MLH1 number per cell	Genetic map length, cM	MLH1 per μm	Recombination rate, cM/Mb	Reference
<i>Anser anser</i>	40	1.30	283±41	73.6±7.8	3682	0.24	2.9	Torgasheva, Borodin, 2017
<i>Anas platyrhynchos</i>	40	1.44	–	55.9±3.8	2845	–	2.0	del Priore, Pigozzi, 2016
<i>Columba livia</i>	40	1.54	228±22	62.7±4.9	3135	0.26	2.2	Pigozzi, Solari, 1999
<i>Gallus gallus</i>	39	1.25	163	65.0±4.0	3251	0.40	2.7	Pigozzi, 2001
<i>Taenopygia guttata</i>	39	1.25	154±25	45.7±0.4	2285	0.30	1.9	Calderon, Pigozzi, 2006
<i>Coturnix japonica</i>	39	1.35	239±34	55.3±2.1	2765	0.23	2.1	»
<i>Sterna hirundo</i>	34	1.40*	238±39	44.1±5.0	2254	0.19	1.6	This work
<i>Chlidonias niger</i>	37	1.40*	288±47	53.0±4.2	2700	0.18	2.0	»

*the value for the related species *Thalasseus sandvicensis* is used (Gregory, 2016), because the values for the studied species are unknown.

et al., 2014). Мы считаем более правдоподобной первую гипотезу. Стерильности гетерозигот по перестройкам из-за элиминации клеток с нарушениями синапсиса во время пахитенного чекпойнта противоречит существование перестроенных кариотипов у многих видов птиц, в том числе обнаруженное нами различие между двумя видами крачек. Разделение генома на большое количество хромосом для увеличения эффективности рекомбинации может быть обеспечено и при значительном числе межхромосомных перестроек.

Причины ускоренной хромосомной эволюции в некоторых линиях птиц также остаются неясными. Необходимо исследовать кариотипы большего числа видов крачек, чтобы оценить реальное количество перестроек в данном семействе и возможную их роль в видообразовании.

Интенсивность рекомбинации в геномах крачек.

У черной крачки общее число сайтов MLH1 на аутосомных бивалентах составило 53.0 ± 4.2 , у речной крачки – 44.1 ± 5.0 . Для получения полной длины генетической карты аутосомное число сайтов MLH1 умножили на 50 (1 кроссовер – 50 сантиморганов (сМ)) и добавили 50 сМ для облигатного обмена половых хромосом. Таким образом, длина рекомбинационной карты черной крачки составила 2700 сМ, речной – 2254 сМ. Разница по числу сайтов MLH1 у черной и речной крачек обусловлена разницей в длине СК, что доказывается практически одинаковыми значениями плотности сайтов MLH1: 0.18 сайтов на 1 мкм СК у обоих видов. Положительная корреляция уровня рекомбинации с общей длиной СК и отношением длины СК к размеру генома (степенью декомпактизации хромосом в пахитенных клетках) установлена для выборки видов позвоночных из разных классов (Peterson et al., 1994).

Значения интенсивности рекомбинации, полученные для исследованных видов крачек, находятся в пределах вариации интенсивности рекомбинации у класса птиц. Интенсивность рекомбинации у птиц в целом выше, чем у других исследованных видов позвоночных (в основном млекопитающих) (табл. 2). Это также связывают с большей суммарной длиной СК, чем у млекопитающих (несмотря на меньший размер генома), а также с большим

числом хромосом (Peterson et al., 1994; Pigozzi, 2001). Кроме того, высокая интенсивность рекомбинации связана с небольшой силой межкроссоверной и центромерной интерференции: у птиц слабо выражено подавление кроссинговера в центромерном районе (del Priore, Pigozzi, 2016).

Эволюционное значение высокого уровня рекомбинации у птиц может быть связано с высокой конкуренцией внутри вида, в том числе половым отбором, большой подвижностью (следовательно, обитанием в разнообразных условиях).

Два исследованных вида крачек характеризуются заметными экологическими различиями. У речной крачки более разнообразная подвидовая структура: Евразию населяют четыре подвида. У черной крачки всю Евразию населяет один подвид (Olsen, Larsson, 1995). У речной крачки выше генетическая дифференциация между популяциями (F_{ST} составляют соответственно 0.02–0.33 и 0.03–0.12) (Szczys et al., 2012, 2016).

Возможно, более высокий уровень рекомбинации у черной крачки связан с более широким ареалом, требующим адаптации к разным условиям. Более низкая интенсивность рекомбинации у речной крачки может играть роль в ограничении потока генов между подвидами и популяциями. Черная крачка также характеризуется более непредсказуемой и вариабельной кормовой базой, так как в ее рацион обязательно должны входить беспозвоночные (Gilbert, Servello, 2005).

Рекомбинация отдельных аутосом. Мы оценили частоту и распределение сайтов рекомбинации на отдельных макробивалентах и группах макробивалентов. Средние числа сайтов MLH1 на отдельных макробивалентах черной и речной крачек приведены в табл. 1. Для всех бивалентов установлена линейная корреляция между длиной СК и числом сигналов MLH1 (коэффициент детерминации $R^2 = 0.997$ у черной крачки и $R^2 = 0.989$ у речной крачки). Для анализа распределения обменов вдоль макрохромосом разделили их плечи на равные интервалы, соответствующие 1 мкм средней длины плеча. В каждом интервале подсчитали долю расположенных на нем локусов MLH1 от общего числа локусов на данном биваленте во всех клетках, отдельно учитывая биваленты с

разным числом кроссоверов (рис. 3). Распределениям обменов вдоль бивалентов характерны прителомерные пики, типичные для большинства позвоночных (Mary et al., 2014). Их формирование связано с тем, что в лептотене первыми сближаются дистальные районы хромосом, образуя «теломерный букет», что способствует инициации рекомбинации (Zickler, Kleckner, 2015). Прителомерные пики рекомбинации были сильнее выражены на бивалентах небольшого размера. У акроцентрических бивалентов прителомерный пик рекомбинации наблюдался также в проксимальном (прицентромерном) районе (см. рис. 3). Вероятно, возникновение этого пика связано со слабой центромерной интерференцией.

Инициация синапсиса и рекомбинации в теломерах также может объяснять разницу в распределении сайтов MLH1 вдоль плеч, предположительно, вовлеченных в хромосомные перестройки. Проксимальный (прицентромерный) рекомбинационный пик был характерен для плеч акроцентрических хромосом черной крачки и отсутствовал в тех же плечах, которые входили в состав метацентрической хромосомы у речной крачки. Это подтверждает предположение о том, что паттерн распределения рекомбинационных обменов в большей степени определяется морфологией хромосомы, а не генетическим содержанием отдельных ее районов (Gorlov et al., 1991).

При сравнении частоты кроссинговера в элементах, которые у обоих видов крачек являются отдельными хромосомами, обнаружено, что различия между ними также обусловлены морфологией. Заметные различия отмечены в распределении кроссоверов на хромосоме 4 обоих видов (см. рис. 3). У речной крачки она имеет центромерный индекс 0.15, а у черной – 0.04. У черной крачки она ведет себя почти как акроцентрическая хромосома CNI3, имея два выраженных терминальных пика рекомбинации, а у речной крачки терминальный пик у прицентромерного конца выражен слабо и распределением обменов эта хромосома похожа на субacroцентрик SHI3. Это может быть связано с супрессией рекомбинации вблизи центромеры. У CNI3 и CNI4 центро-

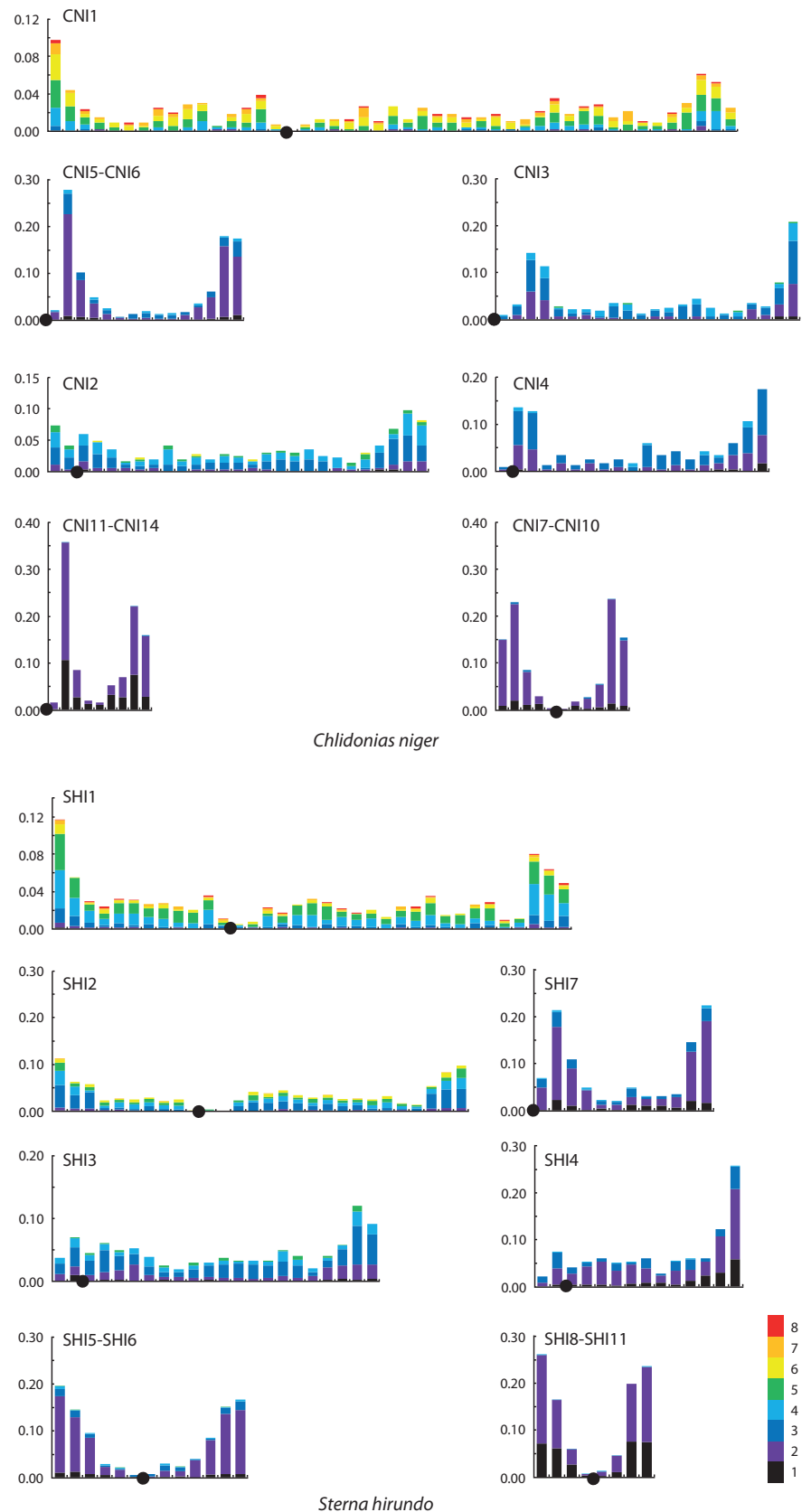


Fig. 3. The distribution of MLH1 foci along the macrobivalents of the black (*Ch. niger*) and common (*S. hirundo*) terns. The X axis shows the positions of MLH1 foci along the macrochromosomal SCs in relation to the centromere (black circle). One scale division represents a segment of the average length of each SC, which is 1 μ m. The Y axis shows the proportion of MLH1 foci in each interval. Different colors show bivalents with different MLH1 numbers, from 1 to 8.

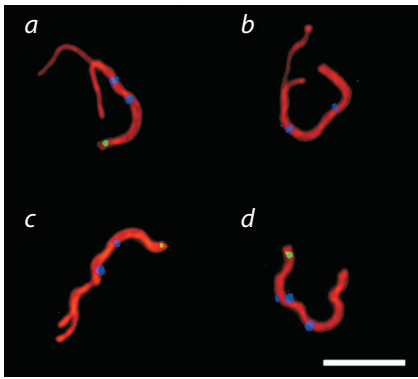


Fig. 4. The stages of sex bivalent synapsis in the common tern.

Red, SYCP3; green, MLH1; blue, centromere. Scale bar 5 μ m.

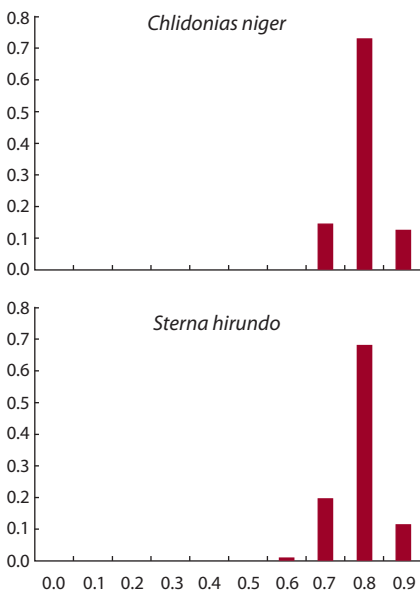


Fig. 5. The relative positions of the MLH1 foci on the short arm of the W chromosome in the black (*Ch. niger*) and common (*S. hirundo*) terns.

The X axis shows the relative distance from the centromere. The Y axis shows the proportion of bivalents that contain an MLH1 focus in the given interval.

мера, располагаясь близко к концу хромосомы, почти не накладывается на прителомерный пик рекомбинации, расположенный дистальнее. У SHI3 и SHI4 центромера находится дальше от конца хромосомы и накладывается на прителомерный пик рекомбинации, подавляя его за счет центромерной интерференции.

Обнаружено, что перестройки влияют на число кроссоверов на бивалентах. Так как биваленты черной

крачки длиннее соответствующих бивалентов речной крачки, обменов на них больше. Биваленты черной крачки, не вовлеченные в перестройки, имеют в среднем на 20 % больше обменов, чем их гомеологи речной крачки. Для перестроенных сегментов суммарное число обменов на двух акроцентриках черной крачки в среднем на 45 % больше, чем на гомологичном метацентрике речной крачки. Эти различия, по-видимому, обусловлены необходимостью как минимум одного кроссовера для упорядоченного расхождения гомологов в анафазе мейоза. Две акроцентрические хромосомы должны содержать каждая по обмену, но когда они становятся плечами одной хромосомы, для их правильного расхождения достаточно одного обмена на любом из плеч. Этот фактор также вносит вклад в различие в общем уровне рекомбинации между черной и речной крачками.

Таким образом, мы выявили различие между черной и речной крачками по суммарной длине СК, числу и морфологии хромосом. Показано, что различия в распределении кроссоверных обменов на предположительно гомологичных друг другу хромосомах и хромосомных плечах изученных видов обусловлены, в первую очередь, различиями в их морфологии.

Синапсис и рекомбинация половых хромосом. Спаривание половых хромосом у речной и черной крачек было задержано по сравнению с аутосомами: во многих клетках наблюдались частично спаренные или неспаренные ZW-хромосомы при полностью синаптированных аутосомах. Всего в суммарной выборке из 259 ооцитов речной крачки было обнаружено 23 ооцита с несинаптированными половыми хромосомами. У черной крачки наблюдали только частично или полностью спаренные половые хромосомы. Точка инициации синапсиса находилась на конце короткого плеча W-хромосомы. Синапсис продолжался по всей длине W-хромосомы, затем происходила эквивализация оставшейся части Z-хромосомы: она компактизовалась и оборачивалась вокруг W-хромосомы (рис. 4). В итоге достигалось полное спаривание.

Локализация белка рекомбинации MLH1 позволила идентифицировать псевдоаутосомный район половых хромосом черной и речной крачек. Он располагался на терминальных сегментах короткого плеча W-хромосомы и одного из плеч Z-хромосомы в районе инициации синапсиса (см. рис. 4). Наиболее проксимальные сигналы MLH1 располагались на расстоянии 1.8 мкм от теломеры у черной крачки и 1.2 мкм – у речной крачки, наиболее дистальные – 0.3 мкм у черной и 0.2 мкм – у речной. Средние расстояния составили 0.8 ± 0.3 и 0.6 ± 0.2 мкм соответственно. Более 80 % сигналов MLH1 располагались у обоих видов на терминальных участках, составляющих 20 % от длины короткого плеча W-хромосомы (рис. 5).

У новонёбных птиц (Neognathae) строение половых хромосом достаточно консервативно по сравнению с бескилевыми птицами (Paleognathae), такими как страусы и тинаму, для которых характерны значительные межвидовые различия по длине псевдоаутосомного района (Pigozzi, Solari, 2005; Pigozzi, 2011).

Несмотря на перестройки аутосом, отличающие друг от друга исследованные нами виды, морфология половых хромосом, их синаптические и рекомбинационные характеристики, остались неизменными в течение 9 млн лет, прошедших со времени родов *Sterna* и *Chlidonias*. Более того, сходные особенности мейотического поведения ZW-хромосом описаны у домашней курицы (Pigozzi, 2001), зебровой амадины (Calderon, Pigozzi, 2006), японского перепела (Calderon, Pigozzi, 2006), домашней утки (del Priore, Pigozzi, 2016), домашнего гуся (Torgasheva, Borodin, 2017), т. е. видов, разделенных десятками миллионов лет независимой эволюции.

Похожая относительная консервативность X-хромосомы, которая реже аутосом вовлекается в межхромосомные перестройки, отмечена для млекопитающих и обычно объясняется X-специфичными механизмами дозовой компенсации, распространение которых на транслоцированный аутосомный фрагмент привело бы к вредному изменению экспрессии аутосомных генов (Nanda et al., 2008). К настоящему времени исследовано слишком мало видов птиц с перестроенными кариотипами, чтобы судить, действительно ли у птиц половые хромосомы вовлекаются в перестройки реже аутосом. Для прояснения этого вопроса необходимо исследовать строение и рекомбинацию половых

хромосом у большего числа видов в тех группах птиц, для которых характерна интенсивная хромосомная эволюция. Помимо крачек, к таким группам относятся, например, дневные хищники и попугаи.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0003 and the Russian Foundation for Basic Research, project 15-04-08389.

The authors are grateful to A.Yu. Zotov for help in animal entrapment, to E.A. Kizilova and M.I. Rodionova for assistance in bird dissection and mount preparation, and to the staff of the Shared Access Center for Microscopy of Biologic Objects, Novosibirsk for access to the equipment.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

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.

Barton N.H., Otto S.P. Evolution of recombination due to random drift. *Genetics*. 2005;169(4):2353-2370.

Borodin P.M., Basheva E.A., Torgasheva A.A., Dashkevich O.A., Golenishchev F.N., Kartavtseva I.V., Mekada K., Dumont B.L. Multiple independent evolutionary losses of XY pairing at meiosis in the grey voles. *Chromosome Res.* 2012;20:259-268.

Bridge E.S., Jones A.W., Baker A.J. A phylogenetic framework for the terns (Sternini) inferred from mtDNA sequences: implications for taxonomy and plumage evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2005;35(2):459-469.

Burt D.W. Origin and evolution of avian microchromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 2002;96(1-4):97-112.

Calderon P.L., Pigozzi M.I. MLH1-focus mapping in birds shows equal recombination between sexes and diversity of crossover patterns. *Chromosome Res.* 2006;14(6):605-612.

del Priore L., Pigozzi M.I. Meiotic recombination analysis in female ducks (*Anas platyrhynchos*). *Genetica*. 2016;144(3):307-312.

Dumont B.L. Variation and evolution of the meiotic requirement for crossing over in mammals. *Genetics*. 2017;205(1):155-168.

Ellegren H. Genomic evidence for a large-Z effect. *Proc. Biol. Sci.* 2009;276(1655):361-366.

Ellegren H. Evolutionary stasis: the stable chromosomes of birds. *Trends Ecol. Evol.* 2010;25(5):283-291.

Eyre-Walker A., Hurst L.D. The evolution of isochores. *Nat. Rev. Genet.* 2001;2(7):549-555.

Gilbert A.T., Servello F.A. Insectivory versus piscivory in Black Terns: implications for food provisioning and growth of chicks. *Waterbirds*. 2005;28(4):436-444.

Gorlov I.P., Ladygina T.Y., Serov O.L., Borodin P.M. Positional control of chiasma distribution in the house mouse. Chiasma distribution in mice homozygous and heterozygous for an inversion in chromosome 1. *Heredity*. 1991;66:453-458.

Graves J.A.M. Avian sex, sex chromosomes, and dosage compensation in the age of genomics. *Chromosome Res.* 2014;22(1):45-57.

Gregory T.R. Animal Genome Size Database. <http://www.genomesize.com> [2 декабря 2016].

Griffin D.K., Burt D.W. All chromosomes great and small: 10 years on. *Chromosome Res.* 2014;22(1):1-6.

Griffin D.K., Robertson L.B.W., Tempest H.G., Skinner B.M. The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetics. *Cytogenet. Genome Res.* 2007;117(1-4):64-77.

Hammar B.O. The karyotypes of thirty-one birds. *Hereditas*. 1970;65(1):29-58.

Kleckner N., Zickler D., Jones G.H., Dekker J., Padmore R., Henle J., Hutchinson J. A mechanical basis for chromosome function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004;101(34):12592-12597.

Kolomiets O.L., Vorontsov N.N., Lyapunova E.A., Mazurova T.F. Ultrastructure, meiotic behavior, and evolution of sex chromosomes of the genus *Ellobius*. *Genetica*. 1991;84(3):179-189.

Lynn A., Koehler K.E., Judis L., Chan E.R., Cherry J.P., Schwartz S., Seftel A., Hunt P.A., Hassold T.J. Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science*. 2002;296(5576):2222-2225.

Mary N., Barasc H., Ferchaud S., Billon Y., Meslier F., Robelin D., Calgao A., Loustau-Dudez A.-M., Bonnet N., Yerle M., Acloque H., Ducos A., Pinton A. Meiotic recombination analyses of individual chromosomes in male domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). *PLoS ONE*. 2014;9(6):e99123.

Matveevsky S., Bakloushinskaya I., Kolomiets O. Unique sex chromosome systems in *Ellobius*: How do male XX chromosomes recombine and undergo pachytene chromatin inactivation? *Sci. Rep.* 2016;6:29949.

McKee B.D., Handel M.A. Sex chromosomes, recombination, and chromatin conformation. *Chromosoma*. 1993;102(2):71-80.

Nanda I., Schlegelmilch K., Haaf T., Scharl M., Schmid M. Synteny conservation of the Z chromosome in 14 avian species (11 families) supports a role for Z dosage in avian sex determination. *Cytogenet. Genome Res.* 2008;122(2):150-156.

Nanda I., Shan Z., Scharl M., Burt D.W., Koehler M., Nothwang H.G., Grützner F., Paton I.R., Windsor D., Dunn I., Engel W., Staeheli P., Mizuno S., Haaf T., Schmid M. 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nat. Genet.* 1999;21(3):258-259.

Nie W., O'Brien P.C., Fu B., Wang J., Su W., He K., Bed'Hom B., Volobuev V., Ferguson-Smith M.A., Dobigny G., Yang F. Multidirectional chromosome painting substantiates the occurrence of extensive genomic reshuffling within Accipitriformes. *BMC Evol. Biol.* 2015;15(1):205.

Olsen K.M., Larsson H. Terns of Europe and North America. L.: Christopher Helm Publishers, 1995.

Otto S.P., Michalakis Y. The evolution of recombination in changing environments. *Trends Ecol. Evol.* 1998;13(4):145-151.

Pala I., Naurin S., Stervander M., Hasselquist D., Bensch S., Hansson B. Evidence of a neo-sex chromosome in birds. *Heredity*. 2012;108(1-3):264-272.

Pardo-Manuel de Villena F., Sapienza C. Recombination is proportional to the number of chromosome arms in mammals. *Mamm. Genome*. 2001;12(4):318-322.

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(1):66-71.

Peterson D.G., Stack S.M., Healy J.L., Donohoe B.S., Anderson L.K. The relationship between synaptonemal complex length and genome size in four vertebrate classes (Osteichthyes, Reptilia, Aves, Mammalia). *Chromosome Res.* 1994;2(2):153-162.

Pigozzi M.I. Distribution of MLH1 foci on the synaptonemal complexes of chicken oocytes. *Cytogenet. Genome Res.* 2001;95(3-4):129-133.

Pigozzi M.I. Diverse stages of sex-chromosome differentiation in tinamid birds: evidence from crossover analysis in *Eudromia elegans* and *Crypturellus tataupa*. *Genetica*. 2011;139(6):771-777.

Pigozzi M.I., Solari A.J. Extreme axial equalization and wide distribution of recombination nodules in the primitive ZW pair of *Rhea americana* (Aves, Ratitae). *Chromosome Res.* 1997;5(6):421-428.

Pigozzi M.I., Solari A.J. The ZW pairs of two paleognath birds from two orders show transitional stages of sex chromosome differentiation. *Chromosome Res.* 1999;7(7):541-551.

Pigozzi M.I., Solari A.J. Meiotic recombination in the ZW pair of a tinamid bird shows a differential pattern compared with neognaths. *Genome*. 2005;48(2):286-290.

- Reeves A. MicroMeasure: a new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome*. 2001;44(3):439-443.
- Romanov M.N., Farré M., Lithgow P.E., Fowler K.E., Skinner B.M., O'Connor R., Fonseca G., Backström N., Matsuda Y., Nishida C., Houde P., Jarvis E.D., Ellegren H., Burt D.W., Larkin D.M., Griffin D.K. Reconstruction of gross avian genome structure, organization and evolution suggests that the chicken lineage most closely resembles the dinosaur avian ancestor. *BMC Genomics*. 2014;15(1):1060.
- Segura J., Ferretti L., Ramos-Onsins S., Capilla L., Farré M., Reis F., Oliver-Bonet M., Fernández-Bellón H., García F., García-Caldés M., Robinson T.J., Ruiz-Herrera A. Evolution of recombination in eutherian mammals: insights into mechanisms that affect recombination rates and crossover interference. *Proc. Biol. Sci.* 2013; 280(1771):20131945.
- Shetty S., Griffin D.K., Graves J.A.M. Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosome Res.* 1999;7(4):289-295.
- Solari A.J. Equalization of Z and W axes in chicken and quail oocytes. *Cytogenet. Genome Res.* 1992;599(1):52-56.
- Solari A.J., Pigozzi M.I. Recombination nodules and axial equalization in the ZW pairs of the Peking duck and the Guinea fowl. *Cytogenet. Genome Res.* 1993;64(3-4):268-272.
- Szczys P., Lamothe K.A., Druzyaka A., Poot M.J., Siokhin V., van der Winden J. Range-wide patterns of population differentiation of Eurasian Black Terns (*Chlidonias niger niger*) related to use of discrete post-nuptial staging sites. *J. Ornithol.* 2016;1-14.
- Szczys P., Nisbet I.C.T., Wingate D.B. Conservation genetics of the Common Tern (*Sterna hirundo*) in the North Atlantic region; implications for the critically endangered population at Bermuda. *Conserv. Genet.* 2012;13(4):1039-1043.
- Torgasheva A.A., Borodin P.M. Immunocytological analysis of meiotic recombination in the gray goose (*Anser anser*). *Cytogenet. Genome Res.* 2017. DOI 10.1159/000458741.
- Turner J.M.A. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development*. 2007;134:1823-1831.
- Youds J.L., Boulton S.J. The choice in meiosis – defining the factors that influence crossover or non-crossover formation. *J. Cell Sci.* 2011;124(4):501-513.
- Zhou Q., Wang J., Huang L., Nie W., Wang J., Liu Y., Zhao X., Yang F., Wang W. Neo-sex chromosomes in the black muntjac recapitulate incipient evolution of mammalian sex chromosomes. *Genome Biol.* 2008;9:R98.
- Zhou Q., Zhang J., Bachtrog D., An N., Huang Q., Jarvis E.D., Gilbert M.T.P., Zhang G. Complex evolutionary trajectories of sex chromosomes across bird taxa. *Science*. 2014;346(6215):1246338.
- Zickler D., Kleckner N. Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2015; 7(6):a016626.