

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ И ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СПАРИВАНИЯ И РЕКОМБИНАЦИИ ХРОМОСОМ В МЕЙОЗЕ ЧЕТЫРЕХ ВИДОВ ПОЛЕВОК РОДА *MICROTUS* (ARVICOLINAE, RODENTIA)

П.М. Бородин^{1,2}, Е.А. Башева¹, Ф.Н. Голенищев³, О.А. Дашкевич²,
И.Н. Картавцева⁴, М.А. Потапов⁵, Г.Р. Сакаева², А.А. Торгашева¹, Л.В. Фрисман^{4,6}

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: borodin@bionet.nsc.ru;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

³ Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток, Россия;

⁵ Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия;

⁶ Институт комплексного анализа региональных проблем ДВО РАН, Биробиджан, Россия

Целью данной работы был анализ спаривания и рекомбинации хромосом в мейозе у самцов 4 видов полевок рода *Microtus* (*M. tujanensis*, *M. maximowiczii*, *M. rossiaemeridionalis* и *M. gregalis*). Исследование было проведено на цитологических препаратах с использованием электронной и флуоресцентной микроскопии после иммуноокрашивания белка мисматч репарации MLH1, который надежно маркирует точки кроссинговера. Были обнаружены существенные межвидовые различия в частоте рекомбинации. Наиболее низкая частота кроссинговера обнаружена у *M. gregalis* ($17,7 \pm 0,2$ точек рекомбинации на клетку), наиболее высокая – у *M. rossiaemeridionalis* ($27,8 \pm 0,2$); *M. tujanensis* и *M. maximowiczii* продемонстрировали промежуточные значения ($21,9 \pm 0,1$ и $23,4 \pm 0,1$ соответственно). Исследованные виды также различались по характеру спаривания половых хромосом в мейозе. У *M. tujanensis* и *M. maximowiczii* X- и Y-хромосомы синаптировали и рекомбинировали в коротком псевдоаутосомном районе. У *M. rossiaemeridionalis* и *M. gregalis* половые хромосомы сближались на стадии зиготены, совместно перемещались на периферию, образуя половое тельце, но не вступали ни в синапсис, ни в рекомбинацию.

Ключевые слова: мейоз, хромосомы, синапсис, рекомбинация, *Microtus*.

*Статья посвящается Ие Ивановне Кикнадзе,
которая открыла для нас – ее студентов – уди-
вительный мир живой клетки*

Введение

По числу видов род серые полёвки *Microtus* Schrank (1798) является одним из самых многочисленных среди млекопитающих. Он включает около 65 видов, населяющих различные биотопы палеарктической и неарктической зоны (Wilson, Reeder, 2005). Процесс видообразования в пределах данного рода происходил,

по-видимому, очень быстро – в течение последних 500–700 тысяч лет (Chaline *et al.*, 1999). Он сопровождался значительной экологической, морфологической, кариотипической и молекулярно-генетической дивергенцией (Jaarola *et al.*, 2004). Благодаря этим особенностям род *Microtus* представляет собой крайне интересную модель для исследования процесса микро- и макроэволюции.

В данной работе мы попытались использовать эту модель для изучения эволюции синапсиса и рекомбинации хромосом в мейозе.

Возникновение, поддержание и эволюционная роль рекомбинации являются предметами жаркой дискуссии (Lenormand, Otto, 2000; Cooper, Przeworski, 2007). Особый интерес вызывают сравнительный анализ рекомбинационных характеристик геномов млекопитающих и выявление эволюционных факторов и молекулярных и клеточных механизмов, обеспечивающих эти различия. Одни авторы видят в этих различиях адаптивный смысл (Otto, Barton, 1997), другие считают их нейтральными (Dumont, Payseur, 2008). Однако качество данных, на которых базируются эти дискуссии, вызывает ряд сомнений.

1. Сравнительно-эволюционный анализ рекомбинации в основном базируется на данных, полученных при генетическом картировании. Такой подход часто дает смещенные оценки частоты рекомбинации. Длины генетических карт, оцененные по частоте кроссинговера между отдельными маркерами, могут быть как завышенными за счет суммирования коротких интервалов, так и заниженными за счет недостатка информативных маркеров.

2. Довольно большой объем данных для сравнительного анализа частот рекомбинации был накоплен при подсчете общего числа хиазм на стадии диакинеза–метафазы I мейоза. Эти данные, однако, базируются, как правило, на очень малом числе клеток и особей и часто ошибочны.

3. При анализе эволюции рекомбинации, как правило, используется случайный набор видов, не сбалансированный ни по происхождению, ни по экологии.

В настоящее время разработаны цитологические методы, которые позволяют надежно локализовать точки кроссинговера на пахитенных хромосомах млекопитающих. Эти методы базируются на использовании меченных флуорохромами антител к SCP3, белку боковых элементов синаптонемного комплекса, и MLH1, эукариотическому гомологу бактериального белка мисматч репарации. Было показано, что MLH1 входит в состав зрелых рекомбинационных узлов. Число и распределение точек локализации MLH1 в пахитенных клетках точно соответствуют числу и распределению хиазм в диакинезе

мейоза (Anderson *et al.*, 1999; Lynn *et al.*, 2002; Codina-Pascual *et al.*, 2006). Установлено, что частота рекомбинации между двумя сцепленными генами, оцененная на основе частоты точек локализации MLH1 между FISH-пробами к этим генам, совпадает с оценкой частоты кроссинговера между ними, полученной в генетическом эксперименте (Froenicke *et al.*, 2002).

Данный подход был успешно применен для анализа частоты и распределения точек кроссинговера у ряда видов млекопитающих: человека (Oliver-Bonet *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005), мыши (Anderson *et al.*, 1999; Froenicke *et al.*, 2002), собаки (Basheva *et al.*, 2008), кошки (Borodin *et al.*, 2007), норки (Borodin *et al.*, 2009) и обыкновенной бурозубки (Borodin *et al.*, 2008).

Целью данной работы был анализ спаривания и рекомбинации хромосом в мейозе у самцов 4 видов полевок рода *Microtus* Schrank, 1798 (*M. mujanensis* Orlov et Kovalskaja, 1975, *M. maximowiczii* Schrenk, 1893, *M. rossiaemerdionalis* Ognev, 1924 (= *M. epiroticus* Ongrias, 1966; = *M. subarvalis* Mejer, Orlov, Skholl, 1972) и *M. gregalis* Pallas, 1778) с использованием иммунофлуоресцентной и электронной микроскопии. Данные виды относятся к разным филогенетическим линиям рода *Microtus*. Виды *M. mujanensis* и *M. maximowiczii* являются близкородственными видами подрода *Alexandromys* и принадлежат к азиатской филогенетической линии. *M. rossiaemerdionalis* является представителем большой группы видов-двойников, входящей в состав подрода *Microtus*. *M. gregalis* – единственный ныне живущий представитель подрода *Stenocranius*, азиатского по происхождению, и занимает базальное положение в роде *Microtus* (Wilson, Reeder, 2005).

Материалы и методы

В работе использованы следующие половозрелые животные: 4 самца *M. mujanensis* (рождены в виварии Зоологического института РАН от родителей, отловленных в Республике Бурятия в точке с координатами 56 °20'N, 114 °53'E), 1 самец *M. maximowiczii* (рожден в виварии Зоологического института РАН от родителей, отловленных в Забайкальском крае в точке с координатами 51 °40'N, 116 °47'E), 3 самца *M. rossiaemerdionalis* и 4 самца *M. gregalis*, от-

ловленных в Новосибирской области в точке с координатами 53 °44'N, 77 °52'E. Распластанные препараты сперматоцитов были приготовлены из семенников по методике Петерса с соавт. (Peters *et al.*, 1997). Препараты для электронно-микроскопического анализа окрашивали азотнокислым серебром (Howell, Black, 1980) и анализировали на микроскопе JEM100 (Jeol, Япония) при 80 кВ.

Окрашивание для иммунофлуоресцентного анализа проводили по методике Андерсон с соавт. (Anderson *et al.*, 1999). Препараты инкубировали 2 ч при 37 °С с поликлональными антителами кролика против белка боковых элементов СК SCP3 (Abcam, Великобритания) – при разведении 1 : 500, моноклональными антителами мыши против белка MLH1 (Abcam, Великобритания) – при разведении 1 : 50 и антителами человека против центромерных белков ACA (Antibodies Incorporated, США) – при разведении 1 : 100 в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем 3 % бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США). Препараты отмывали три раза по 5 мин в PBS и инкубировали 40 мин при 37 °С с антителами осла против иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с флуоресцентной меткой Cy3 (Jackson Laboratories, США) в разведении 1 : 200, антителами козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с флуоресцентной меткой FITC (Jackson Laboratories, США) в разведении 1 : 400 и антителами козы против иммуноглобулинов человека, конъюгированными с флуоресцентной меткой FITC (Vector Laboratories, США) в разведении 1 : 100 согласно стандартному протоколу. Препараты отмывали в PBS, затем в дистиллированной воде, высушивали и наносили 15 мкл раствора антифэйда Vectashield с красителем DAPI (Vector Laboratories, США) для окрашивания ДНК и предотвращения гашения флуоресценции.

Микроскопический анализ проводили в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Препараты анализировали на микроскопе AxioPlan 2 (ZEISS, Германия), снабженном CCD видеокамерой CV M300 (JAI Corporation, Япония), набором комплектов фильтров CHROMA и программным обеспечением для обработки изображений ISIS4 (MetaSystems GmbH, Германия).

Яркость и контраст изображений редактировали с использованием пакета PaintShopPro 7.0.

Для анализа отбирали ядра сперматоцитов на стадии пахитены, содержащие полные наборы полностью синаптированных аутосомных бивалентов и XY-бивалент. Учитывали количество сигналов MLH1 на каждом биваленте. Статистические расчеты производили с использованием пакета программ STATISTICA. Все данные в тексте и таблице представлены в виде средних значений и стандартных ошибок ($M \pm SE$).

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены микрофотографии распластанных препаратов сперматоцитов исследованных видов после иммуноокрашивания.

В табл. 1 приведены цитогенетические, рекомбинационные и синаптические характеристики исследованных видов. Оценки частоты рекомбинации получены на очень малых выборках. Однако ранее на других видах млекопитающих было показано, что индивидуальная вариация (Sun *et al.*, 2005) и межпопуляционные различия (Borodin *et al.*, 2008) по частоте кроссинговера пренебрежимо малы по сравнению с межвидовыми различиями (Dumont, Payseur, 2008).

Исследованные нами виды полевок различаются по частоте рекомбинации. Наиболее низкая частота кроссинговера обнаружена у *M. gregalis* ($17,7 \pm 0,2$ точек рекомбинации на клетку), наиболее высокая у *M. rossiaemeridionalis* ($27,8 \pm 0,2$). Два близкородственных вида, *M. mujanensis* и *M. maximowiczii*, продемонстрировали промежуточные значения ($21,9 \pm 0,1$ и $23,4 \pm 0,1$ соответственно). В целом среднее число рекомбинационных событий на геном у исследованных видов было пропорционально гаплоидному числу хромосом. У *M. gregalis* и *M. rossiaemeridionalis* эти два значения практически совпадали, а у *M. mujanensis* и *M. maximowiczii* число кроссоверов лишь незначительно превышало гаплоидное число хромосом. Примечательно, что у всех видов число рекомбинационных событий на геном было несколько ниже гаплоидного числа плеч аутосом. Это еще раз показывает, что распространенное мнение о необходимости наличия хотя бы одной хиазмы на плечо не подтверждается фактами, по крайней мере на млекопитающих. Довольно высокий про-

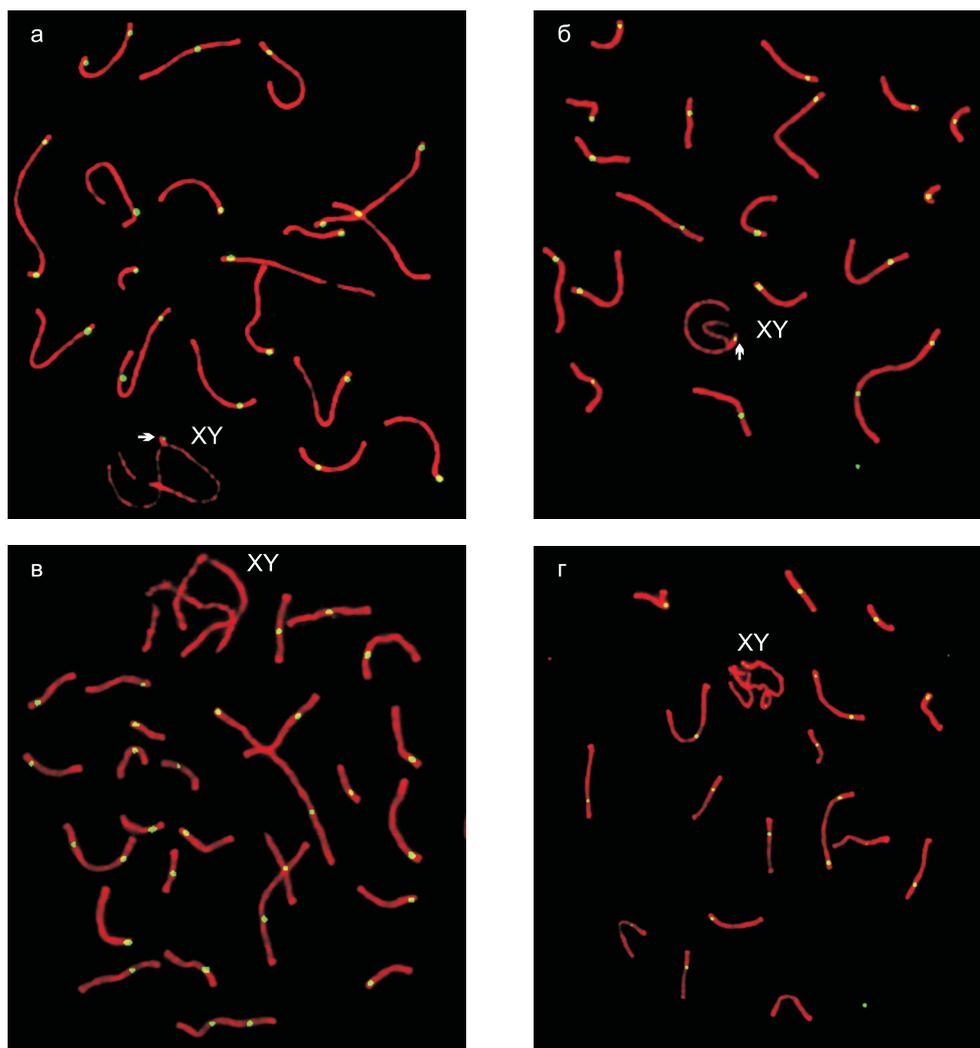


Рис. 1. Микрофотографии распластанных препаратов сперматоцитов исследованных видов после иммуноокрашивания с использованием антител к белкам SCP3 (красный сигнал) и MLH1 (зеленый сигнал).

Стрелками показаны точки связывания MLH1 в районе спаривания полового бивалента. а – *M. mujanensis*; б – *M. maximowiczii*; в – *M. rossiaemeridionalis*; г – *M. gregalis*.

цент безобменных плеч был обнаружен при анализе рекомбинации у обыкновенной бурозубки и человека (Sun *et al.*, 2006; Borodin *et al.*, 2008).

Близкое совпадение числа рекомбинационных событий на геном и гаплоидного числа хромосом у исследованных видов показывает, что функция рекомбинации у полевок сводится к образованию в среднем одной хиазмы на бивалент, необходимой и достаточной для нормальной сегрегации гомологов. Можно полагать, что рекомбинационный процесс у данной группы видов не вносит существенного вклада в генерацию генетического разнообразия.

По-видимому, отбор на снижение общего уровня рекомбинации привел к полному прекращению кроссинговера в псевдоаутосомном районе половых хромосом у ряда видов рода *Microtus*.

У *M. mujanensis* и *M. maximowiczii* мы наблюдали нормальный синапсис X- и Y-хромосом (рис. 2, а). Они сближались в зиготене, образовывали синаптонемный комплекс между дистальным прителомерным районом X-хромосомы и всем коротким плечом Y-хромосомы. Хотя размер района спаривания был очень мал у обоих видов ($0,70 \pm 0,01$ мкм и $0,53 \pm 0,01$ мкм у *M. mujanensis* и *M. maximowiczii* соответствен-

Таблица 1

Цитогенетические, рекомбинационные и синаптические характеристики
4 видов рода *Microtus*

Вид	№ живот-ных	№ клеток		Гаплоидное число хромосом	Гаплоидное число плеч аутосом	Среднее (M ± SE) число сайтов связывания MLH1 на ядро	Доля клеток, содержащих синаптированные X- и Y-хромосомы
		ЭМ ¹	ИМ ²				
<i>M. gregalis</i>	4	70	45	18	25	17,7 ± 0,2	0
<i>M. rossiaemeridionalis</i>	3	70	65	27	27	27,8 ± 0,2	0
<i>M. maximowiczii</i>	1	50	204	21	27	21,9 ± 0,1	0,94
<i>M. mujanensis</i>	4	100	229	19	24	23,4 ± 0,1	0,96

¹ ЭМ – электронная микроскопия; ² ИМ – иммунофлуоресцентная микроскопия.

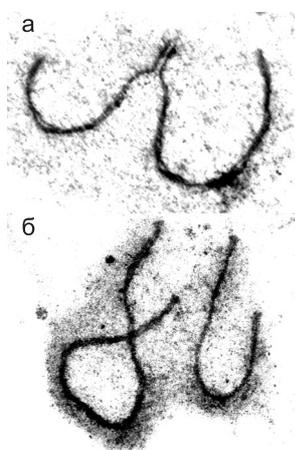


Рис. 2. Электронные микрофотографии половых хромосом в пахитенных ядрах.

M. mujanensis (а) и *M. gregalis* (б). Окрашивание азотно-кислым серебром.

но), в нем в 70–80 % клеток мы наблюдали одиночные сигналы MLH1 (рис. 1, а, б). У обоих видов точки связывания MLH1 в районе спаривания X- и Y-хромосом возникали в ранней пахитене и исчезали в течение средней пахитены, в то время как на аутосомных бивалентах сигналы обнаруживались до наступления диплотены. Сходная асинхронность между аутосомными и половыми бивалентами в связывании MLH1 была обнаружена на мыши (Anderson *et al.*, 1999). По этой причине мы наблюдали сигналы MLH1 в районе спаривания половых хромосом не во всех исследованных клетках.

У *M. gregalis* и *M. rossiaemeridionalis* половые хромосомы сближались на стадии зиготены, сов-

местно перемещались на периферию, образуя половое тельце, но не вступали ни в синапсис, ни в рекомбинацию (рис. 1, в, г, рис. 2, б).

Ранее регулярный асинапсис половых хромосом в профазе мужского мейоза был обнаружен у многих других видов рода *Microtus*: у всех исследованных представителей подродов *Microtus sensu stricto* (включая *M. rossiaemeridionalis* и родственные виды), *Agricola* и *Terricola* (Ashley *et al.*, 1989; Carnero *et al.*, 1991; Jimenez *et al.*, 1991; Ashley, Fredga, 1994; Borodin *et al.*, 1995; Megias-Nogales *et al.*, 2003). Было показано, что у данных видов существует ахиазматический механизм сегрегации половых хромосом у самцов (Fuente *et al.*, 2007). Некоторое время считалось, что это свойство всего рода *Microtus*. Однако затем было показано, что у самцов *M. oeconomus* и двух родственных видов, принадлежащих к азиатской филогенетической линии, наблюдается нормальный синапсис половых хромосом (Ashley, Fredga, 1994; Borodin *et al.*, 1995; Borodin *et al.*, 1997; Mekada *et al.*, 2001), хотя оставалось неизвестным, происходит ли при этом рекомбинация. Исследованные нами *M. mujanensis* и *M. maximowiczii* также принадлежат к данной линии (Jaarola *et al.*, 2004), и поэтому неудивительно, что мы обнаружили у них нормальное спаривание X- и Y-хромосом. Более того, мы показали, что у данных видов половые хромосомы рекомбинируют в районе спаривания.

Этот факт можно было бы рассматривать как подтверждение высказанной нами ранее гипотезы о том, что нормальный синапсис, присущий полевкам азиатской филогенетической линии,

является предковым свойством, а утрата этого свойства произошла у общего предка всех остальных представителей рода *Microtus* (Borodin *et al.*, 1995; Borodin *et al.*, 1997).

Однако обнаружение асинопсиса у *M. gregalis* ставит эту гипотезу под сомнение. Большинство специалистов полагают, что данный вид занимает базальное положение в роде *Microtus* (Jaarola *et al.*, 2004). Более того, среди неарктических представителей рода *Microtus* нами недавно были обнаружены как «синаптические», так и «асинаптические» виды. Это заставляет нас отказаться от гипотезы об однократном, монофилетическом возникновении асинопсиса половых хромосом у «асинаптических» видов рода *Microtus*. По-видимому, механизм нерекombинационного сближения и ахиазматического расхождения X- и Y-хромосом возник у общего предка целой группы родов подсемейства Arvicolinae. Это создало предпосылки для дальнейшей утраты синапсиса половых хромосом у отдельных представителей данного подсемейства.

Благодарности

Авторы признательны Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН за предоставление доступа к микроскопическому оборудованию. Работа выполнена при финансовой поддержке программы интеграционных исследований СО РАН и ДВО РАН, Российского фонда фундаментальных исследований, программ РАН «Происхождение и эволюция биосферы» и «Биоразнообразие и динамика генофондов человека, животных, растений и микроорганизмов» и федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

Литература

- Anderson L.K., Reeves A., Webb L.M. *et al.* Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein // *Genetics*. 1999. V. 151. P. 1569–1579.
- Ashley T., Fredga K. The curious normality of the synaptic association between the sex chromosomes of two arvicoline rodents: *Microtus oeconomus* and *Clethrionomys glareolus* // *Hereditas*. 1994. V. 120. P. 105–111.
- Ashley T., Jaarola M., Fredga K. Absence of synapsis during pachynema of the normal sized sex chromosomes of *Microtus arvalis* // *Hereditas*. 1989. V. 111. P. 295–304.
- Basheva E.A., Bidau C.J., Borodin P.M. General pattern of meiotic recombination in male dogs estimated by MLH1 and RAD51 immunolocalization // *Chromosome Res.* 2008. V. 16. P. 709–719.
- Borodin P.M., Basheva E.A., Zhelezova A.I. Immunocytological analysis of meiotic recombination in the American mink (*Mustela vison*) // *Anim. Genet.* 2009. V. 40. P. 235–238.
- Borodin P.M., Karamysheva T.V., Belonogova N.M. *et al.* Recombination map of the common shrew, *Sorex araneus* (Eulipotyphla, Mammalia) // *Genetics*. 2008. V. 178. P. 621–632.
- Borodin P.M., Karamysheva T.V., Rubtsov N.B. Immunofluorescent analysis of meiotic recombination and interference in the domestic cat // *Cell and Tissue Biol.* 2007. V. 1. P. 503–507.
- Borodin P.M., Rogatcheva M.B., Koyasu K. *et al.* Pattern of X-Y chromosome pairing in the Japanese field vole, *Microtus montebelli* // *Genome*. 1997. V. 40. P. 829–833.
- Borodin P.M., Sablina O.V., Rodionova M.I. Pattern of X-Y chromosome pairing in microtine rodents // *Hereditas*. 1995. V. 123. P. 17–23.
- Carnero A., Jimenez R., Burgos M. *et al.* Achiasmatic sex chromosomes in *Pitymys duodecimcostatus*: mechanisms of association and segregation // *Cytogenet. Cell Genet.* 1991. V. 56. P. 78–81.
- Chaline J., Brunet-Lecomte P., Montuire S. *et al.* Anatomy of the arvicoline radiation (Rodentia): palaeogeographical, palaeoecological history and evolutionary data // *Ann. Zool. Fenn.* 1999. V. 36. P. 239–267.
- Codina-Pascual M., Campillo M., Kraus J. *et al.* Crossover frequency and synaptonemal complex length: their variability and effects on human male meiosis // *Mol. Hum. Reprod.* 2006. V. 12. P. 123–133.
- Coop G., Przeworski M. An evolutionary view of human recombination // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. P. 23–34.
- Dumont B.L., Payseur B.A. Evolution of the genomic rate of recombination in mammals // *Evolution*. 2008. V. 62. P. 276–294.
- Fuente R. de la, Parra M.T., Viera A. *et al.* Meiotic pairing and segregation of achiasmate sex chromosomes in eutherian mammals: the role of SYCP3 protein // *PLoS Genet.* 2007. V. 3. P. e198.
- Froenicke L., Anderson L.K., Wienberg J. *et al.* Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting // *Amer. J. Hum. Genet.* 2002. V. 71. P. 1353–1368.
- Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method // *Experientia*. 1980. V. 36. P. 1014–1015.

- Jaarola M., Martinkova N., Gunduz I. *et al.* Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2004. V. 33. P. 647–663.
- Jimenez R., Carnero A., Burgos M. *et al.* Achiasmatic giant sex chromosomes in the vole *Microtus cabreriae* (Rodentia, Microtidae) // *Cytogenet. Cell Genet.* 1991. V. 57. P. 56–58.
- Lenormand T., Otto S.P. The evolution of recombination in a heterogeneous environment // *Genetics.* 2000. V. 156. P. 423–438.
- Lynn A., Koehler K.E., Judis L. *et al.* Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates // *Science.* 2002. V. 296. P. 2222–2225.
- Megias-Nogales B., Marchal J.A., Acosta M.J. *et al.* Sex chromosomes pairing in two Arvicolidae species: *Microtus nivalis* and *Arvicola sapidus* // *Hereditas.* 2003. V. 138. P. 114–121.
- Mekada K., Harada M., Lin L.K. *et al.* Pattern of X-Y chromosome pairing in the Taiwan vole, *Microtus kikuchii* // *Genome.* 2001. V. 44. P. 27–31.
- Oliver-Bonet M., Turek P.J., Sun F. *et al.* Temporal progression of recombination in human males // *Mol. Hum. Reprod.* 2005. V. 11. P. 517–522.
- Otto S.P., Barton N.H. The evolution of recombination: removing the limits to natural selection // *Genetics.* 1997. V. 147. P. 879–906.
- Peters A.H., Plug A.W., van Vugt M.J. *et al.* A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline // *Chromosome Res.* 1997. V. 5. P. 66–68.
- Sun F., Oliver-Bonet M., Liehr T. *et al.* Variation in MLH1 distribution in recombination maps for individual chromosomes from human males // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15. P. 2376–2391.
- Sun F., Trpkov K., Rademaker A. *et al.* Variation in meiotic recombination frequencies among human males // *Hum. Genet.* 2005. V. 116. P. 172–178.
- Wilson D.E., Reeder D.M. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press, 2005. In 2 vol. (XXXV, 2142 p.).

IMMUNOFLUORESCENCE AND ELECTRON MICROSCOPIC ANALYSIS OF MEIOTIC CHROMOSOME PAIRING AND RECOMBINATION IN FOUR SPECIES OF VOLES (GENUS *MICROTUS*; ARVICOLINAE, RODENTIA)

P.M. Borodin^{1,2}, E.A. Basheva¹, F.N. Golenishev³, O.A. Dashkevich², I.N. Kartavtseva⁴, M.A. Potapov⁵, G.R. Sakaeva², A.A. Torgasheva¹, L.V. Frisman^{4,6}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: borodin@bionet.nsc.ru;

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

³ Zoological Institute RAS, Sankt-Petersburg, Russia;

⁴ Institute of Biology and Soil Science FEB RAS, Vladivostok, Russia;

⁵ Institute of Systematics and Ecology of Animals, SB RAS, Novosibirsk, Russia;

⁶ Institute of Complex Analysis of Regional Problems FEB RAS, Birobidzhan, Russia

Summary

Chromosome pairing and recombination in male meiosis were analyzed by immunofluorescence and electron microscopy in four species of voles of the genus *Microtus* (*M. mujanensis*, *M. maximowiczii*, *M. rossiaemeridionalis* и *M. gregalis*). The study was carried out in cytological smears using immunofluorescence staining of the mismatch repair protein (MLH1), which reliably marks recombination sites. Significant interspecies differences in recombination rate were observed. The lowest recombination frequency was detected in *M. gregalis* (17,7 ± 0,2 recombination sites per cell) and the highest, in *M. rossiaemeridionalis* (27,8 ± 0,2), *Microtus mujanensis* and *M. maximowiczii* showed intermediate values: 21,9 ± 0,1 and 23,4 ± 0,1, respectively. The species studied also differed in the pattern of sex chromosome pairing in meiosis. The X and Y chromosomes of *M. mujanensis* и *M. maximowiczii* paired and recombined in a short pseudo-autosomal region. The sex chromosomes of *M. rossiaemeridionalis* and *M. gregalis* aligned at zygotene; moved together at the nuclear periphery, forming a sex vesicle; but neither paired nor recombined.

Key words: meiosis, chromosomes, synapsis, recombination, *Microtus*.