

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН

на правах рукописи

ЛИСАЧЕВ АРТЕМ ПАВЛОВИЧ

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ, СИНАПСИСА И РЕКОМБИНАЦИИ
ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМ РАЗНОГО ЭВОЛЮЦИОННОГО ВОЗРАСТА У
ПОЗВОНОЧНЫХ

03.03.04 Клеточная биология, цитология и гистология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
д. б. н. П. М. Бородин

НОВОСИБИРСК – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Актуальность исследования.....	4
Цель и задачи исследования	6
Научная новизна.....	6
Научно-практическая ценность	7
Личный вклад автора	7
Положения, выносимые на защиту	8
Публикации.....	8
Апробация работы.....	8
Структура и объем работы	9
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1. Половое размножение и мейоз	10
2. Детерминация пола у позвоночных. Половые хромосомы.....	13
3. Половые хромосомы в мейозе	18
4. Детерминация пола и половые хромосомы у костистых рыб	20
5. Детерминация пола и половые хромосомы у рептилий.....	27
6. Половые хромосомы у птиц.....	33
7. Выбор видов и методов для исследования синапсиса и рекомбинации половых хромосом	40
МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.....	44
Материал	44
Приготовление препаратов СК.....	44
Приготовление препаратов метафазных хромосом.....	45
Иммуноокрашивание	45
С-подобное окрашивание	46
Получение полногеномной ДНК-пробы гуппи.....	47
Проведение FISH.....	47
Окрашивание серебром (Ag-NOR) и электронная микроскопия	48
Фотографирование и анализ изображений.....	49
РЕЗУЛЬТАТЫ	50
1. Начальные этапы дифференциации половых хромосом на примере гуппи (<i>Poecilia reticulata</i> , <i>Poecilia wingei</i>)	50
1.1 Кариотипы. Идентификация XY-бивалента	50
1.2 Синапсис и рекомбинация половых хромосом и аутосом	53
2. Промежуточные этапы дифференциации половых хромосом на примере анолисов (<i>Anolis carolinensis</i> , <i>Deiropyx coelestinus</i>).....	57

2.1 Кариотипы. Идентификация и синапсис ХУ-бивалента	58
2.2 Рекомбинация половых хромосом и аутосом	62
3. Поздние этапы дифференциации половых хромосом на примере крачек (<i>Sterna hirundo</i> , <i>Chlidonias niger</i>)	66
3.1 Кариотипы	66
3.2 Синапсис и рекомбинация Z- и W-хромосом	67
3.3 Рекомбинация аутосом	71
ОБСУЖДЕНИЕ.....	74
1. Начальные этапы дифференциации половых хромосом на примере гуппи (<i>Poecilia reticulata</i> , <i>Poecilia wingei</i>)	74
1.1 Особенности синапсиса X- и Y-хромосом	74
1.2 Рекомбинация X- и Y-хромосом	75
1.3 Рекомбинация аутосом.....	78
2. Промежуточные этапы дифференциации половых хромосом на примере анолисов (<i>Anolis carolinensis</i> , <i>Deiropyx coelestinus</i>).....	80
2.1 Идентификация и синапсис ХУ-бивалента.....	80
2.2 Рекомбинация половых хромосом и аутосом	82
3. Поздние этапы дифференциации половых хромосом на примере крачек (<i>Sterna hirundo</i> , <i>Chlidonias niger</i>).....	85
3.1 Кариотипы	85
3.2 Синапсис и рекомбинация Z- и W-хромосом	86
3.3 Рекомбинация аутосом.....	88
4. Заключение.	91
ВЫВОДЫ	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	96

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Хромосомное определение пола является характерным для многих позвоночных животных. Согласно существующим моделям, эволюция половых хромосом начинается с появления на аутосоме гена-детерминатора пола (Rice, 1986). Следующие за этим процессы ведут к подавлению рекомбинации между половыми хромосомами у гетерогаметного пола и постепенной их дифференцировке. Половые хромосомы возникали в эволюции позвоночных много раз независимо в разных линиях, на основе различных аутосомных пар (O'Meally et al., 2012).

Поведение половых хромосом в мейозе у представителей гетерогаметного пола сильно отличается от поведения аутосом. Из-за отсутствия гомологии в определенных их участках спаривание половых хромосом происходит с затруднениями, и у многих видов не доходит до конца (Turner, 2007). Рекомбинация между дифференцированными половыми хромосомами на негомологичных участках также подавлена. Известно, что для нормального прохождения мейоза необходимо полное спаривание всех бивалентов и наличие в каждом из них хотя бы одного кроссовера (Pardo-Manuel de Villena, Sapienza, 2001). У млекопитающих и птиц существуют механизмы, обеспечивающие нормальный мейоз у гетерогаметного пола, несмотря на особенности поведения гетероморфных половых хромосом.

Однако млекопитающие, цитогенетика которых наиболее хорошо изучена, демонстрируют лишь поздние этапы эволюции половых хромосом. Остается неизвестным, как на ранних этапах дифференцировки половых хромосом (гоносом) возникают характерные особенности их спаривания и рекомбинации и механизмы, их компенсирующие. По этой причине является актуальным изучение систем половых хромосом у других позвоночных, в частности у костистых рыб, рептилий и птиц.

Для различных групп холоднокровных позвоночных характерны разные системы детерминации пола, в том числе XY- и ZW-системы половых хромосом.

По сравнению с половыми хромосомами млекопитающих они в большинстве своем имеют более молодой возраст и находятся на различных более ранних этапах дифференцировки (Pokorná, Kratochvíl, 2009). Таким образом, изучение половых хромосом рыб и рептилий позволит получить более полное представление о процессах и механизмах, влияющих на эволюцию генетических пол-детерминирующих систем.

Половые хромосомы птиц являются эволюционно старыми, однако по сравнению с половыми хромосомами млекопитающих изучены недостаточно (Graves, 2014). Увеличение выборки исследованных видов птиц позволит получить более полное представление об эволюции гомосом внутри класса, и сопоставить их строение и функционирование с таковыми у половых хромосом как млекопитающих, так и холоднокровных позвоночных с молодыми половыми хромосомами.

Иммунофлуоресцентный анализ синаптонемных комплексов является многообещающим методом анализа половых хромосом (Pigozzi, 2011). Во-первых, спаривание хромосом в мейозе выявляет гетероморфизмы, незаметные на митотических хромосомах. Во-вторых, прямая визуализация точек кроссинговера за счет специфичного окрашивания белков рекомбинации позволяет точно локализовать районы гомологии и хромосом-специфичные районы (Pigozzi, Solari, 1997). В-третьих, в пахитене степень компактизации хроматина ниже, чем в метафазе, что позволяет исследовать микрохромосомы. Известно, что у многих рептилий половые хромосомы находятся именно среди микрохромосом (Ezaz et al., 2005).

В качестве моделей для исследования были выбраны представители таксонов, имеющих половые хромосомы разного эволюционного возраста – рыбы гуппи (подрод *Acanthophaeus*, род *Poecilia*, сем. Poeciliidae, Osteichthyes); рептилии – анолисы (рода *Anolis* и *Deiropyx*, сем. Dactyloidae, Reptilia); и птицы – крачки (роды *Sterna* и *Chlidonias*, сем. Sternidae, Charadriiformes, Aves). В первых двух таксонах предположительный возраст систем половых хромосом меньше, чем у млекопитающих и птиц, причем гуппи и анолисы демонстрируют различные стадии процесса их дифференцировки: XY-хромосомы гуппи имеют возраст 10-15

млн лет (Meredith et al., 2011), а XY-хромосомы анолисов – 73-123 млн лет (Rovatsos et al., 2014). Для сравнения таксонов с молодыми половыми хромосомами с таксонами со старыми половыми хромосомами были исследованы два вида крачек – речная, *Sterna hirundo*, и черная, *Chlidonias niger* (сем. Sternidae, Charadriiformes, Aves). Срок дивергенции между ZW-хромосомами птиц оценивают в 100-170 млн лет (Graves, 2014).

Цель и задачи исследования

Целью работы является выяснение особенностей спаривания и рекомбинации половых хромосом у представителей таксонов, имеющих половые хромосомы относительно молодого, среднего и древнего эволюционного возраста на примере гуппи (*Poecilia (Acanthophascelus)*, Osteichthyes), анолисов (Dactyloidae, Reptilia) и крачек (Sternidae, Aves) и сравнение их с особенностями спаривания и рекомбинации половых хромосом млекопитающих, известными из литературы.

В работе были поставлены следующие задачи.

1) Исследовать особенности спаривания половых хромосом и выяснить особенности распределения кроссоверных обменов по половому биваленту у представителей таксонов, имеющих половые хромосомы разного эволюционного возраста.

2) По особенностям спаривания и рекомбинации определить локализацию гомологичных и гетерологичных районов половых хромосом и реконструировать возможные пути их происхождения.

3) Сравнить рекомбинационные характеристики половых хромосом и аутосом в пределах каждого таксона.

Научная новизна

Впервые показано, как увеличение степени дивергенции между гетероморфными половыми хромосомами приводит к прогрессирующим нарушениям в синапсисе полового бивалента, которые все менее эффективно компенсируются синаптической подгонкой, и усилению отличий параметров его синапсиса от параметров синапсиса аутосом того же вида. Впервые показано, как при уменьшении относительной длины псевдоаутосомных районов с увеличением эволюционного возраста половых хромосом распределение кроссоверов на них

становится более равномерным, и граница между ними и нерекombинирующим районом становится более четкой.

Впервые идентифицирован второй, терминальный, псевдоаутосомный район на половых хромосомах гуппи, и уточнена временная последовательность их синапсиса. Впервые установлен гетероморфизм между половыми хромосомами анолисов, установлено расположение дифференцированного и псевдоаутосомного районов. Построены сравнительные рекомбинационные карты аутосом двух видов анолисов. Впервые описан кариотип черной крачки, описаны перестройки, отличающие его от кариотипа речной крачки, изучено строение половых хромосом черной и речной крачек. Построены сравнительные рекомбинационные карты аутосом исследованных видов крачек.

Научно-практическая ценность

Данная работа описывает характерные черты мейотического поведения и строения половых хромосом, находящихся на разных этапах дивергенции. Результаты работы способствуют лучшему пониманию особенностей эволюции половых хромосом в целом и могут быть использованы для преподавания курсов генетики, клеточной и эволюционной биологии. Полученные данные по синапсису и рекомбинации половых хромосом и аутосом у пецилиевых, анолисов и крачек, модельных групп видов, которые достаточно широко используются в эволюционных исследованиях, могут быть использованы при изучении их биоразнообразия и видообразования.

Автор разработал и применил новый метод идентификации С-гетерохроматина на пластинках синаптонемных комплексов при помощи DAPI, который может быть использован также в медицинской цитогенетике и цитогенетике сельскохозяйственных животных.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно приготовил препараты распластанных СК всех исследованных видов холоднокровных позвоночных, провел иммуноокрашивание препаратов, провел синтез, мечение полногеномой пробы ДНК гуппи и флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH), выполнил фотографирование

препаратов и обработку результатов. Автор отловил экземпляры обоих видов крачек и выполнил обработку микроскопических данных по ним.

Положения, выносимые на защиту

1. Дивергенция между половыми хромосомами сопровождается уменьшением точности синаптической подгонки в мейозе у гетерогаметного пола, изменением структуры и границ псевдоаутосомных районов и увеличением удельной частоты рекомбинации в их пределах.
2. На половых хромосомах гуппи (*Poecilia*) дифференцированный район располагается между проксимальным и дистальным псевдоаутосомными районами, частота рекомбинации к его краям увеличивается постепенно.
3. Половые хромосомы анолисов родов *Anolis* и *Deiropyx* являются гетероморфными, их структура видоспецифична, граница негомологичного района (боковой петли) фиксирована, однако псевдоаутосомные районы сохраняют значительную протяженность.
4. На половых хромосомах крачек родов *Chlidonias* и *Sterna* наблюдается сокращение псевдоаутосомного района до одного короткого сегмента с четко выраженной границей и более высокой удельной частотой рекомбинации, чем на аутосомах.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 работ, включая 7 статей в журналах, входящих в список, рекомендованный ВАК «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук».

Апробация работы

Результаты данной работы были представлены и обсуждены на отчетной сессии ИЦиГ СО РАН в 2015 году, на 51-й Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2013), международной конференции «16th Evolutionary Biology Meeting» (Марсель, Франция, 2012), международной конференции «19th Chromosome Conference»

(Болонья, Италия, 2013), международной конференции «22nd International Colloquium of Animal Cytogenetics and Gene Mapping» (Тулуза, Франция, 2016).

Структура и объем работы

Работа включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список литературы (207 источников). Общий объем составляет 113 страниц. Представлено 25 рисунков и 4 таблицы.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Половое размножение и мейоз

Половое размножение характерно для подавляющего большинства эукариот. Важнейшая особенность полового размножения – это наличие мейоза.

Гомологичная рекомбинация (кроссинговер), происходящая во время мейоза, обеспечивает обмен участками хромосом, и от уровня рекомбинации напрямую зависит генетическое разнообразие потомства.

Мейоз отличается от митотического деления соматических клеток. В профазе мейоза гомологичные хромосомы спариваются (синапсис, или конъюгация), образуя биваленты. На стадии лептотены происходит поиск и первичное объединение гомологичных хромосом, тогда же начинают закладываться точки рекомбинации (Hunter, 2015). Они закладываются в виде двуцепочечных разрывов ДНК. Внесение одноцепочечных разрывов осуществляется белком SPO11, затем с обрезанными концами связывается белок RPA. Он замещается белком RAD51, осуществляющим внедрение цепей (Capilla et al., 2016). Далеко не все двуцепочечные разрывы затем преобразуются в кроссоверы. Во многих случаях двуцепочечный разрыв репарируется по некроссоверному пути. Некроссоверное разрешение разрыва может не иметь никаких последствий, однако у гетерозигот это в ряде случаев ведет к конверсии генов – превращению одной аллели в другую.

В зиготене возникают точки инициации синапсиса, от которых конъюгация распространяется на всю хромосому, и образуются собственно биваленты. Спаривание обеспечивается белками синаптонемного комплекса (СК). СК является осью бивалента и состоит из трех элементов – двух боковых, связанных с гомологами, и одного объединяющего их центрального. В состав боковых элементов входят белки SYCP3, SYCP2. Центральный элемент состоит из белка SYCP1 (Revenkova, Jessberger, 2006)

В конце зиготены появляются первые зрелые рекомбинационные узелки, которые отмечены белком мисматч-репарации MLH1. В пахитене хромосомы остаются полностью спаренными, идет завершение процессов рекомбинации

(Zickler, Kleckner, 2015). Для правильного прохождения мейоза важно полное спаривание всех гомологов. Существует точка пахитенного чекпойнта (Roeder, Bailis, 2000) – момент, когда происходит проверка правильности спаривания всех хромосом. При наличии неспаренных участков клетка погибает путем апоптоза. Пахитенный чекпойнт – один из механизмов гибридной стерильности.

Распределение кроссоверов по длине хромосомы не является случайным. Так как сближение хромосом в лептотене начинается с теломер, чаще всего обмены локализируются именно в дистальных частях хромосом: теломерные пики частоты кроссоверов выявлены у большинства исследованных видов. Также на распределение влияют центромерный эффект (подавление рекомбинации вблизи центромеры) и кроссоверная интерференция (Zickler, Kleckner, 2016). Суть интерференции заключается в подавлении возникновения нового кроссовера в определенной окрестности уже возникшего. Чем шире эта окрестность (больше расстояние между соседними кроссоверами), тем сильнее интерференция. Математически ее выражают с помощью v -параметра гамма-распределения: из случайно распределенных по хромосоме двуцепочечных разрывов в кроссовер превращается каждый v -ый. Значение v варьирует от 1 (все предшественники кроссоверов становятся кроссоверами) до 20 (абсолютная интерференция, один кроссовер на хромосому) (Gauthier et al., 2011).

Затем наступает стадия диплотены, когда синаптированные гомологи разъединяются и остаются соединены лишь в точках рекомбинации – хиазмах. Происходит дальнейшее расхождение гомологов (диакинез), они компактизируются и наступает стадия первой метафазы. В первом мейотическом делении разрываются связи между хроматидами, и гомологи расходятся по дочерним клеткам. Во втором делении мейоза расходятся сестринские хроматиды, и образуются гаплоидные предшественники гамет. У самцов каждый предшественник дифференцируется в сперматозоид, у самок же в яйцеклетку дифференцируется лишь один из продуктов мейоза. Другие три клетки, полярные тельца, резорбируются.

В результате рекомбинации происходит перетасовка генетического материала родительских особей. Этот процесс является важным генератором генетического разнообразия в популяции. При рекомбинации разрывается

сцепление между синтенными группами аллелей, а значит, обеспечивается независимое наследование генов, расположенных на одной хромосоме и независимое воздействие на них отбора (Webster, Hurst, 2011). Распространение в популяции вредной аллели за счет ее сцепления с полезной аллелью, на которую действует положительный отбор, носит название Хилл-Робертсоновской интерференции. Накопление в хромосоме при отсутствии рекомбинации вредных мутаций, от которых невозможно избавиться, называют храповиком Мёллера (Hartfield, Keightley, 2012).

Кроссинговер также позволяет мутациям, возникшим в разное время у разных особей, объединяться в одной особи, благодаря чему полезные мутации могут быстрее и эффективнее распространяться в популяции, а вредные мутации – элиминироваться (Otto, Barton, 1997; Keightley, Otto, 2006). Таким образом, прекращение рекомбинации – к примеру, в половых хромосомах – за счет Хилл-Робертсоновской интерференции и храповика Мёллера ведет к дегенерации гетероморфной Y- или W-хромосомы (Rice, 1996). Помимо генетической роли рекомбинация играет цитологическую роль – как минимум один кроссовер на бивалент, как правило, необходим для нормального расхождения гомологов.

Если вышеизложенные представления о роли рекомбинации как таковой являются общепринятыми, то роль интенсивности рекомбинации остается предметом дискуссий. Даже близкие организмы могут значительно отличаться друг от друга по числу кроссоверов на клетку и их распределению по длине хромосом. Среди исследователей нет единого мнения о том, адаптивны эти различия или же нейтральны. Было предложено несколько гипотез об адаптивной роли интенсивности рекомбинации, среди которых можно отметить гипотезу Красной королевы и гипотезу конкуренции сибсов.

Согласно гипотезе Красной королевы, более высокая частота рекомбинации характерна для организмов с большим временем смены поколений. Если смена поколений происходит быстро, высока вероятность, что потомки живут в тех же условиях, что и родители. Поэтому выгодно сохранять существующие синтенные комбинации аллелей и иметь низкую частоту рекомбинации. Если смена поколений происходит медленнее, то высока вероятность, что потомки живут в несколько

других условиях, чем родители, и тогда выгодна высокая частота рекомбинации. Для млекопитающих связь интенсивности рекомбинации со временем смены поколений действительно показана (Burt, Bell, 1987).

Пользуясь той же логикой, можно предположить, что для специализированных организмов со стабильной и узкой экологической нишей будет характерна более низкая частота рекомбинации, чем для живущих в разнообразных условиях и менее специализированных. Яркий пример постоянно изменяющихся условий – это «гонка вооружений» между паразитом и его хозяином. В ряде работ действительно показано, что для особей и популяций с паразитарной нагрузкой характерна более высокая частота рекомбинации (Kerstes et al., 2012). Паразитом при этом могут быть не только гельминты, простейшие или насекомые, но и эгоистические фрагменты ДНК, например В-хромосомы. Согласно гипотезе конкуренции сибсов, активнее рекомбинация должна происходить у животных с большим размером выводка, чтобы повысить генетическое разнообразие потомков и снизить конкуренцию между ними.

Таким образом, половой процесс и рекомбинация играют важнейшую роль в эволюции многоклеточных организмов. У разных животных пол конкретной особи детерминируется разными способами.

2. Детерминация пола у позвоночных. Половые хромосомы

Для позвоночных животных характерно значительное разнообразие механизмов детерминации пола. В целом эти механизмы разделяют на две категории: средовые (ESD, environmental sex determination) и генетические (GSD, genetic sex determination). Генетические механизмы, в свою очередь, делятся на нехромосомные, когда пол определяется аллелями нескольких генов с разных хромосом, и хромосомные, когда присутствуют специальные половые хромосомы.

Половые хромосомы – это особая пара гетероморфных хромосом, от соотношения вариантов которых в организме зависит его пол. Механизм их действия основан на наличии на одной из хромосом доминантного гена, направляющего развитие половой системы организма по мужскому или же женскому пути. Обычно этот ген представляет собой транскрипционный фактор,

запускающий или тормозящий экспрессию других генов. Их продукты, в свою очередь, вызывают апоптоз одних клеток и пролиферацию и дифференцировку других, управляют синтезом половых гормонов. Иногда детерминатор пола представляет собой нуль-аллель (как у птиц, у дрозофилы). Тогда пол определяется дозой продукта нормального аллеля: у гетерогаметного пола его образуется вдвое меньше (Smith et al., 2009a). Когда доминантный фактор детерминирует мужской пол, несущую его хромосому называют Y-хромосомой, а ее гомолог – X-хромосомой. Если же он детерминирует женский пол, то его носитель называется W-хромосомой, а его гомолог – Z-хромосомой (Ezaz et al., 2006).

Половые хромосомы являются вторичным явлением, они возникают на основе нехромосомных механизмов определения пола (Pokorná, Kratochvíl, 2014). Нехромосомные механизмы присутствуют у многих низших позвоночных. Прото-половые хромосомы возникают тогда, когда в результате мутации возникает локус, одна из аллелей которого абсолютно детерминирует пол, пересиливая действие всех остальных факторов. Например, у рептилий, чей пол определяется температурой, важную роль в его формировании играет термозависимая экспрессия гена ароматазы (Gabriel et al., 2001). Под действием ароматазы мужские стероиды превращаются в женские и происходит феминизация. Можно предположить наличие термозависимого репрессора гена ароматазы, который при одной температуре закреплен на ДНК, а при другой меняет конформацию и теряет сродство к ней (D'Cotta et al., 2001). В результате мутации он может стать термoneзависимым, и носители такой аллели всегда будут самцами.

После такой мутации вариант хромосомы, несущий доминантный аллель, присутствует только у одного пола (Charlesworth et al., 2005). Таким образом, все особи в популяции принадлежат к одному из двух цитотипов: XY либо XX. Особей с цитотипом YY не возникает, так как прото-Y хромосома наследуется только от отца. Все особи цитотипа XY – самцы, а особи XX могут быть самцами и самками, в соответствии с исходным путем детерминации пола.

Рассмотрим эволюционные последствия, которые влечет за собой возникновение такой нео-Y хромосомы.

Известно, что у многих животных на Y-хромосоме сконцентрированы гены, играющие важную роль в жизни самцов. У человека, например, помимо полоопределяющего гена SRY, там находятся гены, отвечающие за сперматогенез и формирование семенников (Saxena et al., 1996, Lahn, Page, 1997). У гуппи с Y-хромосомой сцеплено много генов, отвечающих за окраску и орнамент - элементы брачного наряда (Tripathi et al., 2009a,b). Эта закономерность не зависит от происхождения Y-хромосомы и, следовательно, является эволюционным параллелизмом – следствием общности логики эволюции половых хромосом у любой группы, в которой они возникают (Griffin, 2012).

Данную закономерность можно объяснить в терминах теории генов-половых антагонистов. Предположим, что существует аутосомный ген, повышающий приспособленность самцов, но не влияющий на приспособленность самок. Например, он может кодировать белок, участвующий в сперматогенезе. Переходя от поколения к поколению, он примерно половину времени присутствует в телах самцов, а половину - в телах самок. То есть, внешний фенотипический эффект, через который на ген может действовать положительный естественный отбор, проявляется у него далеко не всегда. Но в случае транслокации этого гена на Y-хромосому он будет проявлять свое действие в каждом поколении. Копии гена, перемещенные на Y-хромосому, получают преимущество перед теми копиями, что остаются на аутосоме, и ясно, что такая перестройка будет распространяться в популяции (Rice, 1987).

Данный сценарий повторяется много раз, и в итоге на Y-хромосоме накапливается значительное число генов, выгодных именно для самцов. Поэтому XY-самцы, вероятно, получают селективное преимущество над XX-самцами. Отбор благоприятствует закреплению факторов, супрессирующих развитие XX-особей в самцов, и старый путь детерминации пола отмирает (Рисунок 1).

Здесь встает важная проблема рекомбинации в мейозе у гетерогаметного пола. В частности, рекомбинация между гетероморфными половыми хромосомами отделяет специфичный для мужского пола аллель от выгодного для его размножения окружения – от гена-триггера пола. Из этого следует, что любая мутация, запирающая рекомбинацию между разными половыми хромосомами,

будет поддержана естественным отбором и зафиксирована в популяции. Супрессия рекомбинации может быть обусловлена как формированием эпигенетических механизмов, так и за счет закрепления хромосомных мутаций – инверсий (Mank, 2012).

Мы можем наблюдать данный процесс, изучая гоносомы разных видов, находящиеся на разных стадиях эволюции: в молодых половых хромосомах нерекомбинирующий сегмент достаточно мал, тогда как в имеющих значительный возраст он достигает больших размеров (Rice, 1996). В предельных случаях X и Y перестают синаптировать в мейозе, продолжая при этом находиться в мейотической клетке неподалеку друг от друга (Fabig et al., 2015, Borodin et al., 2012).

При отсутствии очищающего эффекта кроссинговера в Y- и W-хромосомах накапливаются мутации. Каждая из них сама по себе может не обладать значительным негативным эффектом, который к тому же компенсируется нормальным гомологом на X-хромосоме. Поэтому такие мутации неэффективно элиминируются отбором. Их постепенное накопление приводит к дегенерации хромосомы за счет "храповика Мёллера" (Griffin, 2012). Y- и W-хромосомы часто сильно гетерохроматизированы и отличаются от гомологов размером и формой. Они могут быть уменьшены из-за делеций генетического материала, как у млекопитающих, или же наоборот сильно увеличены из-за накопления гетерохроматина (Schartl et al., 2016). Скорость и путь деградации конкретной гетерохромосомы непредсказуемы. У всех птиц, к примеру, половые хромосомы имеют общее происхождение, однако W-хромосома в разных отрядах сильно различается по степени деградации, количеству гетерохроматина и размеру (Mank, Ellegren, 2007).

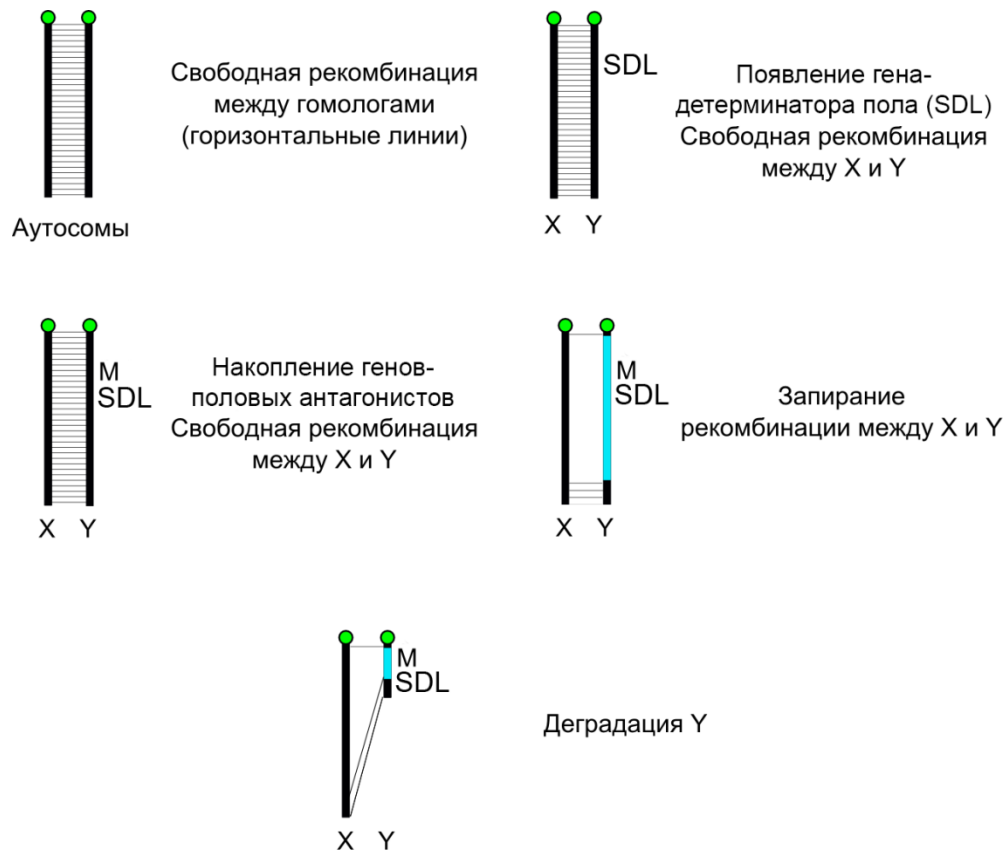


Рисунок 1. Схема эволюции половых хромосом (Лисачев, Бородин, 2014).

Филогенетический анализ определяет возраст половых хромосом птиц в 100-150 миллионов лет (Nam, Ellegren, 2008), а высших млекопитающих – 150-170 миллионов лет (Veugunes et al., 2008). За предположительный возраст системы половых хромосом принимается промежуток между отделением ближайшей аутгруппы, у которых нет данной системы половых хромосом, и отделением первой базальной группы, у которой она уже присутствует. У высших млекопитающих на Y-хромосоме функциональными остаются только половой триггер и специфические гены, участвующие в сперматогенезе. Вся остальная ее часть сильно гетерохроматизирована и состоит из псевдогенов, транспозонов и различных сателлитных последовательностей (Skaletsky et al., 2003). У человека уровень дивергенции между гомологичными последовательностями на X- и Y-хромосомах уменьшается при удалении от гена SRY, отражая постепенное распространение нерекombинирующего сегмента. Можно выделить четыре четких района, или страты, демонстрирующих пошаговое уменьшение уровня

дивергенции. Вероятно, это свидетельствует о четырех крупных инверсиях, последовательно захватывавших в состав нерекомбинирующего сегмента новые районы Y-хромосомы (Lahn, Page, 1999). У птиц наблюдается сходная ситуация (Handley et al., 2004).

Существует теория, согласно которой деградация Y-хромосомы человека может привести в итоге к ее исчезновению (Graves, 2006). По мнению Дж. Грейвс, за этим должно последовать вымирание человечества или же, что более вероятно, возникновение новой системы определения пола. Подобная ситуация действительно наблюдается у некоторых видов млекопитающих. Y-хромосома отсутствует, например, у двух видов слепушонок - *Ellobius lutescens* и *E. tancrei*. У этих грызунов оба пола имеют одинаковый кариотип – XO у первого вида и XX у второго (Kolomiets et al., 1991). Вероятно, в результате мутации роль главного детерминатора пола перешла от SRY к какой-то другой генетической системе, после чего Y-хромосома перестала быть необходимой и была утеряна.

Однако подобные случаи, по всей видимости, являются скорее исключением. Как правило, существуют механизмы противодействия дегенерации Y-хромосомы. Сравнение полной последовательности ДНК Y-хромосом шимпанзе и человека показало, что за 6 миллионов лет независимой эволюции у человека не произошло значительной потери и дегенерации расположенных на ней генов. Анализ последовательности выявил механизм борьбы с накоплением вредных мутаций в Y-хромосоме. Было показано, что на Y-хромосоме человека функциональные гены представлены большим количеством палиндромно повторенных копий. Нерцепрокная рекомбинация (генная конверсия) между этими копиями позволяет компенсировать отсутствие гомолога для реципрокной рекомбинации (Rozen et al., 2003). Таким образом, однажды возникнув и в достаточной степени дифференцировавшись, половые хромосомы, как правило, являются достаточно стабильным состоянием системы определения пола.

3. Половые хромосомы в мейозе

Процессы кроссинговера, происходящие в мейозе, требуют тесного спаривания двух гомологов. Успешное спаривание всех гомологов является

необходимым условием для прохождения мейоза. Клетки, содержащие к определенному моменту неспаренные участки хромосом, подвергаются апоптозу. Этот момент носит название пахитенного чекпойнта (Roeder, Bailis, 2000).

Утрата гомологии между половыми хромосомами затрудняет процесс спаривания их в мейозе. У млекопитающих негомологичные сегменты остаются неспаренными. Во избежание апоптоза половой бивалент помещается на периферию клетки и сильно конденсируется, также происходит его транскрипционная инактивация (Turner, 2007). Это явление называют MSSC – *meiotic silencing of the sex chromatin*, и считают частным проявлением более общего явления – MSCI, *meiotic silencing of unpaired chromatin*, мейотической инактивации неспаренного хроматина.

У птиц происходит негомологичное спаривание половых хромосом. Начавшись в псевдоаутосомном районе, синаптированный участок распространяется вдоль осей хромосом до тех пор, пока не закончится более короткая W-хромосома. Затем Z-хромосома начинает укорачиваться, закручиваться вокруг W-хромосомы, пока не достигнет равной с ней длины. Этот процесс называется эквиализацией (del Priore, Pigozzi, 2012).

Большинство пойкилотермных позвоночных, имеющих половые хромосомы, демонстрируют более или менее гомоморфное их состояние. Часто это связывают с пластичностью генетической и морфологической составляющих развития у низших позвоночных, благодаря которой системы детерминации пола у них относительно часто изменяются, и ни одна пара хромосом не остается в роли половых достаточно долго (Blaser et al., 2012).

Для объяснения этого явления также была предложена следующая теоретическая модель, основанная на явлении обращения пола (Perrin 2009). Автор обращает внимание на то, что у холоднокровных позвоночных, в силу общей зависимости всех физиологических процессов от температуры, часто наблюдается обращение пола, когда особи с генотипом XY или ZZ имеют женский фенотип, а с генотипом XX или ZW – мужской.

Известно, что описанные выше особенности спаривания и рекомбинации гоносомного бивалента зависят от фенотипического, а не генотипического пола.

Это было показано для ХУ-неосамок гребенчатого тритона (Wallace et al., 1997), медаки (Kondo et al., 2001, Matsuda et al., 1999). Поэтому у генотипических самцов, обращенных в самок, Х- и Y-хромосомы нормально синаптируют и рекомбинируют. При этом происходит генерация новых гаплотипов Y-хромосомы, которые затем подвергаются естественному и половому отбору. Небольшой частоты случаев обращения пола оказывается достаточно для предотвращения дегенерации Y-хромосомы.

Позднее Н. Перрин подтвердил свою теорию на двух комплексах близких видов амфибий – квакшах (*Hyla*) и зеленых жабах (*Bufo*). Он выяснил, что у каждого вида Y-хромосома больше похожа на своего X-партнера, чем на Y-хромосому близкого вида. Если бы X и Y не рекомбинировали с момента своего образования у общего предка каждого комплекса, все гаплотипы Y-хромосомы были бы больше всего похожи именно друг на друга (Stöck et al., 2011; Stöck et al., 2013). Однако на большом эволюционном масштабе показано, что и перемещение роли половых хромосом на другую пару также влияет на наблюдаемый гомоморфизм половых хромосом у большинства амфибий (Uno et al., 2015).

Так как в разных эволюционных линиях половые хромосомы появлялись многократно, независимо и в разное время, мы можем найти в животном мире примеры, демонстрирующие разные пути и стадии их эволюции. Наиболее привлекательными объектами для изучения ранних этапов эволюции половых хромосом среди позвоночных являются рыбы и пресмыкающиеся.

4. Детерминация пола и половые хромосомы у костистых рыб

Костистые рыбы демонстрируют наибольшее разнообразие пол-детерминирующих систем среди всех классов позвоночных (Рисунок 2). Несколько сотен видов рыб – последовательные гермафродиты, и развиваются либо вначале как самки, а затем как самцы (протоандрические), либо наоборот (протогинные) (Devlin, Nagahama, 2002). Примером протоандрического вида может служить золотистый спарус (*Sparus auratus*), обитающий в Атлантическом океане (Franch et al., 2006). Протогиния характерна для черноморского морского юнкера (*Coris julis*) (Bruslé, 1987).

Иногда на определение пола у рыб могут влиять даже социальные факторы. Примером может служить рыба-клоун (*Amphiprion*). Изначально мальки вообще не имеют дифференцированных гонад. Затем, когда наступает время достижения половозрелости, самая большая особь в группе становится самкой, а вторая по величине – самцом. Остальные особи остаются неполовозрелыми. Если кто-то из пары пропадает, следующая по размеру рыба дифференцируется в представителя необходимого пола (Hattori, 1991).

Существуют и синхронные гермафродиты, способные как к перекрестному (Pressley, 1981), так и к самооплодотворению (Soto et al., 1992).

У видов-гонохористов (то есть имеющих один пол в течение всей жизни) существуют все возможные формы генетического определения пола: от XY- или ZW-гетерогаметных систем с влиянием или без влияния аутосомных локусов до более сложных систем из нескольких локусов, но без половых хромосом (многофакторное определение пола), как у *Danio rerio*. Иногда у одного вида может быть несколько половых хромосом или несколько их пар. У некоторых видов на определение пола может влиять температура, pH и другие абиотические факторы внешней среды (Devlin, Nagahama, 2002).

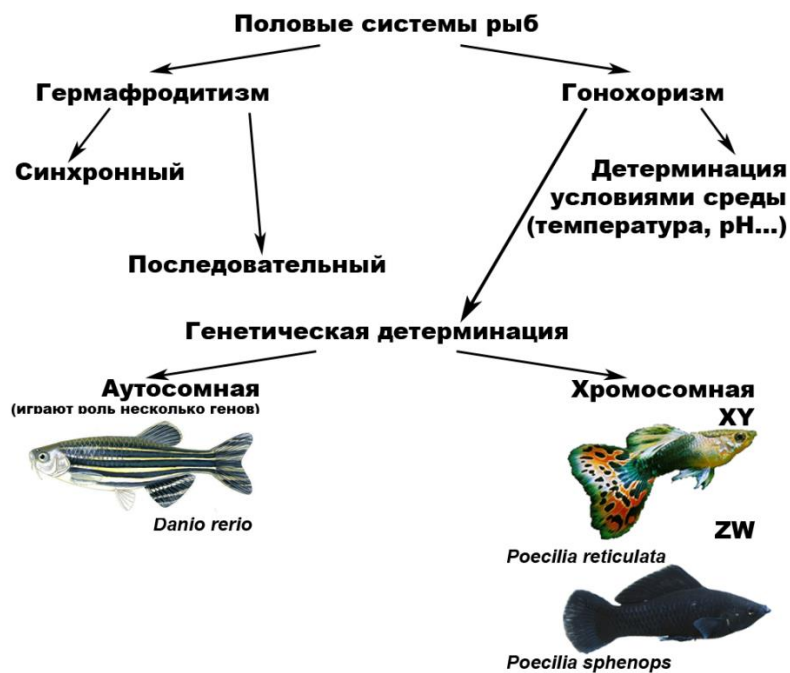


Рисунок 2. Различные пути определения пола у костных рыб.

Важно, что в некоторых группах рыб даже близкие виды имеют разные системы детерминации пола, отражая частые переключения между разными системами определения пола в ходе эволюции (Schultheis et al., 2009). Эти изменения могут вести к видообразованию и играть определенную роль в возникновении и поддержании огромного биоразнообразия костных рыб (Devlin, Nagahama, 2002).

Вообще, системы детерминации и дифференциации пола у рыб являются очень пластичными, что отличает их от млекопитающих с их стабильной системой половых хромосом, однозначно определяющей пол (Volff, Scharl, 2001). Даже у тех видов рыб, что имеют значительно дивергировавшие половые хромосомы, возможны случаи обращения пола при искусственном воздействии гормонами. Метод гормонального обращения пола широко используется в аквакультуре (Pandian, Sheela, 1995).

Несмотря на такую вариабельность, существуют данные в пользу того, что ядро каскада детерминации и дифференцировки пола консервативно не только среди рыб, но и среди всех позвоночных (Smith et al., 1999, Zarkower, 2001, Scharl, 2004). К примеру, паттерны экспрессии транскрипционного фактора *Dmrt1*, участвующего в формировании мужского фенотипа у тетрапод, указывают на его аналогичную роль как у однополых, так и у гермафродитных рыб (Marchand et al., 2000, Brunner et al., 2001, He et al., 2003, Veith et al., 2003, Kobayashi et al., 2004, Winkler et al., 2004, Guo et al., 2005, Veith et al., 2006). Таким образом, все разнообразие систем определения пола у рыб может быть связано лишь с изменением первичных регуляторов, управляющих более консервативной частью каскада дифференцировки пола.

Половые хромосомы рыб, как правило, являются слабо дифференцированными, поэтому при их изучении анализ СК имеет преимущество перед анализом метафазных хромосом. Поскольку в пахитене гомологи спарены по всей длине, даже относительно небольшие гетероморфизмы проявляются в виде асимметрии полового бивалента и нарушения его синаптических характеристик. Методы анализа СК, в том числе иммунофлуоресцентные, ранее уже применялись

при исследовании рыб. Описана рекомбинация хромосом *Danio rerio* – вида, не имеющего половых хромосом. Были изучены пахитенные сперматогонии самцов данного вида, произведена иммуоцитохимическая локализация синаптонемных комплексов, центромерных белков и точек рекомбинации. Было показано, что обмены локализуются в основном в дистальных районах хромосомных плеч (центромерный эффект), причем обычно наблюдается один обмен на хромосому, редко два (интерференция) (Moens, 2006).

Также была опубликована краткая характеристика синапсиса половых хромосом гуппи и меченосца (*X. maculatus*). Показано, что спаривание гоносом меченосца не отличается от спаривания аутосом, тогда как у гуппи происходит эквивализация, напоминающая аналогичный процесс у птиц (Traut, Winking, 2001). В той же работе проводится выявление половых хромосом этих видов на метафазных пластинках при помощи CGH (comparative genomic hybridization, сравнительная геномная гибридизация). При CGH проводится FISH одновременно с двумя полногеномными пробами (в данном случае самца и самки), окрашенными разными флуорохромами. Общие последовательности окрашиваются обеими пробами, Y(W)-специфичные – только одной, идентифицируя половую хромосому и дифференцированный район на ней. Степень дивергенции половых хромосом меченосца оказывается недостаточной для их визуализации, но на Y-хромосоме гуппи выявляется значительный участок, обогащенный специфическими повторенными последовательностями, соответствующий гетерохроматиновому блоку, обнаруженному ранее при помощи С-окраски (Nanda et al., 1993).

Существует серия работ по половым хромосомам тилляпий (*Oreochromis*, Perciformes), выполненных с исследованием синаптонемных комплексов (Foresti et al., 1993, Carrasco et al., 1999, Campos-Ramos et al., 2001, Campos-Ramos et al., 2003). В первой из этих работ был описан частичный асинапсис самого большого бивалента в мейозе у самцов *O. niloticus*. Он наблюдался, однако, не во всех клетках, что позволило авторам предположить, что у тилляпий имеет место позднее негомологичное спаривание и эквивализация полового бивалента, как у птиц и гуппи. Вторая работа практически повторяет эти результаты, однако использует расширенный набор данных и статистический анализ. В двух последних работах

сделаны попытки использовать синаптонемные комплексы для идентификации половых хромосом у *O. aureus* и *O. mossambicus*, однако достоверные данные получены не были.

Существует также исследование спаривания аутосом и половых хромосом у радужной форели, *Oncorhynchus mykiss* (Oliveira et al., 1995). XY-хромосомы данного вида демонстрируют задержку спаривания, начиная синаптировать лишь после полного спаривания аутосомных бивалентов. Более длинный фрагмент X-хромосомы эквивализуется к середине пахитены. Интересны процессы синапсиса половых хромосом у *Hoplias malabaricus* – рыбы с множественными половыми хромосомами типа $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (Bertollo, Mestriner, 1998). В мейозе самца три хромосомы образуют Т-образный тривалент. Каждая из X-хромосом частью гомологично спарена с Y-хромосомой, а частью – негомологично с другой X-хромосомой. Негомологичное спаривание участков двух X-хромосом задержано по сравнению со спариванием участков, имеющих гомолог на Y-хромосоме.

Среди всех групп рыб лучшей моделью для изучения эволюции половых хромосом являются пецилиевые (Poeciliidae). Во-первых, они являются одной из наиболее изученных групп рыб, в основном из-за простоты их содержания и культивирования. Во-вторых, многие виды имеют сцепленные с полом гены, отвечающие за хорошо заметные особенности окраски и рисунка. У разных видов пецилиевых встречаются различные системы детерминации пола, хотя основные линии пецилид разошлись относительно недавно (от 5 до 30 миллионов лет назад) (Hrbek et al., 2007, Meredith et al., 2011). Это значит, что возраст многих из наблюдаемых у них пол-детерминирующих систем составляет не более нескольких миллионов лет (Volff, Schartl, 2001).

Семейство включает в себя около 300 видов мелких пресноводных и солоноватоводных стайных всеядных рыб. Большинство пецилиевых живородящи. Изначальный ареал распространения семейства включает в себя тропические и субтропические области Америки и Африки, включая Мадагаскар. Американские виды входят в подсемейство Poeciliinae и составляют более 60% от видового состава семейства. В историческое время ареал многих видов, в особенности представителей родов *Poecilia* и *Gambusia*, значительно расширился за счет

человеческой деятельности – как случайного попадания аквариумных рыбок в местные водоемы, так и намеренного их выпуска в целях борьбы с кровососущими насекомыми.

Со сравнительно-цитогенетической точки зрения представители пецилиевых достаточно однообразны. Изученные к настоящему времени представители семейства имеют 46 либо 48 акроцентрических хромосом (Devlin, Nagahama, 2002). Исключение составляет метацентрическая W-хромосома гамбузий (Russo et al., 1999). Хромосомы не образуют четких размерных кластеров. Относительная длина 1-й хромосомы гуппи составляет около 5%, а 23-й - 2% от кариотипа. С-дифференциальная окраска хромосом пецилиевых выявляет прицентромерный и половой гетерохроматин (Nanda et al., 1993).

У гуппи (*Poecilia reticulata*) гетерогаметным полом являются самцы, то есть имеется XY-система определения пола. При этом X- и Y-хромосомы данного комплекса видов сохраняют относительно протяженный район гомологии, в котором может происходить кроссинговер. На Y-хромосоме есть и специфичный нерекombинирующий район, в котором находится неизвестный ген-детерминатор пола и сцепленные с ним гены, отвечающие за брачную окраску самцов (Tripathi et al., 2009, Tripathi et al., 2009). Также в нерекombинирующем районе, как и предсказывает теоретическая модель, аккумулярованы различные сателлитные и другие повторенные последовательности (Nanda et al., 1992, Nanda et al., 1993). Строение Y-хромосомы гуппи и ее разделение на два района было визуализировано с помощью сравнительной геномной гибридизации (Traut, Winking, 2001). Недавно изучено строение Y-хромосомы у других видов гуппи (*P. wingei*, *P. obscura*). Показано, что размеры Y-специфичного сегмента у разных видов и линий варьируют, однако общая модель организации половых хромосом у разных гуппи одна и та же (Nanda et al., 2014).

Системы детерминации пола у других видов рода *Poecilia* изучены не так подробно. У черной моллинезии, *P. sphenops* var. *melanistica*, установлено наличие полового гетероморфизма по типу ZW в первой паре хромосом. W-хромосома характеризуется большим участком прителомерного гетерохроматина (Haaf, Schmid, 1984). Существуют также противоречивые данные разных лет о немногих

видах, таких как *P. latipinna*, *P. velifera* и некоторые другие. В разных работах для одних и тех же видов описываются разные гетерогаметные системы (Sola et al., 1990, Schröder, 1964). Вероятная причина этого в том, что исследователи работали с лабораторными и декоративными линиями неясного происхождения, подвергшимися интенсивной селекции с возможной межвидовой гибридизацией. Такие данные следует использовать с большой осторожностью.

Интересная ситуация наблюдается у двух видов гамбузии, *Gambusia affinis* и *G. holbrooki*, ранее считавшихся подвидами *G. affinis*. *G. affinis* имеет ZW-хромосомы, легко отличимые друг от друга по морфологии. У *G. holbrooki* нет морфологически заметных половых хромосом, но анализ наследования некоторых черт окраски предполагает их сцепление с Y-хромосомой и, таким образом, существование мужской гетерогаметной системы. При скрещивании самок *G. affinis* с самцами *G. holbrooki* рождаются уродливые, маложизнеспособные мальки. При реципрокной гибридизации потомство нормально (Black, Howell, 1979).

Хорошо исследована система определения пола у некоторых видов меченосцев (*Xiphophorus*). *X. maculatus* имеет три половые хромосомы: X, Y и W. Генотипы XX, XW и YW формируют самок, YY и XY самцов (Schultheis et al., 2009). В отличие от гуппи, самцы с двумя одинаковыми Y-хромосомами жизнеспособны. Принцип работы этой треххромосомной системы можно объяснить следующим образом: ген, определяющий развитие мужского пола, есть на Y-хромосоме. Рыбы с генотипом YW являются самками, так как на W-хромосоме есть супрессор, специфичный для Y-хромосомного гена-детерминатора мужского пола. Другая модель предполагает дозовый механизм, при котором W-, X- и Y- несут 0, 1 и 2 копии детерминатора мужского пола соответственно, а для развития по мужскому пути нужно минимум 3 копии. Зеленый меченосец *X. hellerii* не имеет половых хромосом и характеризуется многофакторной системой определения пола, что объясняет отклонения от равного соотношения самок и самцов в потомстве (Peters, 1964). У *X. variatus* и *X. xiphidium* обнаружена простая система с гетерогаметным мужским полом. Данный вывод сделан на основе изучения наследования сцепленных с полом черт окраски (Turner, 1984). Мужская гетерогаметная система с различными аутосомными модификаторами характерна

для *X. nigrensis*, *X. nezahualcoyotl*, *X. milleri*, *X. cortezi*. У *X. alvarezi*, по крайней мере у двух из трех исследованных популяций, обнаружена ZW-система детерминации пола (Turner, 1984).

В работе (Tripathi et al., 2009) приводятся данные по генетическому картированию половых хромосом линий гуппи, полученных из двух популяций. Эта группа исследователей установила, что Y-хромосома гуппи состоит из трех районов. Наиболее проксимальный район не рекомбинирует в мейозе у самцов, однако имеет гомолог на X-хромосоме, в котором у самок происходит свободная рекомбинация. Далее следует относительно короткий участок свободной рекомбинации. Наиболее дистальный район является специфичным для Y-хромосомы и содержит триггер пола и сцепленные с ним гены. Авторы предполагают, что такая система возникла для создания баланса между сохранением полезных самцу синтенных комбинаций генов с одной стороны, и поддержанием разнообразия Y-хромосом в популяции с другой.

Таким образом, из всех позвоночных у рыб наблюдается наибольшее разнообразие систем определения пола. Хотя большинство генов, участвующих в формировании гонад, одни и те же у всех позвоночных, главный переключатель может изменяться достаточно часто, и поэтому даже в молодых семействах, таких как пецилиевые, наблюдается несколько разных систем молодых половых хромосом.

5. Детерминация пола и половые хромосомы у рептилий

У рептилий разнообразие систем определения пола также достаточно велико (Рисунок 3). У них не отмечено функционального гермафродитизма, ни последовательного, ни синхронного. Однако известно много видов, у которых пол определяется температурой инкубации яиц. Таковы все крокодилы, ряд черепах и ящериц. Классический пример зависимости пола от температуры – пятнистый эubleфар (*Eublepharis macularius*, Eublepharidae, Gekkota). При температурах +26..+28°C у эubleфаров вылупляются преимущественно самки, при +29..+30 растёт пропорция самцов, при +31..+32°C она достигает 90%, а при дальнейшем повышении температуры вновь падает (Viets et al., 1993). Установлено, что при

температуре +31..+32°C в примордиальных гонадах усиливается экспрессия гена SOX9 (Valleley et al., 2001) (у млекопитающих – один из главных генов пол-определяющего каскада, его экспрессия управляется геном SRY и вызывает развитие по мужскому пути (da Silva et al., 1996)). Генетическое нехромосомное определение пола, зависящее от нескольких генов с разных хромосом, судя по всему, имеется у обыкновенного калота (*Calotes versicolor*, Agamidae, Iguania) (Sreenivasulu et al., 2002).

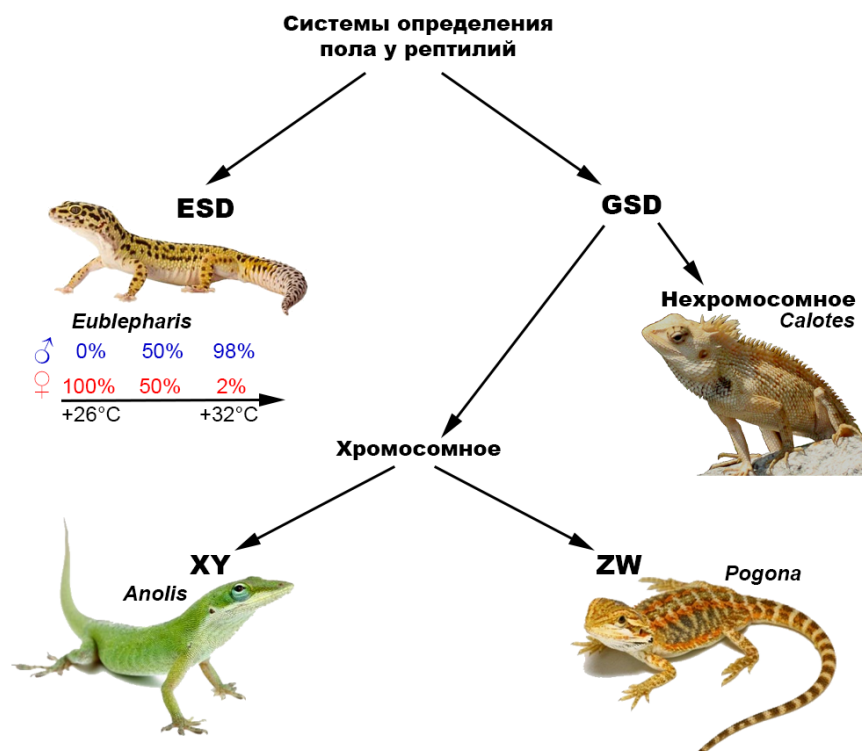


Рисунок 3. Типы детерминации пола у рептилий.

Среди черепах (которых в последнее время причисляют к архозавроморфам, например (Kumazawa, Nishida, 1999)), помимо температурного определения пола, встречаются системы половых хромосом различного независимого происхождения. Например, XY-хромосомы черепах рода *Staurotypus* гомологичны ZW-хромосомам птиц, но аутосомам черепахи *Pelodiscus sinensis*. ZW-хромосомы последнего вида, соответственно, гомологичны аутосомам птиц (Kawagoshi et al., 2014). Родственный вид, *Apalone spinifera*, дивергировавший от *P. sinensis* около 92 млн лет назад, имеет ту же систему половых хромосом, которая, таким образом, является достаточно старой (Badenhorst et al., 2013). XY-хромосомы черепахи

Siebenrockiella crassicollis гомологичны аутосомам птиц и мягкотелых черепах (Kawagoshi et al., 2011), но зато XY-хромосомам неродственной черепахи *Glyptemys insculpta* (Montiel et al., 2016). Это значит, что системы детерминации пола у черепах эволюционируют достаточно быстро, несмотря на то, что их крайне консервативные кариотипы в целом очень похожи на кариотипы птиц.

Распределение видов с половыми хромосомами среди чешуйчатых неравномерно. Существуют системы половых хромосом, характерные для одного вида или нескольких близких - например, для рода американских эублефаров (*Coleonyx*). У *C. elegans* описана система типа X1X2Y, у остальных видов половые хромосомы пока не идентифицированы, но показано наличие генетической, а не температурной детерминации пола (которая, напомним, в том же семействе характерна для клады *Eublepharis/Hemitheconyx*) (Pokorná et al., 2010). Среди гекконов вообще наблюдается наибольшее среди рептилий разнообразие систем определения пола (Gamble, 2010). Широко известен хокоуйский геккон (*Gekko hokouensis*), ZW-хромосомы которого гомологичны ZW-хромосомам птиц, однако приобрели эту роль независимо (Kawai et al., 2009; Srikulnath et al., 2015). Ярко контрастируют с ними такие группы, как змеи (Serpentes), игуаны (Pleurodonta (*Iguanidae sensu lato*)), настоящие ящерицы (Lacertidae).

Ранее считалось, что у всех змей хромосомы ZW-типа, унаследованные от общего предка. Согласно современным данным, он жил более 100 млн лет назад. У высших змей дифференциация между Z- и W-хромосомами обнаружена как на морфологическом уровне (Jones, Singh, 1985), так и на молекулярно-генетическом. В гетероморфной части W-хромосомы у продвинутых змей обнаружена значительная аккумуляция повторенных микросателлитных последовательностей (O'Meally et al., 2010). Ранее считалось, что у змей степень дифференциации половых хромосом, как у птиц, сильнее в более эволюционно молодых группах. Недавние исследования показали, что у ужеобразных (Colubridae) и гадюковых (Viperidae) нерекombинирующие районы полностью совпадают (Vicoso et al., 2013), хотя у гадюковых на W-хромосоме все же потеряно больше генов (Matsubara et al., 2006). Потеря ряда генов, присутствующих на Z-хромосоме, на W-хромосоме у высших змей также показана методом qPCR (Rovatsos et al., 2015a), а методом

секвенирования показано расхождение W- и Z-гаметологов сохранившихся генов (Laorichienpong et al., 2016). Ни в одном из этих исследований не показан выраженный гетероморфизм между хромосомами данной пары у низших змей (удавообразных). Морфологическая их дифференциация отмечена у одного вида – *Acrantophis dumerili* (Mendgen, Stock, 1980). Обычно это объясняют тем, что ZW-хромосомы удавообразных гомоморфны, подобно ZW-хромосомам страусов. Однако в последнее время появляются доказательства, что у удавообразных половые хромосомы XY-типа. Например, у королевского питона *Python regius* существует селекционная цветовая морфа Coral Glow, которая наследуется как XY-сцепленная (Mallery, Carillo, 2016). Также об этом свидетельствует пол потомства от спонтанного партеногенеза у разных групп змей. Спонтанный партеногенез у змей может иметь место при длительном отсутствии самца и происходит путем слияния яйцеклетки со вторым полярным тельцем, то есть потомки являются гомозиготными по большинству локусов (кроме претерпевших кроссинговер). У высших змей все такие детеныши оказываются самцами (ZZ; особи WW, вероятно, нежизнеспособны), а у удавообразных самками (Booth et al., 2014).

У настоящих ящериц также наблюдаются хромосомы ZW-типа, не гомологичные половым хромосомам змей. Из анализа методом FISH-картирования генов следует, что ZW-хромосомы прыткой ящерицы (*Lacerta agilis*) гомологичны аутосомам курицы и полоза (*Elaphe quadrivirgata*) (Srikulnath et al., 2014). При этом Z-хромосома является макрохромосомой, а W-хромосома в ходе дегенерации стала микрохромосомой. Показано, что на W-хромосоме прыткой ящерицы наблюдается сильная амплификация интерстициальных теломерных повторов (TTAGGG) по всей ее длине (Matsubara et al., 2015). При этом CGH не демонстрирует на ней никакого специфического сигнала, а значит, на ней нет или очень мало уникальных последовательностей. У других видов семейства половые хромосомы исследованы к настоящему моменту лишь морфологически (Olmo et al., 1987) и по составу повторов, но не на предмет гомологии с хромосомами других видов. Для лацертид отмечено большое разнообразие W-хромосом, например у *Takydromus sexlineatus* две половые хромосомы близки по размеру, но W-хромосома гетерохроматизована (Olmo et al., 1987). Уровень накопления повторов говорит о том, что половые

хромосомы ящурки (*Eremias velox*) старше половых хромосом американского эублефара (*Coleonyx elegans*) (Pokorná et al., 2011). У ряда форм живородящей ящерицы (*Zootoca vivipara*) отмечена недавняя транслокация половых хромосом на пару аутосом. Описано распространение дифференцированного участка по длине нео-W-хромосомы (Kupriyanova et al., 2008). У китайского живородящего вида *Eremias multiocellata* отмечены гомоморфные, но, согласно данным CGH, полностью дифференцированные половые хромосомы, которые сосуществуют с температурным определением пола (Wang et al., 2015). Данные анализа половых хромосом нескольких видов настоящих ящериц, в том числе *L. agilis*, методом qPCR, указывают на другую пару хромосом, чем данные физического картирования генов (Rovatsos et al., 2016). Возможно, это связано с перестройкой половых хромосом, произошедшей в шведской популяции прыткой ящерицы, образцы из которой анализировались у Srikulnath et al. (2014).

ZW-хромосомы общего происхождения обнаружены у варанов (Varanidae). Для них описаны различные темпы дифференцировки и накопления повторов в разных ветвях семейства (Matsubara et al., 2014). Половые хромосомы варанов представляют собой микрохромосомы. W-хромосома демонстрирует сильный С-позитивный сигнал, а также может быть идентифицирована с помощью CGH. При этом микродиссекционные пробы W-хромосомы одних видов у других красят лишь прицентромерный район, а разные микросателлитные пробы гибридизуются с W-хромосомой у одних видов и не гибридизуются у других. Это значит, что W-хромосома варановых эволюционировала в разных кладах независимо, а у общего предка варанов, вероятно, половые хромосомы были гомоморфными.

Исследования XY-хромосом сцинковых (Scincidae) сейчас находятся на той же стадии, что исследования хромосом игуанообразных в «догеномную эру». Среди сцинков не обнаружено иных систем определения пола помимо XY. У ряда видов исследовано спаривание полового бивалента в мейозе (Hedin et al., 1990). По поводу данных о якобы влиянии температуры на пол у некоторых видов существуют сомнения (Pokorná, Kratochvíl, 2009). Представляется вероятным, что у сцинков также есть древняя система гоносом, сравнимая возрастом с системами гоносом змей и игуанообразных.

У игуанообразных (Pleurodonta, Iguanidae *sensu lato*), в последнее время разделенных на несколько семейств, также с прошлого века обнаруживали дифференцированные половые хромосомы типа XY (Gorman, Atkins, 1966). Некоторые системы были простыми, некоторые сложными (X1X2Y). Как правило, половые хромосомы игуанообразных являются микрохромосомами, но могут увеличиваться в размере при транслокации на них аутосомных фрагментов. Так как среди игуанообразных нет видов с ZW-хромосомами или определением пола температурой, предполагали, что у видов без видимых половых хромосом имеется та же самая XY-пара, но гомоморфная. На этом этапе было выполнено несколько интересных исследований, например спаривания гоносом на стадии синаптонемных комплексов у заборных игуан (*Sceloporus*) (Reed et al., 1990).

Генетически половые хромосомы игуанообразных были идентифицированы в работе, посвященной секвенированию генома каролинского анолиса (*Anolis carolinensis*) – первой рептилии, чей геном был полностью прочтен. Среди выделенных ВАС-клонов был обнаружен один, который при *in situ*-гибридизации на пластинке хромосом самки давал два сигнала, а у самца – только один. Был сделан вывод, что этот фрагмент содержит X-специфичные последовательности, утраченные на Y-хромосоме (Alföldi et al., 2011). Было идентифицировано несколько генов, которые расположены на X-хромосоме анолиса и не имеют гомологов на Y-хромосоме. Затем при помощи FISH с данным клоном на других видах анолисов (Gamble et al., 2013), а также при помощи анализа представленности гомологов X-хромосомных генов анолиса в геномах других видов методом qPCR подтверждено общее происхождение сначала половых хромосом всех анолисов, а затем и всех игуанообразных (Rovatsos et al., 2014). Суть данного метода заключается в измерении количества копий гена в образце геномной ДНК: для X-специфичных генов оно должно быть вдвое меньше, чем для аутосомных и псевдоаутосомных. Возраст системы половых хромосом игуанообразных оценивают в 73-123 млн лет.

У агамид (Agamidae) системы половых хромосом варьируют. У ряда видов обнаруживается температурное определение, у других генетическое нехромосомное (Sreenivasulu et al., 2002), у третьих половые хромосомы

различного происхождения. У бородатой агамы (*Pogona vitticeps*), популярного террариумного вида, обнаружены половые микрохромосомы ZW-типа (Ezaz et al., 2005). При помощи клонирования ZW-специфичного фрагмента и его гибридизации на хромосомах других агам показано, что у большинства видов гомологи половых хромосом бородатой агамы являются аутосомами, у двух близкородственных видов точно также являются ZW-хромосомами, и у одного вида есть ZW-пара, не гомологичная данной (Ezaz et al., 2009). Также на бородатой агаме показан теоретически предсказанный переход от «слабой» системы половых хромосом с неабсолютным действием обратно к температурному определению пола, происходящий сейчас в некоторых популяциях (Holleley et al., 2015). Следовательно, XY-хромосомы игуан возникли уже после отделения их от родственного семейства агамид.

Кариология хамелеонов (Chameleoniae) изучена в целом недостаточно. У двух исследованных видов, *Furcifer oustaleti* и *F. pardalis*, обнаружены ZW-системы определения пола, вероятно, имеющие общее происхождение (Rovatsos et al., 2015b). *F. pardalis* имеет систему Z1Z2W ($2n=21/22$), а *F. oustaleti* имеет простую ZW-систему ($2n=22$). При этом данные CGH показывают, что у первого вида почти весь добавленный аутосомный фрагмент уже дифференцирован и насыщен специфичными для самок последовательностями, хотя морфологически мало отличается от своего Z2-гомолога.

Игуанообразные являются наиболее удобной моделью для изучения половых хромосом рептилий. Из всех пар половых хромосом, которые известны у рептилий, гоносомы игуанообразных лучше всего изучены: установлен их состав, доказано общее происхождение, для них существуют сортированные FISH-пробы. Наконец, пахитенные клетки самцов у рептилий получать намного проще, чем пахитенные клетки самок.

6. Половые хромосомы у птиц

При изучении молодых систем половых хромосом важно сравнивать их с древними системами. Среди позвоночных наиболее широко распространенные древние системы – это ZW-хромосомы птиц и XY-хромосомы высших

млекопитающих. Птицы, с кладистической точки зрения, являются продвинутой и высокоспециализированной ветвью рептилий, родственной крокодилам и, в меньшей степени, черепахам (Kumazawa, Nishida, 1999). Кариологически птицы и черепахи очень похожи. Обе группы характеризуются наличием нескольких пар крупных макрохромосом и большим количеством микрохромосом. Они сохраняют больше предковых микрохромосом, чем чешуйчатые рептилии (часто более 20 пар против 0-12 пар у чешуйчатых) (Ellegren, 2010).

Половые хромосомы птиц известны давно и изучены достаточно подробно (Graves, 2014). Z-хромосома курицы является макрохромосомой, шестой по порядку длины. W-хромосома курицы меньше и сильно гетерохроматизирована. У других птиц, даже отдаленно родственных бескилевых страусов и эму, ZW-хромосомы гомологичны куриным. Это показано хромосомным пейнтингом и генетическим картированием (Shetty et al., 1999; Nanda et al., 1999; 2008). Z-хромосома очень консервативна, присутствуя как отдельный элемент у всех птиц и даже у рептилий (у большинства рептилий она является аутосомой) (Ellegren, 2010; Pokorná et al., 2011). Транслокации редки, хотя у пеничек известен случай добавления на Z-хромосому аутосомного материала (Pala et al., 2012). Однако генетическое картирование и секвенирование геномов выявило много перестроек внутри Z-хромосомы (Nanda et al. 2008).

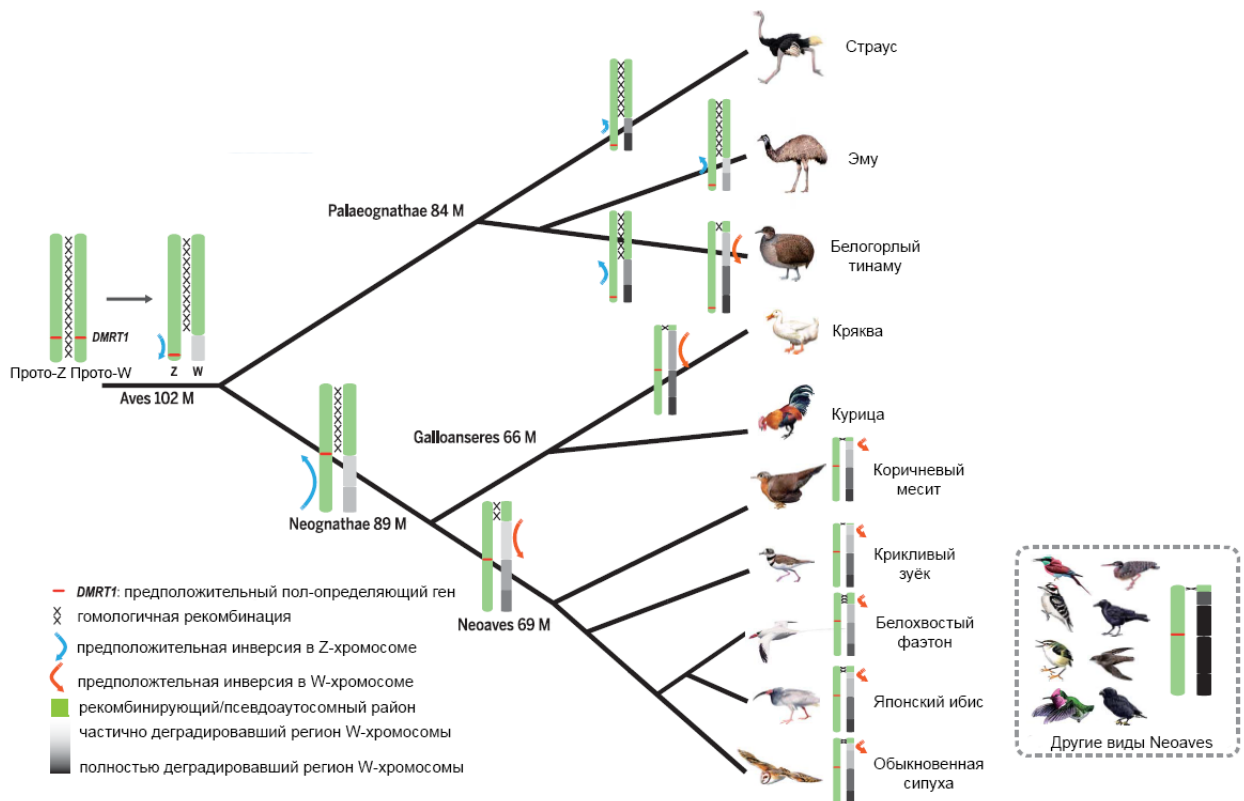


Рисунок 4. Схема эволюции половых хромосом в разных группах птиц (по Zhou et al., 2014). М – миллионы лет назад.

В отличие от нее, W-хромосома у разных птиц очень сильно отличается по размеру и геномному составу (Рисунок 4). У большинства килевых птиц она маленькая и состоит из гетерохроматина, но у бескилевых (древних нелетающих птиц вроде страуса и эму) она почти так же велика, как Z, и отличается только позицией центromеры (Pigozzi, Solari, 1997). По данным хромосомного пэйнтинга, W-хромосома бескилевых гомологична Z-хромосоме по всей длине кроме небольшого района в районе центromеры (Shetty et al., 1999). У нанду на W-хромосоме есть небольшая делеция (Nishida-Umehara et al., 2007). Картирование рекомбинационных узелков с помощью иммулокализации MLH1 показало, что у тинаму половые хромосомы более дифференцированы, чем у страусов, но менее дифференцированы, чем у новонебных (Pigozzi, 2011).

Различие в темпах деградации также отражается в различных стадиях инактивации и потери генов на W-хромосоме. Например, некоторые гены у страуса есть на обеих половых хромосомах, а у килевых птиц только на Z-хромосоме

(Ogawa et al., 1998). У килевых птиц некоторые гены присутствуют на обеих хромосомах у одних видов и только на Z-хромосоме у других (Itoh et al., 2009). Это означает, что половые хромосомы птиц в разных линиях дивергировали независимо.

Не все гены в нерекombинирующей части W-хромосомы утеряны. Некоторые гены Z-хромосомы имеют гомологи (гаметологи) на W-хромосоме. Между их нуклеотидными последовательностями наблюдается значительная дивергенция (Suh et al., 2011). Методом анализа различий в экспрессии генов у самцов и самок курицы было идентифицировано 26 W-хромосомных генов (Ayers et al., 2013). Методом полногеномного секвенирования выявлено 24 таких гена у утки, 55 у страуса и 198 у тинаму (Zhou et al., 2014), тогда как на Z-хромосоме их около 1000. Многие идентифицированные W-гаметологи повреждены и псевдогенизированы. Сравнение последовательностей Z- и W-гаметологов позволило идентифицировать на половых хромосомах птиц так называемые страты – участки хромосом, ступенчато включавшиеся в состав нерекombинирующего района, вероятно путем инверсий. В разных линиях птиц эти инверсии происходили независимо. В целом, нерекombинирующий район расползлся от терминально расположенного гена DMRT1, который, возможно, является у птиц геном-триггером пола (см. ниже).

Когда Z-хромосома птиц стала половой, она начала проводить в телах самцов в полтора раза больше эволюционного времени, чем в телах самок. Хотя она и не является пол-специфичной, на нее стали действовать, более слабо, те же силы, которые действуют на пол-специфичные хромосомы. Аналогичная картина наблюдается у X-хромосомы млекопитающих. Так, на Z-хромосоме птиц присутствует большой кластер генов, экспрессирующихся в семенниках (Bellott et al., 2010). Также там увеличена концентрация повторов и уменьшена плотность генов, по сравнению с аутосомными ортологами других видов, как и на X-хромосоме у млекопитающих. На Z-хромосоме у птиц повышена концентрация генов, экспрессирующихся преимущественно у самцов, и уменьшена концентрация генов, экспрессирующихся у самок, по сравнению с аутосомами (Ellegren, 2009; Naurin et al., 2012). Это касается даже псевдоаутосомных районов (Janes et al., 2009). Следовательно, данный процесс не связан с потерей W-гаметологов, а

вызван интенсивным половым отбором у птиц или повышенным мутационным фоном в семенниках, где клеткам приходится проходить очень много циклов деления.

Можно предположить, таким образом, что любые формы естественного отбора способствуют хромосомной эволюции, ускоряя даже дифференциацию половых хромосом, которая считается автоматическим процессом. Это связано с тем, что при отборе (уменьшении числа особей, дающих потомство) усиливается дрейф генов и повышается вероятность фиксации любых мутаций, даже не связанных с вектором отбора. Этим объясняется гомоморфность половых хромосом «низших» птиц, «низших» змей, и, возможно, других архаичных живых форм со стабильной морфологией.

Долгое время было неизвестно, как именно половые хромосомы птиц определяют пол. У птиц нет гена SRY, а его «предок», ген SOX3, является аутосомным (Graves, 2013). Сложно даже определить, присутствует ли у птиц феминизирующий ген на W-хромосоме или же дозозависимый маскулинизирующий ген на Z-хромосоме, так как у птиц, в отличие от млекопитающих, не обнаружены достоверные анеуплоиды по половым хромосомам (ZO и ZZW) (Graves, 2003). Существуют единичные сообщения о триплоидных ZZW-птицах, являющихся самками (Kürper et al., 2012) или же начинающих развиваться как самки, но затем претерпевающих дегенерацию гонад (Lin et al., 1995), что предполагает наличие феминизирующего действия W-хромосомы. Однако при секвенировании и генетическом картировании не найдено ни одного уникального гена, который был бы на W-хромосоме, но отсутствовал на Z-хромосоме. Хотя это и не исключает возможного пол-определяющего действия (разница в последовательности между гаметологами может делать их функции различными, как в случае с SRY и SOX3), ни один из предложенных кандидатных генов не подошел на роль полового триггера. Некоторые из них действительно активны в яичниках, но присутствуют лишь у некоторых видов птиц; один многообещающий ген, HINTW, был введен с помощью вируса в ZZ-эмбрионы и не оказал на них никакого действия (Smith et al., 2009b). Вероятно, гены с W-хромосомы важны для формирования яичников, подобно тому, как гены с Y-

хромосомы млекопитающих важны для формирования семенника, но они не играют роли триггера.

Поэтому была предложена теория дозового механизма определения пола у птиц, когда для развития по мужскому типу нужно 2 копии Z-хромосомного гена, а для развития по женскому типу одна. Лучшим кандидатом считался ген DMRT1 («транскрипционный фактор, имеющий отношение к генам *doublesex* и *ma3*»). Оба эти гомологичные ему гена играют роль в детерминации пола у беспозвоночных. У человека делеция аутосомного гена DMRT1 ведет к реверсии пола у мужчин. У птиц он усиленно экспрессируется в прото-гонадах самцов и обращенных гормонально неосамцов. Также DMRT1 у страусов – один из немногих генов, находящихся в их маленьком Z-специфичном районе (Shetty et al., 2003). Данный ген известен как детерминатор пола у некоторых других позвоночных. Например, у медаки его дополнительная копия, DMY, характеризует Y-хромосому. У шпорцевой лягушки существует неактивная дополнительная копия DMRT1, DMW, на W-хромосоме. Ее продукт конкурирует с нормальной копией, понижая ее экспрессию и вызывая феминизацию (Zarkower, 2013).

Важное доказательство было получено при нокдауне гена DMRT1 у курицы с помощью РНК-интерференции (Smith et al., 2009a). У ZZ-эмбрионов с уменьшенной экспрессией DMRT1 падал уровень экспрессии SOX9, гена мужского регуляторного пути, повышался уровень ароматазы, морфология и гистология гонад отклонялась в сторону сходства с яичниками. Таким образом, для правильного формирования пола птиц, вероятно, важны обе половые хромосомы, однако именно доза DMRT1 играет решающую роль.

Существует ряд работ по спариванию и рекомбинации полового бивалента у птиц. Большинство из них выполнены группой М. Пигоцци из Аргентины. Ими были исследованы как архаичные птицы (тинаму и страусы), так и новонебные. Хронологически первая работа посвящена спариванию и рекомбинации ZW-хромосом у курицы и перепела (Solari, 1992). Автор обнаружил, что длинная Z-хромосома и короткая W-хромосома начинают спариваться в коротком псевдоаутосомном районе. Затем Z-хромосома укорачивается, а также оборачивается вокруг W-хромосомы, после чего происходит спаривание

терминальных концов. В конце пахитены и в диплотене десинапсис половых хромосом начинается в обратном порядке: сначала расплетаются негомологичные участки, а затем псевдоаутосомный район. На других видах новонебных получены сходные данные (Solari, Pigozzi, 1993). У разных видов тинаму, древнеебных птиц, отдаленно родственных страусам, наблюдается разная длина псевдоаутосомного района и различная степень дифференциации между половыми хромосомами по длине. У тинаму *Crypturellus tataupa* псевдоаутосомный район такой же короткий, как у новонебных птиц, а у *Rynchotus rufescens* он занимает более 60% длины W-хромосомы (Pigozzi, Solari, 1999; Pigozzi, 2011; Pigozzi, Solari, 2005). Из четырех исследованных видов тинаму последний вид имеет самый длинный псевдоаутосомный район, на котором даже может присутствовать два кроссовера, тогда как у остальных, подобно новонебным птицам, он может быть всего один. У страуса нанду (*Rhea americana*) и у малого нанду (*Pterocnemia pennata*) рекомбинация возможна на 80% длины половых хромосом, и кроссоверов на этом пространстве может быть до трех (Pigozzi, Solari, 1997; 1999). Процессы синапсиса у всех этих птиц протекают сходно с курицей, причем у страусов из-за почти одинаковой длины двух хромосом эквивализация выражена минимально.

Недавно опубликовано детальное исследование мейотического поведения полового бивалента у курицы (Guioli et al., 2012). Ранее сложно было понять, являются ли неспаренные и неполно спаренные биваленты ранними (в процессе спаривания) или поздними (десинаптирующими). Авторы провели иммуноокрашивание белка RPA на препаратах профазных ооцитов курицы. Они выяснили, что белок RPA, маркирующий двуцепочечные разрывы, присутствует только на ранних стадиях, и исчезает в процессе синапсиса. Таким образом, по наличию сигнала RPA они смогли отличить половые хромосомы, которые никогда не были спарены, от прошедших рекомбинацию и уже расходящихся. Оказалось, что частота асинапсиса полового бивалента составляет около 20%, что примерно в 4 раза чаще, чем у мыши. При этом клетки с асинапсисом не подвергаются апоптозу и доходят до диплотены, тогда как у мыши клетки с асинапсисом детектируются во время пахитенного чекпойнта и уничтожаются. Следовательно, у курицы либо возможна асинаптическая сегрегация хромосом (которая обнаружена

ранее у полёвок, Borodin et al., 2012), либо точка чекпойнта находится позднее диплотены.

При обзоре хромосомных путей определения пола у позвоночных можно заметить, что некоторые хромосомы становятся половыми чаще, чем другие. Например, Z-хромосоме птиц гомологичны Z-хромосома хокоуйского геккона, X-хромосома черепахи *Staurotypus*, X5-хромосома утконоса. X-хромосома игуанообразных гомологична Z-хромосоме черепахи трионикса. Вероятно, набор генов, способных в принципе стать детерминаторами пола, достаточно ограничен, а из числа этих генов вероятность для одних выше, чем для других. Поэтому неодинаков и шанс для разных хромосом приобрести полоопределяющую функцию (O'Meally et al., 2012). Выше, однако, упомянуты примеры шпорцевой лягушки и медаки, которые приобрели половые хромосомы путем транслокации на аутосомы дополнительной копии гена, который изначально лежит на другой хромосоме. Значит, в принципе стать половой может любая хромосома.

7. Выбор видов и методов для исследования синапсиса и рекомбинации половых хромосом

В качестве объекта для исследования половых хромосом рыб нами была выбрана гуппи (комплекс видов *Poecilia reticulata*). Данный выбор был обусловлен несколькими причинами. Во-первых, гуппи обладают хорошо выраженными и дифференцированными половыми хромосомами, достаточно легко различимыми на препарате, а значит достаточно простыми для исследования. Во-вторых, гуппи является популярным модельным объектом, ее генетика хорошо изучена. Возраст половых хромосом гуппи оценивают в 10-15 млн лет (Meredith et al., 2011). Это время отделения гуппи от ближайшей сестринской клады, в которой данная система половых хромосом не наблюдается.

Для исследования половых хромосом игуанообразных был выбран род *Anolis*. Он лучше других родов игуанообразных изучен с точки зрения геномики и кариологии. Игуанообразные, агамы и хамелеоны являются монофилетической группой. Среди них достаточно широко распространен кариотип $2n=36$ (6 пар макрохромосом и 12 пар микрохромосом), который считается предковым. Именно

такой кариотип сохранен у многих видов рода *Anolis*. Исследование видов с архаичным кариотипом позволит сравнить полученные данные с данными по большому количеству других более или менее родственных видов. Каролинский анолис (*A. carolinensis*) становится в генетике рептилий модельным видом, поэтому информация о строении и поведении в мейозе его половых хромосом является особенно актуальной. Для сравнения с ним выбран близкородственный вид – белогубый анолис (*D. coelestinus*). Возраст половых хромосом игуанообразных оценивают в 73-123 млн лет (Rovatsos et al., 2014). Таким образом, система XY-хромосом гуппи демонстрирует раннюю стадию дифференцировки, а XY-хромосомы анолисов – промежуточную между ранней стадией у гуппи и поздней стадией у млекопитающих и птиц.

В качестве модели для изучения половых хромосом птиц были выбраны крачки (Sternidae, Charadriiformes) – речная крачка, *Sterna hirundo*, и черная крачка, *Chlidonias niger*. По данным мтДНК, время дивергенции между ними составляет 8-9 млн лет (Bridge et al., 2005). Данные виды птиц являются широкоареальными и многочисленными, их биология хорошо изучена. Хромосомы *S. hirundo* ранее описывались лишь с помощью рутинной окраски (Hammar, 1970), а *Ch. niger* еще не изучена с цитогенетической точки зрения, что делает эти виды актуальным объектом для нашего исследования. Малый срок дивергенции позволит выявить отличия в строении древних половых хромосом, возникшие за короткое эволюционное время. К настоящему моменту синапсис и рекомбинация половых хромосом подробно охарактеризованы с использованием современных цитологических методов лишь у небольшого числа видов птиц, в основном из базальных групп Paleognathae и Galloanserae.

Существуют различные методы измерения рекомбинации. Часто применяется генетический метод, заключающийся в изучении наследования морфологических и генетических признаков в ряду поколений (Tripathi et al., 2009b). Однако этот метод является трудоемким, предполагая массовое разведение животных в лаборатории и разработку большого числа маркеров, и не позволяет выявить положение точек рекомбинации на физической карте хромосом. Методы классической цитогенетики, в частности анализ хиазм в первой метафазе мейоза,

позволяют использовать небольшое число животных и визуализировать обмены непосредственно на хромосомах. Однако сильная компактизация ДНК в метафазе не позволяет исследовать небольшие гетероморфизмы, микрохромосомы, а также точно локализовать обмены на хромосомах. В последние 10-15 лет рекомбинацию и синапсис хромосом в мейозе все чаще изучают при помощи иммунофлуоресцентного анализа синаптонемных комплексов (СК) – белковых осей пахитенных хромосом (Anderson et al., 1999). Имея все преимущества метода анализа хиазм в метафазе, этот метод лишен его недостатков, связанных с малым разрешением, так как в пахитене уровень компактизации хромосом намного ниже. Это позволяет точнее локализовать точки кроссинговера на хромосомах. Меньшая степень компактизации хроматина в пахитене также позволяет анализировать микрохромосомы. У многих видов рептилий половые хромосомы находятся именно среди микрохромосом. Синапсис гомологов также позволяет выявить даже небольшие гетероморфизмы между ними, проявляющиеся в асимметрии СК, что позволяет анализировать слабо дифференцированные половые хромосомы. Таким образом, именно этот метод был выбран нами для исследования рекомбинации и синапсиса половых хромосом рыб, рептилий и птиц.

Для визуализации синаптонемных комплексов используют антитела против белка боковых элементов синаптонемного комплекса (SYCP3). Точки рекомбинации визуализируют антителами против белка мисматч-репарации MLH1, присутствующего в зрелых рекомбинационных узелках. Ранее было показано, что MLH1 выявляется на СК мыши в виде дискретных точечных сигналов, причем количество сигналов приблизительно соответствует ожидаемой частоте кроссинговера (Baker et al., 1996). Андерсон с сотрудниками (Anderson et al., 1999) установили, что число и распределение флуоресцентных сигналов MLH1 соответствует числу и распределению хиазм, изученному у мыши ранее (Polani, 1972, Lawrie et al., 1995). Позднее, соответствие точек локализации сигналов MLH1 рекомбинационным сайтам было также подтверждено на основе сопоставления генетических и иммуноцитологических карт (Froenicke et al., 2002). Иммунолокализация белка MLH1 успешно используется также в цитогенетике рыб (Moens, 2006).

У гуппи для распознавания полового бивалента использовали С-подобное окрашивание с использованием DAPI и GISH (genomic in situ hybridization, FISH с полногеномным зондом) с флуоресцентно меченой пробой ДНК самца после фиксации результатов иммуноокрашивания. С-подобное окрашивание DAPI неоднократно применялось в исследованиях метафазных хромосом рыб (Russo et al., 1999, Sola et al., 1990), растений (Barros e Silva, Guerra, 2010), насекомых (Bella, Gosálvez, 1991), человека (Heng, Tsui, 1993). Однако для анализа пахитенных хромосом метод С-подобного окрашивания при помощи DAPI был применен нами впервые (Lisachov, 2013). GISH позволила выявить на половом биваленте тот же дистальный блок повторенных последовательностей, что и С-подобное окрашивание DAPI.

Половой бивалент у анолисов был идентифицирован по морфологии, а также по наличию DAPI-позитивной области, выявляемой на необработанных препаратах без С-подобного окрашивания. У *A. carolinensis* были дополнительно использованы сортировочные FISH-пробы, предоставленные Трифионовым В. А.

Для идентификации прицентромерных последовательностей у гуппи также использовали С-подобное окрашивание DAPI.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал

В качестве материала для исследования половых хромосом гуппи были использованы взрослые самцы обыкновенных гуппи *Poecilia reticulata* (декоративная линия Red) и гуппи Эндлера *Poecilia wingei*, полученные из зоомагазинов. Для приготовления препаратов отбирались молодые половозрелые самцы в возрасте от 3-х месяцев.

В качестве материала для исследования половых хромосом анолисов были использованы взрослые самцы каролинского анолиса (*Anolis carolinensis*) и белогубого анолиса (*Deiropyx coelestinus*), полученные из зоомагазинов. Сортировочные пробы микрохромосом *Anolis carolinensis* были предоставлены В. А. Трифоновым. Были использованы 2 пробы: “L” (X-хромосома и хромосома 14) и “J” (X-хромосома и хромосома 12).

В качестве материала для исследования половых хромосом крачек были использованы птенцы женского пола в возрасте 1-3 суток, отловленные на Карасукской биостанции Института систематики и экологии животных СО РАН совместно с А. В. Друзякой и А. Ю. Зотовым (окрестности г. Карасук, Новосибирская область).

Приготовление препаратов СК

Препараты СК гуппи готовили из свежих семенников по методике Моэнса (Moens, 2006). На заранее подготовленные предметные стекла с полилизинным покрытием наносили 8 капель гипотонического раствора 1/3×PBS (10 мкл PBS и 20 мкл деионизированной воды). Семенники выделяли в маленькой чашке Петри, заполненной PBS, и переносили в круглодонную чашку в каплю PBS объемом 50-100 мкл. Мацерировали при помощи препаровальных игл и пипетки до получения гомогенной суспензии. В каждую каплю гипотонического раствора вносили 1 мкл суспензии. После этого стекла оставляли во влажной камере на 20 минут. По прошествии этого времени гипотонический раствор сливали, вместо него на всё стекло наносили 500 мкл 2% параформальдегида и фиксировали клетки в течение

трех минут. Затем фиксатор сливали, стекла промывали в 0,4% Kodak PhotoFlo и высушивали.

Препараты СК рептилий и птиц готовили по методике Петерса с соавторами (Peters et al. 1997). Выделенные семенники или 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 минут. Затем фрагменты семенника мацерировали в 40 мкл раствора 100 мМ сахарозы при pH=8,2. Остатки семенников удаляли, а суспензию наносили порциями по 20 мкл на предметные стекла, покрытые 1% раствором параформальдегида, и распределяли наклоном стекла. Затем препарат оставляли сушиться во влажной камере в течение 1-2 часов. Высушенные препараты промывали в 0,4% Kodak PhotoFlo.

Приготовление препаратов метафазных хромосом

Для приготовления препаратов метафазных мейотических хромосом гуппи применяли семенники взрослых самцов, выдержанных в течение 6 часов в 0,05% растворе колхицина. Семенники выделяли в PBS, затем переносили в гипотонический раствор KCl (0,56%) и измельчали в нем. После суспендирования объем гипотонического раствора увеличивали до 8 мл и выдерживали 25 мин. 8 мл суспензии разливали по пробиркам объемом 2 мл и центрифугировали в центрифуге Eppendorf 5418 при 1000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант сливали и обрабатывали клетки фиксатором из уксусной кислоты и метанола (1:3) при -20° С в течение 15 мин. Затем снова центрифугировали суспензию при 1000 об/мин в течение 5 мин и сменяли фиксатор. После 20 мин фиксации фиксатор сменяли снова, и наносили суспензию каплями на влажные полилизинные стекла.

Иммуноокрашивание

Иммуноокрашивание проводили по методике Андерсон с соавторами (Anderson et al., 1999) с небольшими модификациями. Препараты гуппи пермеабелизировали в течение 20 минут в 10 мМ растворе цитрата натрия (pH=6) с 0,1% Tween-20 при температуре 95°С. После остывания раствора на воздухе в течение 20 минут препараты дважды промывали в PBS с 0,1% Tween-20 в течение 2

минут. У рептилий и птиц эти два шага опускали. После высушивания наносили на препараты 500 мкл 10% PBT (PBS, 0,05% Tween-20, 3% BSA (Sigma-Aldrich, США) для блокирование неспецифического связывания антител и выдерживали в течение 45 минут. Затем инкубировали 12 ч при 4°C или 37°C с поликлональными антителами кролика к SYCP3 человека (Abscam, 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 или 1:20 в PBT. Препараты отмывали три раза по 15 мин в PBS и инкубировали 60 мин при 37°C с антителами осла 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 флуоресцентными метками AMCA, Cy3 или FITC (Vector Laboratories) в разведении 1:100 или 1:20 согласно стандартному протоколу. Препараты отмывали в PBS, высушивали и наносили 15 мкл раствора антифэйда с красителем DAPI (Vectashield with DAPI; Vector Laboratories) для окрашивания ДНК и предотвращения гашения флуоресценции, затем накрывали покровным стеклом.

С-подобное окрашивание

У группы после фиксации результатов иммуноокрашивания проводилось С-подобное окрашивание при помощи DAPI.

Перед С-подобным окрашиванием покровное стекло снимали, препараты отмывали от антифэйда 5 минут в 2×SSC и дегидрировали в серии спиртов 70%, 80% и 100% по две минуты. После высушивания препараты выдерживали в течение 20 минут в 0,2 М HCl, промывали дистиллированной водой. Затем инкубировали 5-6 минут в насыщенном растворе Ba(OH)₂ при температуре 55° С, снова промывали в 0,2 М HCl и дистиллированной воде, после чего выдерживали в 2xSSC в течение 60 минут при температуре 60° С. После наносили 15 мкл антифэйда с DAPI и прикрывали покровным стеклом.

Получение полногеномной ДНК-пробы гуппи

Образцы ДНК были выделены из цельных тушек самцов гуппи и гуппи Эндлера с предварительно удаленными внутренними органами при помощи стандартного набора для выделения ДНК (Axygen). Амплификация полногеномной пробы была проведена при помощи набора Sigma WGA-4 по протоколу производителя. Включение меченых нуклеотидов (Flu12-dUTP) проводилось при помощи ПЦР. После прохождения реакции в пробирку добавляли 3 объема этанола и 1/50 объема 5 М NaCl и помещали ее в морозильную камеру на ночь при -20°C для осаждения пробы. На следующий день меченую ДНК отделяли центрифугированием на центрифуге Eppendorf 5418 при 14000 об/мин в течение 20 мин, сливали супернатант, промывали 300 мкл 70% этанола, снова центрифугировали при аналогичных параметрах, сливали супернатант и высушивали. После этого пробу растворяли в гибридизационной смеси.

Проведение FISH

Стоковый раствор гибридизационной смеси включал 500 мкл формамида, 290 мкл воды, 10 мкл Tween-20, 100 мг декстран-сульфата натрия. Для проведения гибридизации к осадку пробы гуппи добавляли 37,5 мкл стокового раствора гибридизационной смеси, 12,5 мкл воды. Пробы анолиса были предоставлены в виде растворов ДНК, меченой Flu12-dUTP. Для проведения гибридизации к 37,5 мкл стокового раствора гибридизационной смеси добавляли 7,5 мкл воды и 5 мкл раствора пробы.

При проведении FISH на препаратах мейотических хромосом после фиксации результатов иммуноокрашивания покровное стекло снимали, препараты отмывали от антифэйда 5 минут в $2\times\text{SSC}$ и дегидрировали в серии спиртов 70%, 80% и 100% по две минуты. Затем их обрабатывали РНКазой А (2 мкг/мл) в $2\times\text{SSC}$ в течение часа при 37°C . После РНКазы отмывали в $2\times\text{SSC}$, дегидрировали в серии спиртов возрастающей концентрации (70%, 80%, и 100%) по 2 мин и высушивали при комнатной температуре. Денатурацию препаратов проводили в 70% формамиде в $2\times\text{SSC}$ в течение 3 минут при 75°C . После этого препараты немедленно дегидрировали в серии спиртов (70%, 80%, и 100%) при -20°C по 2

минуты. Одновременно проводилась денатурация ДНК-пробы при 96° С в течение 4 минут. В ряде случаев данный этап опускали, и денатурацию препаратов и ДНК-пробы проводили после нанесения пробы на стекло, также при 75° С в течение 3 минут.

Затем препараты высушивали на воздухе и под большое покровное стекло (55мм x 24мм) наносили 50 мкл ДНК-пробы в гибридизационной смеси. Гибридизацию проводили в течение ночи во влажной камере в термостате при 37° С. По окончании гибридизации покровные стекла аккуратно смывали в 2×SSC, и препараты трижды отмывали в 2×SSC по 3 мин и в растворе свежеприготовленного 50% формамида в 2×SSC в течение 3 мин на водяной бане при температуре 45° С. После дегидрировали в серии спиртов (70%, 80%, и 100%), высушивали на воздухе, наносили раствор антифэйда с DAPI в концентрации 1,5 мкг/мл и накрывали покровным стеклом.

При проведении FISH на метафазных хромосомах после обработки РНКазой включали дополнительный этап обработки пепсином. После отмывки от РНКазы препараты высушивали на воздухе в течение 10 мин, затем наносили на них 400-500 мкл 0,05% раствора пепсина в 10 мМ HCl (pH=2) и помещали во влажную камеру на 10 мин при 37° С. По истечении данного времени препараты отмывали в PBS в течение 5 мин, в PBS с 50 мМ MgCl₂ в течение 5 мин, в PBS с 50 мМ MgCl₂ 1% параформальдегида в течение 10 мин, в PBS в течение 5 мин. Затем проводили дегидратацию в серии спиртов (70%, 80%, и 100%) по 3 мин. После этого действовали согласно протоколу выше.

Окрашивание серебром (Ag-NOR) и электронная микроскопия

Окрашивание нитратом серебра проводили по стандартному методу (Howell, Black, 1980). На стекло наносили одну каплю 30% раствора нитрата серебра и одну каплю проявителя (200 мг желатина и 100 мкл муравьиной кислоты на 20 мл воды), накрывали покровным стеклом и выдерживали при +60° С в течение 2-3 мин. Затем препараты покрывали пластиковой пленкой, и переносили фрагменты на сеточки для электронной микроскопии. Электронно-микроскопический анализ проводили на микроскопе JEM-100 (JEOL, Япония) при напряжении в 80 кВ.

Фотографирование и анализ изображений

Микроскопический анализ проводили в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Препараты анализировали на микроскопе Axioplan 2 (ZEISS, Германия) снабженным 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.

Измерение длин хромосом и относительного положения точек рекомбинации производили при помощи программы MicroMeasure 3.3. Обработку полученных данных проводили в MS Office Excel 2010. Измерение кроссоверной интерференции проводили в программе CODA (Gauthier et al., 2011). Статистические тесты осуществляли в программе STATISTICA.

Для построения рекомбинационных карт хромосомы или их плечи разделяли на определенное число равных интервалов, и для каждого интервала подсчитывали относительное число бивалентов, в которых на данном интервале встречаются сигналы MLH1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Начальные этапы дифференциации половых хромосом на примере гуппи (*Poecilia reticulata*, *Poecilia wingei*)

Для гуппи характерна система половых хромосом XY-типа. Исходя из времени дивергенции гуппи и их ближайших родственников в роде *Poecilia*, она возникла 10-15 млн лет назад. Y-хромосома больше, чем X-хромосома, за счет блока С-гетерохроматина, обогащенного повторенными последовательностями. С Y-хромосомой сцеплено несколько генов, отвечающих за окраску самца.

1.1 Кариотипы. Идентификация XY-бивалента

Была проанализирована 181 клетка *P. reticulata* от трех самцов декоративной линии Red. Полная длина СК составила $139,9 \pm 20,4$ мкм. Практически во всех исследованных клетках у обоих видов гуппи число бивалентов было равно 23, что соответствует литературным данным о кариотипе гуппи ($2n=46$) (Рисунок 5, Рисунок 7). Известно, что на половых хромосомах гуппи есть крупный дистальный район полового гетерохроматина, обогащенный повторенными последовательностями (Nanda et al., 1990; Traut, Winking, 2001). Для его визуализации и идентификации полового бивалента были использованы два подхода.

При окрашивании DAPI необработанных пахитенных хромосом гуппи наблюдается равномерное окрашивание их по всей длине, без выделения каких-либо участков. Однако мы обнаружили, что окрашивание данным красителем препаратов, обработанных гидроокисью бария по стандартному протоколу предобработки перед С-окрашиванием, позволяет визуализировать яркие сегменты, соответствующие сегментам конститутивного гетерохроматина. На аутосомах DAPI-позитивные области выявляются в районе центромеры, остальная часть хромосомы окрашивается значительно бледнее. На половом биваленте помимо центромеры выделяется большой блок гетерохроматина в дистальном районе. Замечено, что качество окрашивания зависит от времени инкубации в растворе гидроксида бария и возраста препаратов. Старые препараты возрастом 5-6 месяцев окрашиваются лучше свежих. На свежих препаратах центромеры и половой

гетерохроматин относительно слабо выделялись на общем фоне. Увеличение времени обработки гидроксидом бария до 10 минут не приводило к улучшению качества окрашивания. Уменьшение времени обработки до 3,5 минут привело к полностью равномерному окрашиванию, подобному картине на необработанных препаратах. Тестирование данного метода на препаратах СК млекопитающих показало более качественные и не зависящие от возраста препаратов результаты, чем были получены у гуппи (Рисунок 6).

Метод дифференциального окрашивания при помощи флуоресцентного красителя DAPI после обработки гидроксидом бария был применен нами на пахитенных хромосомах впервые. Полученные результаты позволяют говорить о его перспективности при анализе хромосом на стадии пахитены при отсутствии подходящих антител к белкам центромеры или центромер-специфичных меченых проб ДНК. Важно отметить, что на пахитенных хромосомах мыши DAPI выявляет яркие области, совпадающие с областями C-гетерохроматина без какой бы то ни было предварительной обработки (Anderson et al., 1999). Нам удалось показать, что возможно получить подобное дифференциальное окрашивание и у тех организмов, чьи хромосомы DAPI не окрашивает дифференциально при обычных условиях. Менее качественный результат, полученный на свежих препаратах в сравнении со старыми, говорит, возможно, о необходимости некоторой степени деградации ДНК для успешного окрашивания. При предобработке хромосом кислотой и щелочью происходит денатурация и частичная фрагментация ДНК. Явление C-подобного окрашивания DAPI может объясняться меньшим уровнем потери ДНК в районах, обогащенных повторенными последовательностями, за счет образования при ренатурации в растворе 2×SSC разветвленных нуклеопротеидных структур, затрудняющих вымывание фрагментированной ДНК из этих районов (Barros e Silva, Guerra, 2010). Описание метода опубликовано в журнале *Comparative Cytogenetics* (Lisachov, 2013).

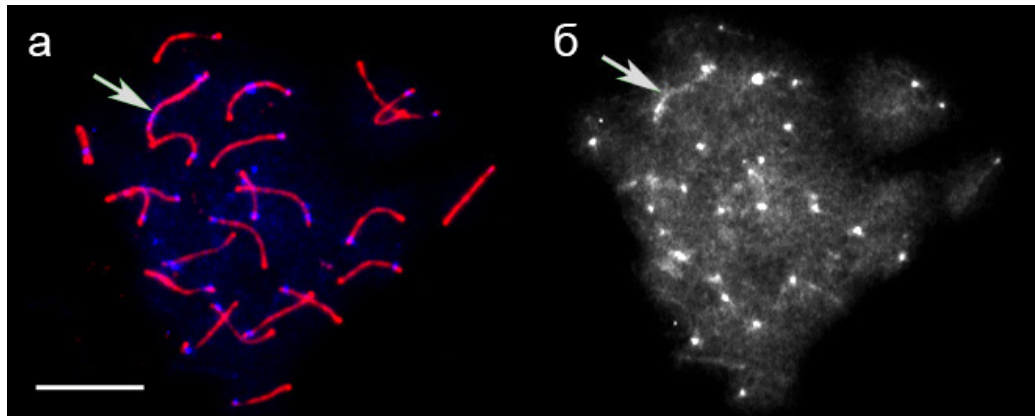


Рисунок 5. С-подобное окрашивание пахитенных хромосом *P. reticulata* по DAPI (Lisachov, 2013). Стрелкой выделен половой бивалент с гетерохроматиновым блоком. *а*: SYCP3 (красный), DAPI (синий). *б*: DAPI-канал того же изображения. Масштаб: 5 мкм.

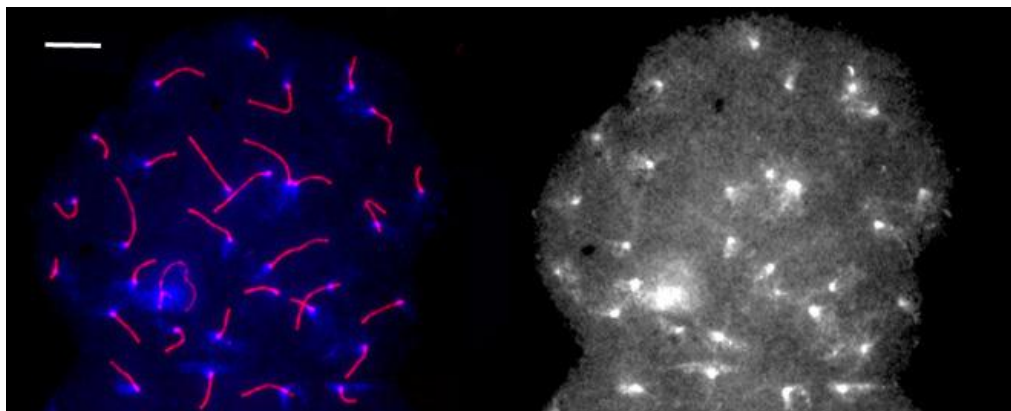


Рисунок 6. С-подобное окрашивание пахитенных хромосом полёвки по DAPI (Lisachov, 2013). Слева: SYCP3 (красный), DAPI (синий). Справа: DAPI-канал того же изображения. Масштаб: 5 мкм.

Второй подход заключался в проведении *in situ*-гибридизации с полногеномной пробой, полученной от самца гуппи (геномная *in situ*-гибридизация, GISH). При *in situ*-гибридизации с полногеномными пробами повторенные последовательности гибридизуются активнее, чем уникальные. Так как обе половые хромосомы гуппи содержат большой кластер повторов (на Y-хромосоме он крупнее), на пластинках СК дистальная часть полового бивалента демонстрировала яркий сигнал. На метафазных хромосомах ему соответствовали сигналы в дистальных частях X- и Y-хромосом (Рисунок 7).

GISH-проба, генерированная методом WGA (whole-genome amplification, амплификация полного генома), дает более четкое окрашивание, чем полученная методом DOP-ПЦР, и способна успешно выявить половой бивалент в подавляющем большинстве клеток, за исключением поврежденных и очень плохо распластанных. Низкий уровень компактизации ДНК в пахитене не позволил нам визуализировать прицентромерный гетерохроматин с помощью WGA-пробы на всех бивалентах во всех клетках. Однако дистальная локализация кластера повторов позволяет определить ориентацию полового бивалента и рассчитать распределение на нем кроссоверных обменов даже без прямой визуализации центромеры.

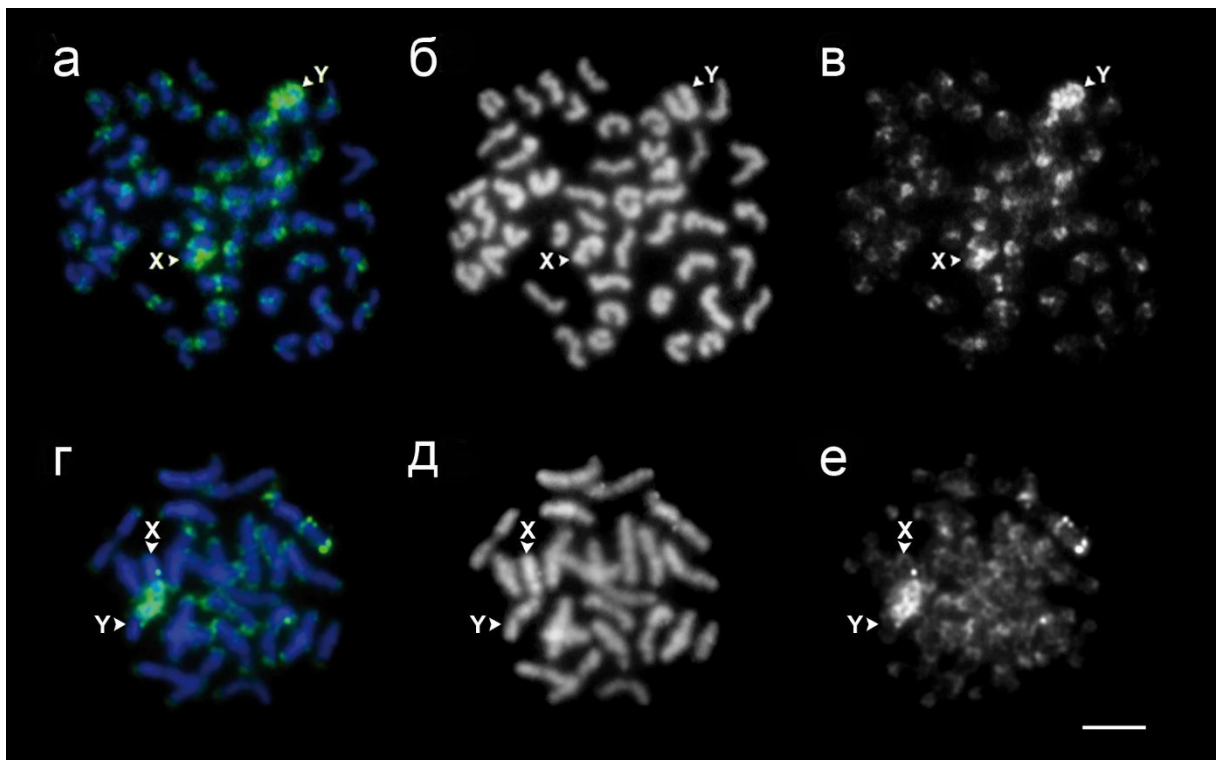


Рисунок 7. GISH на метафазных хромосомах *P. reticulata* (Lisachov et al., 2015). Синий: DAPI, зеленый: GISH-проба. а-в: митотические хромосомы. г-д: мейотические хромосомы. а, г: объединенное изображение. б, д: DAPI. в, е: GISH-проба. Масштаб: 5 мкм.

1.2 Синапсис и рекомбинация половых хромосом и аутосом

Спаривание половых хромосом было задержано, и обычно половой бивалент демонстрировал более раннюю стадию синапсиса, чем аутосомные (Рисунок 8). Спаривание половых хромосом всегда начиналось в дистальном сегменте,

отмеченном DAPI или полногеномной пробой. Затем следовало негомологичное спаривание дифференцированного сегмента, потом – спаривание гомологичного проксимального сегмента. Наблюдались Y-подобные структуры, состоящие из спаренного участка и двух неспаренных концов половых хромосом, один из которых, соответствующий Y-хромосоме, был длиннее другого. Более длинная Y-хромосома сжимается и укорачивается, уравниваясь в длине с X-хромосомой (Рисунок 9). Поэтому синаптированный половой бивалент выглядит толще аутосомных и имеет неравномерную толщину – меньшую в дистальном участке и большую в проксимальном. У гуппи Эндлера (*P. wingei*) Y-хромосома длиннее, чем у обыкновенной гуппи (Nanda et al., 2014). Поэтому у данного вида указанные аномалии спаривания были выражены сильнее (Рисунок 10a). Однако не во всех клетках было возможно точно идентифицировать половой бивалент только по морфологии. Вероятно, на наиболее поздних стадиях происходит его полная эквивализация.

Такая картина синапсиса соответствует опубликованной ранее (Traut, Winking, 2001). Аналогичные данные приведены для мейоза радужной форели, *Oncorhynchus mykiss* (Oliveira, Foresti et al. 1995).

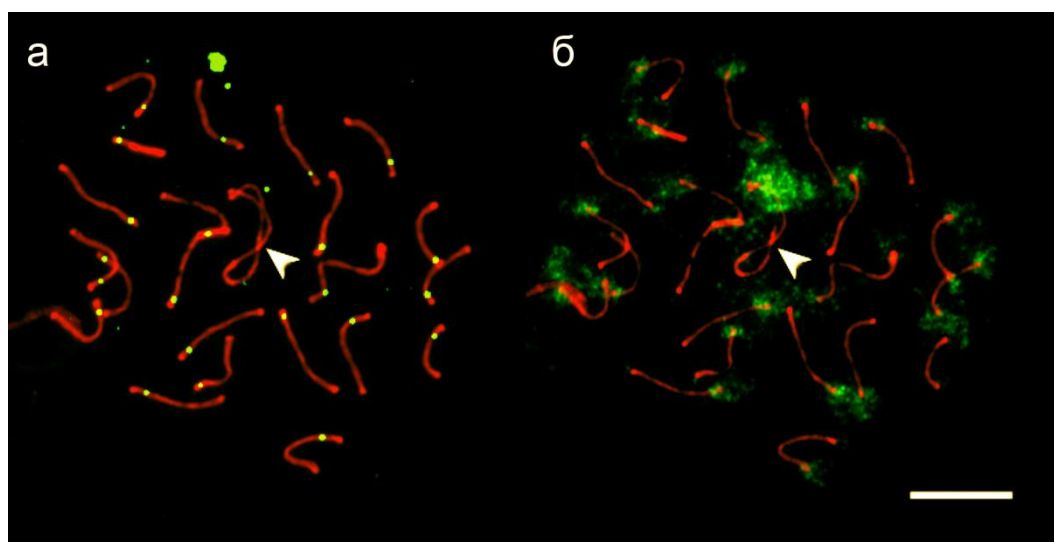


Рисунок 8. Пахитенный сперматоцит *P. reticulata* (Lisachov et al., 2015). *а*: иммуноокрашивание. Красный: SYCP3, зеленый: MLH1. *б*: GISH после иммуноокрашивания. Красный: SYCP3, зеленый: полногеномная флуоресцентная проба. Стрелки: половой бивалент. Масштаб: 5 мкм.

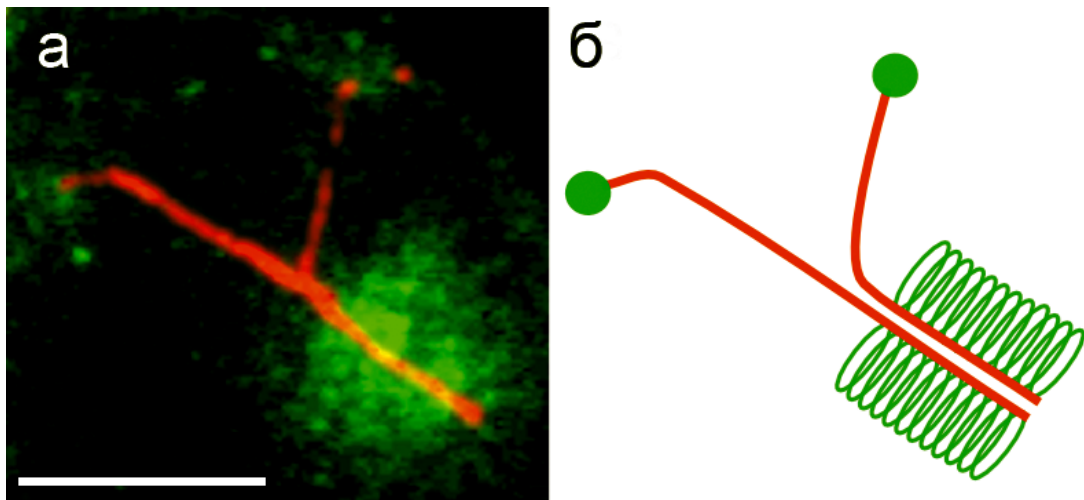


Рисунок 9. Спаривание половых хромосом у *P. reticulata* (Lisachov et al., 2015). *а*: GISH после иммуноокрашивания. Красный: SYCP3, зеленый: GISH-проба. *б*: схема. Красный: SYCP3, зеленый: половой и центромерный хроматин. Масштаб: 2 мкм.

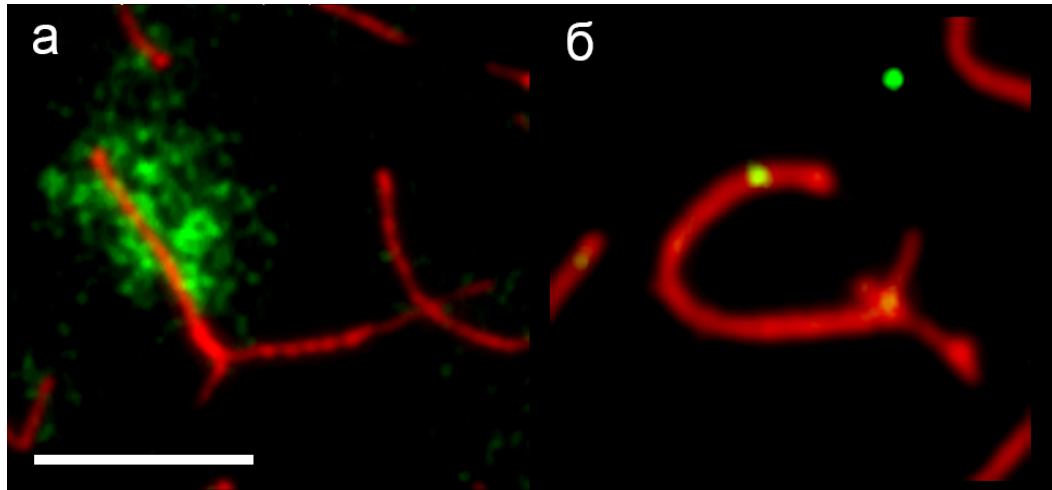


Рисунок 10. Спаривание и рекомбинация половых хромосом у *P. wingei*. *а*: GISH после иммуноокрашивания. Красный: SYCP3, зеленый: GISH-проба. *б*: локализация сигнала MLH1. Красный: SYCP3, зеленый: MLH1. Масштаб: 2 мкм.

Распределение сигналов MLH1 на аутосомах было проанализировано на 682 бивалентах, на которых были достоверно визуализованы центромерные кластеры повторов. На большинстве бивалентов присутствовал один сигнал MLH1, два сигнала отмечено лишь на 24 бивалентах (0,6% всех бивалентов). Анализ

кроссоверной интерференции при помощи программы CODA показал очень высокие значения ($v=19,99$).

Большинство сигналов MLH1 наблюдались в дистальной части хромосомы, с четко выраженным прителомерным пиком (коэффициент асимметрии $\gamma_1=-2,1\pm 0,1$; коэффициент эксцесса $\gamma_2=6,2\pm 0,2$) (Рисунок 11а).

Распределение сигналов MLH1 на половых хромосомах *P. reticulata* было исследовано на 92 клетках, в которых XY-бивалент был надежно идентифицирован одним из указанных выше способов. Сайты MLH1 присутствовали на 80 бивалентах (87%), причем на всех присутствовал лишь один сайт. Из них 76 (95%) были расположены в терминальной части бивалента, и 4 (5%) – в середине, проксимальнее гетерохроматинового сегмента. Прителомерный пик на половых хромосомах был сильнее сдвинут к концу хромосомы и имел более крутую форму (коэффициент асимметрии $\gamma_1=-3,0\pm 0,3$; коэффициент эксцесса $\gamma_2=9,6\pm 0,5$) (Рисунок 11б, Рисунок 12). Тест Колмогорова-Смирнова показал достоверную разницу в распределении сигналов MLH1 между аутосомами и половыми хромосомами ($p<0,001$). У *P. wingei* сигналы MLH1 также были сосредоточены в основном в дистальной части полового бивалента (Рисунок 10б).

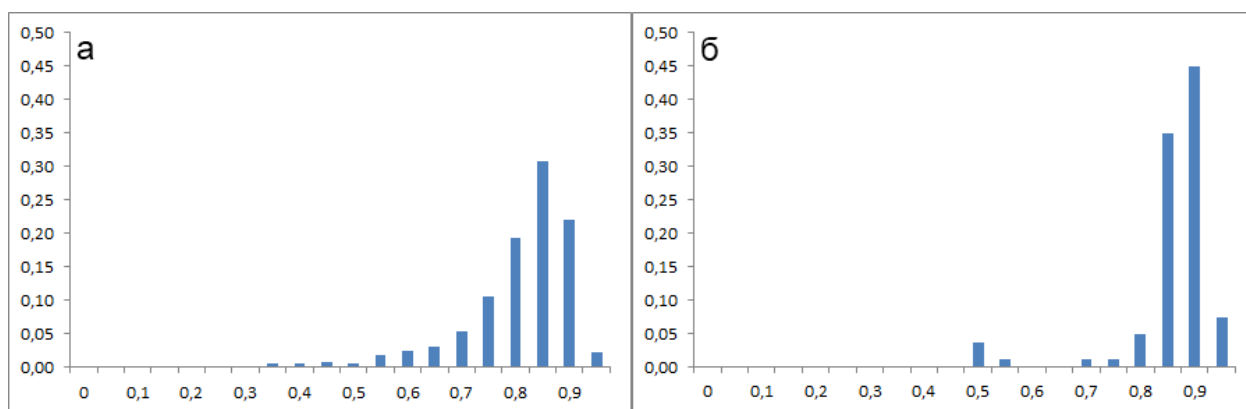


Рисунок 11. Распределение сигналов MLH1 на хромосомах *P. reticulata*. а: аутосомы ($n=682$), б: XY-бивалент ($n=80$). Ось X: относительное расстояние от центромеры. Ось Y: доля бивалентов, несущих сигнал MLH1 в данном сегменте.

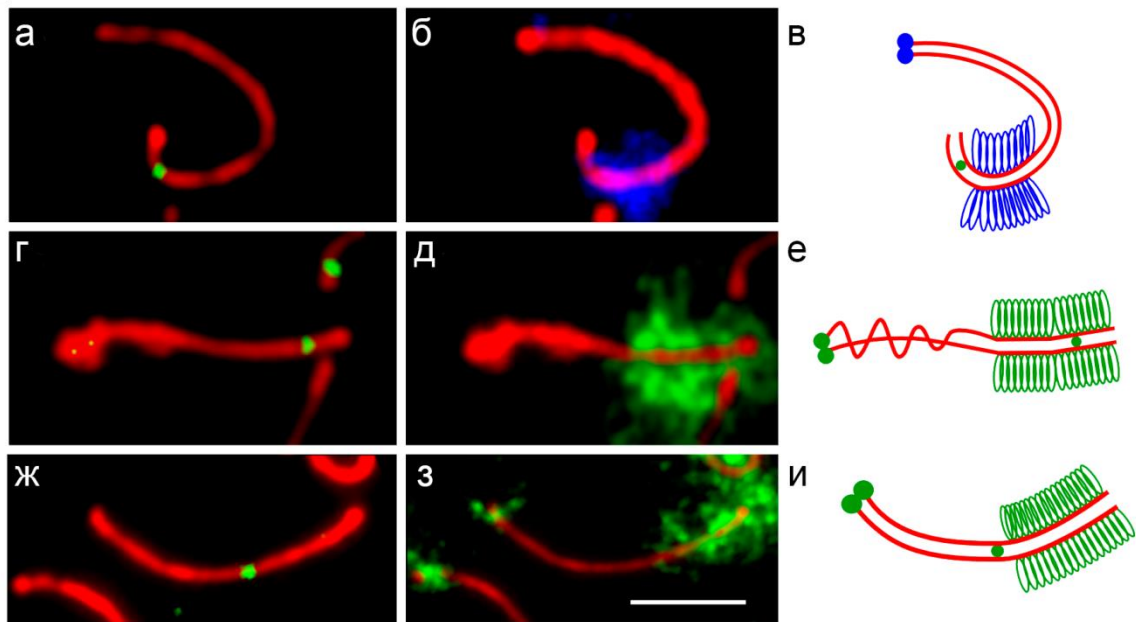


Рисунок 12. Локализация сигналов MLH1 на половых бивалентах *P. reticulata* (Lisachov et al., 2015). а, б, г, д, ж, з: микрофотографии. в, е, и: схемы. а, г, ж: после иммуноокрашивания SYCP3 (красный) и MLH1 (зеленые точки) и С-подобного окрашивания DAPI (синий) (б, в) либо GISH с пробой ДНК самца (зеленый) (д, е, з, и). Масштаб: 2 мкм.

Таким образом, мы установили, что X- и Y-хромосомы гуппи синаптируют позднее аутосом. Синапсис инициируется в дистальном сегменте и прогрессирует в направлении центромер. Большинство кроссоверов происходят в дистальном сегменте, а также в середине бивалента. Нерекombинирующий Y-специфичный сегмент находится между этими рекомбинирующими участками. На биваленте он выглядит непропорционально коротко из-за синаптической подгонки более длинной Y-хромосомы к более короткой X-хромосоме. Полученные данные опубликованы в журнале *Zebrafish* (Lisachov et al., 2015).

2. Промежуточные этапы дифференциации половых хромосом на примере анолисов (*Anolis carolinensis*, *Deiroptyx coelestinus*)

Анолисы – представители игуановых ящериц (Pleurodonta), которые дивергировали от ближайших родственников (агам и хамелеонов) 70-120 млн лет назад. У всех игуановых присутствует система XY-хромосом общего

происхождения. У видов, сохранивших предковый для игуанообразных кариотип, в том числе у зеленых анолисов (род *Anolis* в узком смысле) и кубинских анолисов (род *Deiropyx*), они представлены микрохромосомами. Так как микрохромосомы очень малы и сложны для морфологического анализа, половые хромосомы анолисов считаются гомоморфными. Тем не менее, известно несколько генов, утраченных Y-хромосомой.

2.1 Кариотипы. Идентификация и синапсис XY-бивалента

Нами были проанализированы 100 клеток *D. coelestinus*, 99 клеток *A. carolinensis* (30 от одного экземпляра и 66 от второго). Кариотипы анолисов соответствовали описанным для данных видов ранее (Рисунок 13, Рисунок 14) (Gorman, Atkins, 1968). На пахитенных пластинках мы наблюдали 6 макрохромосомных метацентрических бивалентов и 12 микрохромосомных бивалентов ($2n=36$). Полная длина СК составила в среднем $154,5 \pm 18,0$ мкм у *A. carolinensis* и $142,6 \pm 23,0$ мкм у *D. coelestinus*.

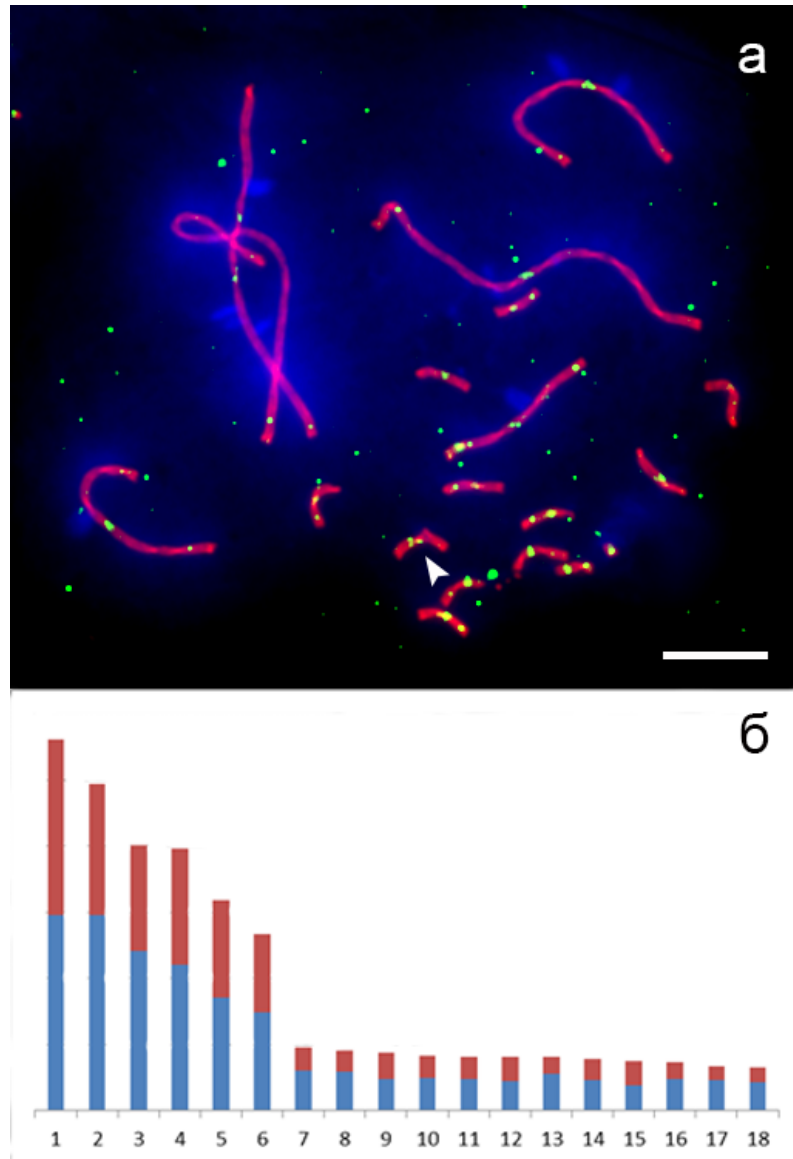


Рисунок 13. Синаптонемные комплексы каролинского анолиса (*Anolis carolinensis*). а: пластинка СК. Красный: SYCP3, зеленый: MLH1 и центромера, синий: DAPI. Стрелка: половой бивалент. Масштаб: 5 мкм. б: идиограмма. Красный: короткое плечо, синий: длинное плечо.

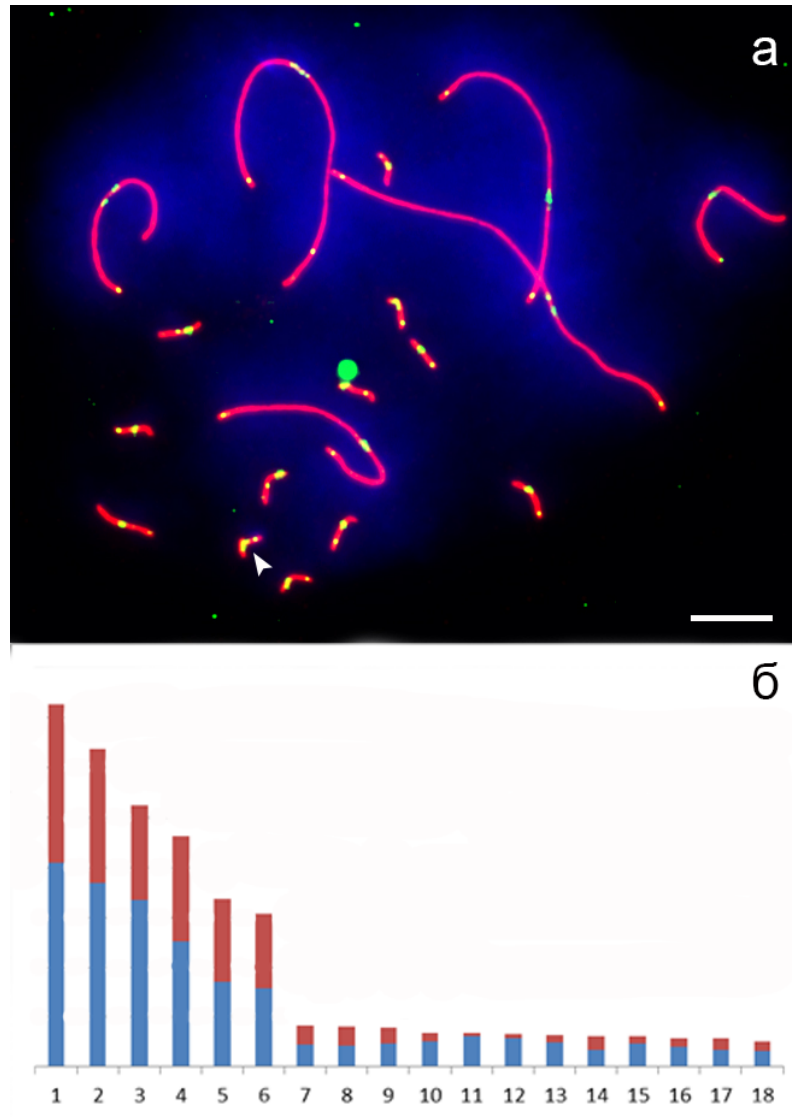


Рисунок 14. Синаптонемные комплексы белогубого анолиса (*Deiroptyx coelestinus*). а: пластинка СК. Красный: SYCP3, зеленый: MLH1 и центромера, синий: DAPI. Стрелка: половой бивалент. Масштаб: 5 мкм. б: идиограмма. Красный: короткое плечо, синий: длинное плечо.

На пластинках СК обоих видов анолисов были обнаружены микрохромосомные биваленты, состоящие из осевых элементов разного размера (Рисунок 15, Рисунок 16). На предположительно ранних стадиях более длинный элемент формировал боковую петлю, которая затем подвергалась синаптической подгонке. На предположительно поздних стадиях все биваленты были полностью спарены. Гетеробиваленты были единственными микрохромосомными бивалентами, несущими DAPI-позитивные участки (Рисунок 16а-б,г-д). У А.

carolinensis DAPI-позитивные плечи обоих гомологов были q-плечами, у белогубого DAPI-позитивное плечо длинного гомолога было р-плечом. DAPI-позитивные районы были лучше всего видны без обработки при условии хорошего распластывания хромосом, после С-подобного окрашивания и после FISH они становились бледнее или исчезали. Мы соотнесли эти биваленты с описанными ранее для анолисов половыми хромосомами XY-типа (Gamble et al., 2013). Для подтверждения идентификации мы провели FISH с двумя сортированными пробами, включающими X-хромосому. Обе пробы гибридизовались с гетеробивалентом на *A. carolinensis* (Рисунок 15). На *D. coelestinus* не удалось получить специфический сигнал. Пробы из ДНК *A. carolinensis* равномерно связываются со всеми хромосомами, демонстрируя более яркий сигнал в прителомерных участках макрохромосом. Однако сходство морфологии и DAPI-окрашивания говорит о том, что гетеробивалент *D. coelestinus*, возможно, также представляет собой половые хромосомы. Так как данные по СК самок отсутствуют, невозможно определить, какой из гомологов является X-хромосомой, а какой Y-хромосомой.

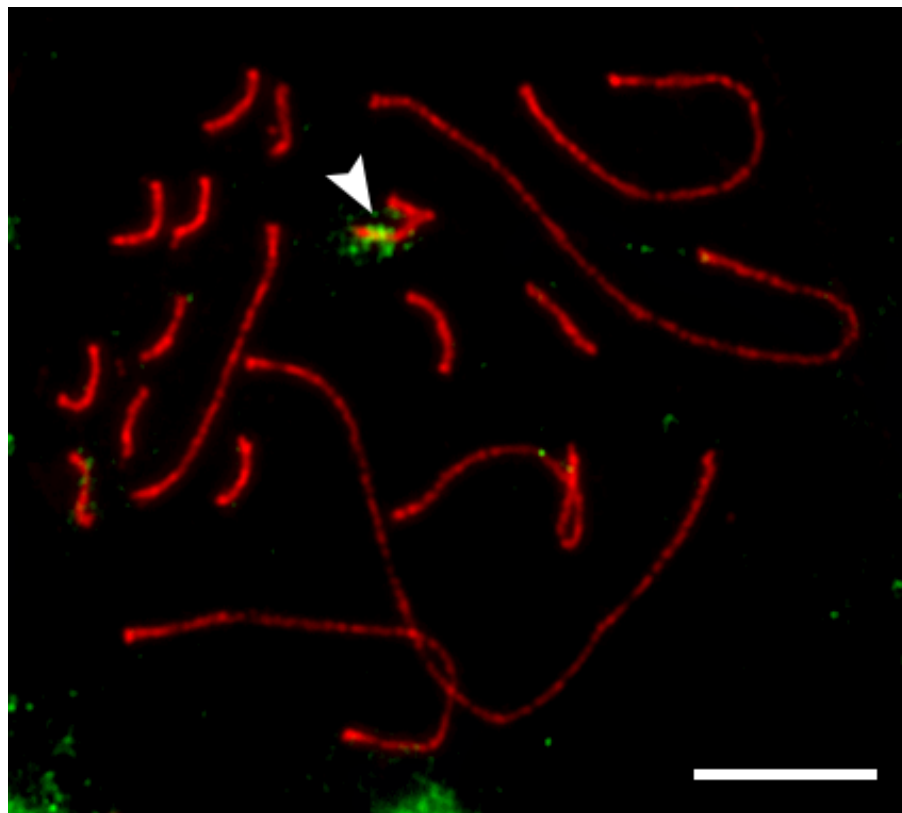


Рисунок 15. Половой бивалент *A. carolinensis* (Lisachov et al., 2017a). Красный: SYCP3, зеленый: проба “L”. Масштаб: 5 мкм.

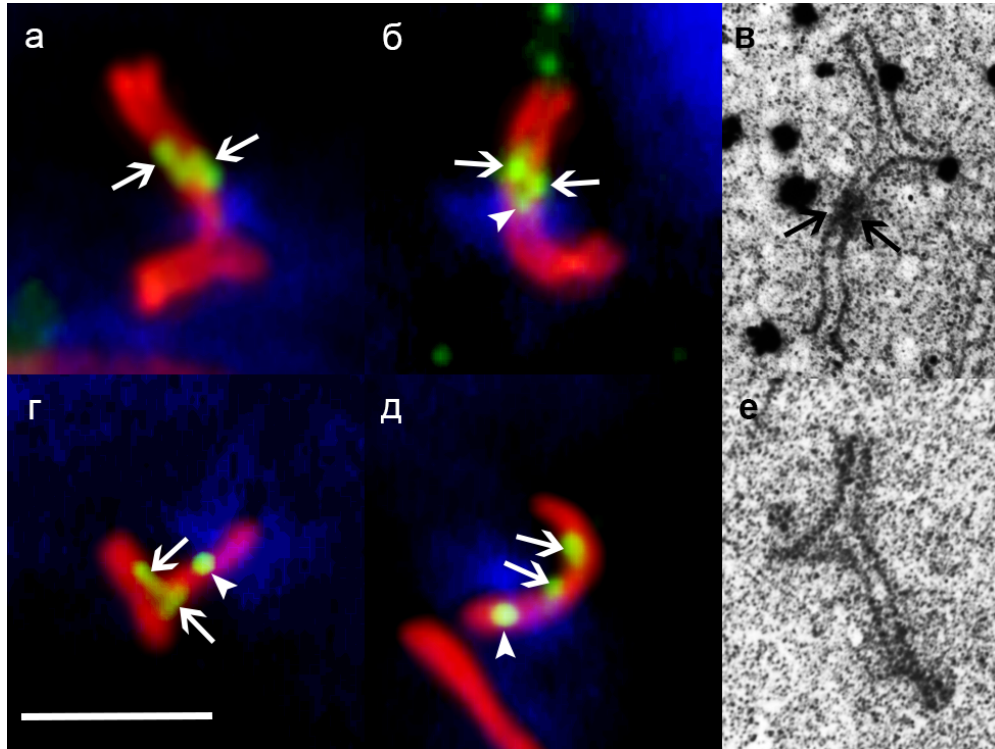


Рисунок 16. Половой бивалент *A. carolinensis* и *D. coelestinus* (Lisachov et al., 2017a). Красный: SYCP3, зеленый: центромера (большие стрелки) и MLH1 (малые стрелки), синий: DAPI. *а, г*: иммуноокрашивание, ранняя стадия синапсиса. *б, д*: иммуноокрашивание, поздняя стадия синапсиса. *в, е*: ранняя стадия синапсиса, электронная микроскопия. Масштаб: 3 мкм.

2.2 Рекомбинация половых хромосом и аутосом

Каждый из шести макрохромосомных бивалентов *A. carolinensis* был проанализирован отдельно. Хромосомы *D. coelestinus* были классифицированы сходным образом. Распределение чисел сигналов MLH1 на хромосомах *D. coelestinus* приведено в Таблице 1.

Таблица 1. Среднее число сайтов MLH1 и средняя длина ($\pm$ SD) СК анолисов

	<i>A. carolinensis</i>		<i>D. coelestinus</i>	
	Ср. число MLH1	Ср. длина (мкм)	Ср. число MLH1	Ср. длина (мкм)
СК1	1,90 $\pm$ 0,47	28,8 $\pm$ 5,1	1,98 $\pm$ 0,34	25,7 $\pm$ 5,2
СК2	1,88 $\pm$ 0,45	25,5 $\pm$ 4,3	1,90 $\pm$ 0,30	24,5 $\pm$ 4,7
СК3	1,92 $\pm$ 0,43	20,1 $\pm$ 3,0	1,69 $\pm$ 0,53	18,5 $\pm$ 3,6
СК4	1,89 $\pm$ 0,40	18,0 $\pm$ 2,7	1,68 $\pm$ 0,51	16,9 $\pm$ 2,9
СК5	1,80 $\pm$ 0,43	14,3 $\pm$ 2,0	1,34 $\pm$ 0,48	12,6 $\pm$ 2,1
СК6	1,45 $\pm$ 0,50	10,9 $\pm$ 1,3	1,11 $\pm$ 0,31	10,2 $\pm$ 1,8

Видно, что у обоих видов на средних и малых хромосомах чаще возникают одиночные сигналы MLH1, чем на больших, причем у *D. coelestinus* эта тенденция выражена сильнее. У обоих видов на микрохромосомах всегда было по одному сигналу MLH1.

Распределение сигналов MLH1 по длине хромосом было очень неравномерно. Для анализа их распределения мы взяли ту же классификацию хромосом, что и для анализа их числа. Отдельно отмечены одиночные, двойные и тройные сигналы. Более 90% сигналов MLH1 оказались сосредоточены в терминальных 10-20% длин хромосомных плеч. На всех макрохромосомах обоих видов картина практически идентична (Рисунок 17). Практически все сигналы MLH1, отмеченные на остальной длине хромосомы, являются интерстициальными, то есть оттеснены к центромере терминальным кроссовером на том же плече. Однако интерференция, измеренная при помощи программы CODA, оказалась небольшой. У *A. carolinensis* значение v составило 5,6 (95% доверительный интервал 5,0-6,7), а у *D. coelestinus* оно составило 5,0 (95% доверительный интервал 4,5-5,5).

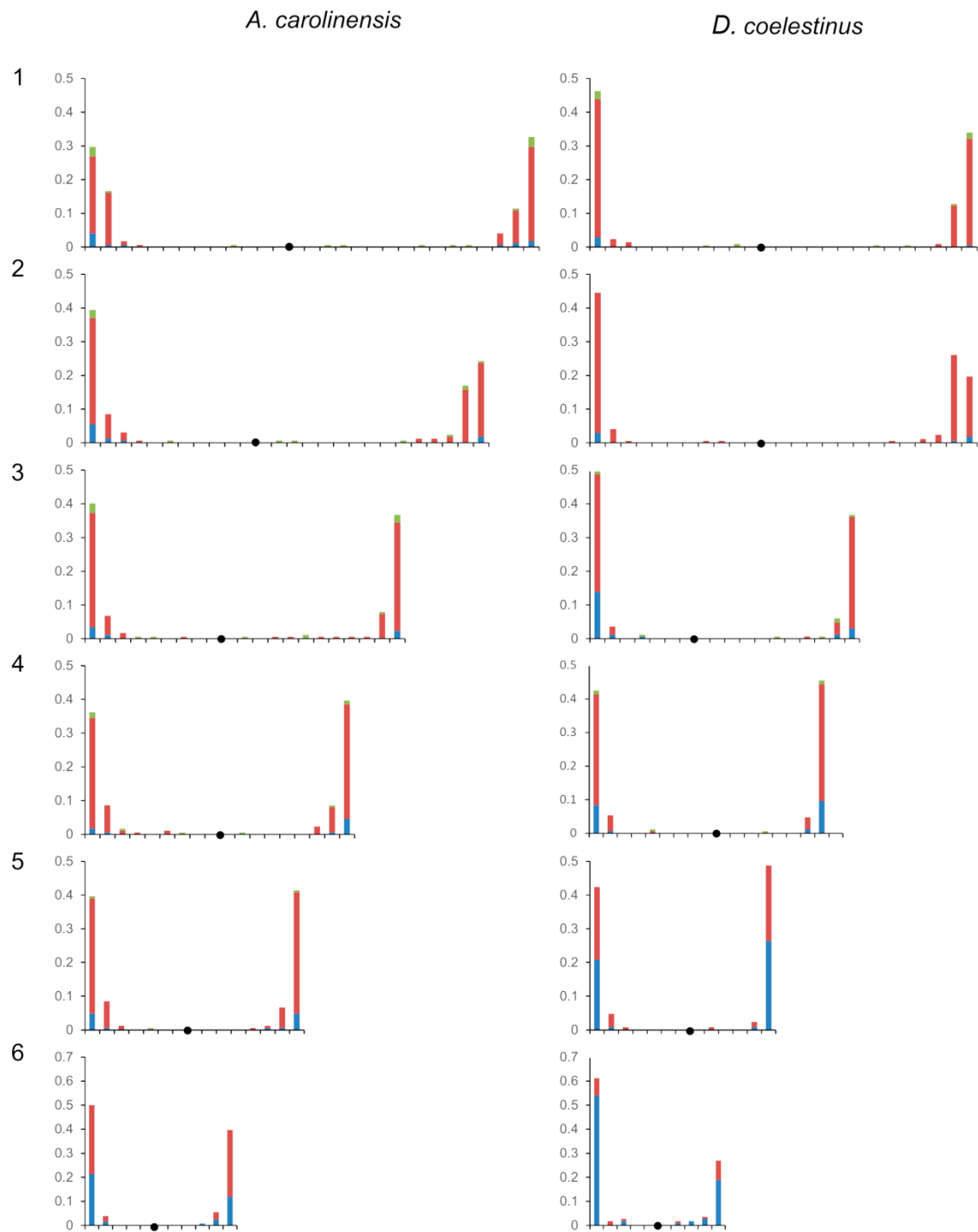


Рисунок 17. Распределение сигналов MLH1 на макрохромосомных СК анолисов. 1-6: номер СК. Зеленый цвет: 3 MLH1, красный цвет: 2 MLH1, синий цвет: 1 MLH1. Черная отметка: центромера. Ось X: расстояние от центромеры (1 интервал – 1 мкм средней длины СК). Ось Y: относительное число бивалентов, содержащих сигнал MLH1 в указанном интервале.

Это значит, что дистализация кроссоверов не связана у анолисов с их взаимодействием друг с другом, и объясняется скорее сильным центромерным эффектом.

На микрохромосомных бивалентах сигналы MLH1 были распределены более равномерно, вероятно по причине очень мелких размеров микрохромосом: даже находясь в абсолютном отношении очень близко к теломере, кроссовер может оказаться в середине плеча или в его проксимальной части. Данные по рекомбинации аутосом опубликованы в журнале *Comparative Cytogenetics* (Lisachov et al., 2017b)

Большинство сигналов MLH1 на половых хромосомах обоих видов анолисов находились на плече, отмеченном DAPI-позитивным фрагментом (Рисунок 16б,г,д). У обоих видов это плечо было q-плечом короткого гомолога, у *A. carolinensis* в редких случаях сигнал MLH1 располагался на р-плече. При этом у рассмотренных видов отличалось положение боковой петли относительно DAPI-позитивного плеча. У *D. coelestinus* петля располагалась на другом плече (р-плечо короткого гомолога). У *A. carolinensis* петля располагалась на том же плече, проксимальнее гомологичного сегмента. У *A. carolinensis* сайты MLH1 также присутствовали на р-плече и в терминальной части q-плеча за петлей. Данные по синапсису и рекомбинации половых хромосом опубликованы в журнале *Cytogenetic and Genome Research* (Lisachov et al., 2017a).

Таким образом, мы показали, что между X- и Y-микрохромосомами анолисов существуют морфологические отличия. Более длинная хромосома при синапсисе формирует боковую петлю. Кроссоверы находятся в любом месте вне петли, следовательно, она включает хромосом-специфичные последовательности, которых нет на другом гомологе. Разница в расположении петли у двух видов анолисов отражает изменения в структуре половых хромосом, произошедшие с момента дивергенции *A. carolinensis* и *D. coelestinus*. Также было показано, что точки рекомбинации на аутосомах распределены неравномерно.

3. Поздние этапы дифференциации половых хромосом на примере крачек (*Sterna hirundo*, *Chlidonias niger*)

ZW-хромосомы птиц, по сравнению с половыми хромосомами рыб и рептилий, достаточно хорошо исследованы. Считается, что они возникли 100-150 млн лет назад. Для новонёбных птиц (Neognathae) характерны почти полностью дивергировавшие половые хромосомы, сохраняющие лишь небольшой псевдоаутосомный район. Однако у многих видов птиц как структура половых хромосом, так и кариотип в целом еще не описаны. Среди таких видов – крачки (Sternidae), одно из самых широко распространенных семейств птиц.

3.1 Кариотипы

У *Ch. niger* аутосомные наборы были измерены в 119 клетках, половые хромосомы – в 117 клетках. На распластанных пластинках СК *Ch. niger* присутствовало 37 бивалентов ($2n=74$), 36 аутосомных и ZW-бивалент. Из аутосомных 14 бивалентов были макрохромосомными и 22 бивалента микрохромосомными (Рисунок 18). Среди микро-бивалентов присутствовали 19 акроцентриков и 3 метацентрика. Общая длина СК составила $288,3 \pm 47,5$ мкм. Размеры, морфология и обозначения макробивалентов *Ch. niger* приведены в Таблице 2 (а-в).

Z-хромосома до синаптической подгонки занимала промежуточное положение между CNI2 и CNI4, и имела ЦИ= $0,4-0,5$ ($0,45 \pm 0,04$). Так как клеток с полным асинапсисом полового бивалента не было обнаружено, установить точную длину несинаптированной Z-хромосомы не представилось возможным. В 7 клетках с наиболее ранними стадиями синапсиса ее длина составила $28,3 \pm 5,3$ мкм, максимум 32,4 мкм. W-хромосома на ранних стадиях синапсиса составляла примерно 50% от длины Z-хромосомы ($15,4 \pm 2,8$ мкм) и имела ЦИ= $0,3-0,4$ ($0,35 \pm 0,04$).

У *S. hirundo* было измерено 50 клеток от одной особи и 210 клеток от другой особи. На распластанных пластинках СК *S. hirundo* присутствовало 34 бивалента ($2n=68$), 33 аутосомных и ZW-бивалент. Из аутосомных 11 бивалентов были макрохромосомными и 22 бивалента микрохромосомными (Рисунок 19). Среди микро-бивалентов присутствовали 22 акроцентрика и 1 метацентрик. Общая длина

СК составила $237,9 \pm 38,9$ мкм. Размеры, морфология и обозначения макробивалентов *S. hirundo* приведены в Таблице 3 (а-в). Кариотип соответствовал описанному ранее (Hammar, 1970), за исключением того, что в первоначальном описании все микрохромосомы описаны как акроцентрики. Вероятно, противоречие связано с невозможностью точно определить морфологию микрохромосом в метафазе из-за их сильной конденсации.

Z-хромосома до синаптической подгонки была близка по длине к SHI2-SHI4 (абсолютная длина свободной Z-хромосомы $23,2 \pm 4,3$ мкм), и имела ЦИ=0,4-0,5 ($0,44 \pm 0,05$). W-хромосома составляла примерно 50% от длины свободной Z-хромосомы (абсолютная длина $10,3 \pm 2,6$ мкм) и имела ЦИ=0,3-0,4 ($0,36 \pm 0,04$).

3.2 Синапсис и рекомбинация Z- и W-хромосом

Идентификация полового бивалента у крачек была возможна по морфологии и не требовала дополнительных методик. Особенности спаривания Z- и W-хромосом крачек напоминают особенности, известные для других видов новонёбных птиц. Оно частично рассинхронизовано со спариванием аутосом: неспаренные или не полностью спаренные половые хромосомы часто наблюдались при полностью спаренных аутосомах. Инициация спаривания происходит в коротком плече W-хромосомы, затем продолжается до ее конца. Затем более длинная Z-хромосома начинает оборачиваться вокруг W-хромосомы, одновременно укорачиваясь (Рисунок 20).

У *Ch. niger* половые хромосомы были измерены в 117 клетках, из них ни в одной не наблюдался полный асинапсис. У одной из речных крачек среди 50 измеренных клеток была одна с асинапсисом половых хромосом, у второй среди 210 измеренных клеток обнаружено 22 с асинапсисом.

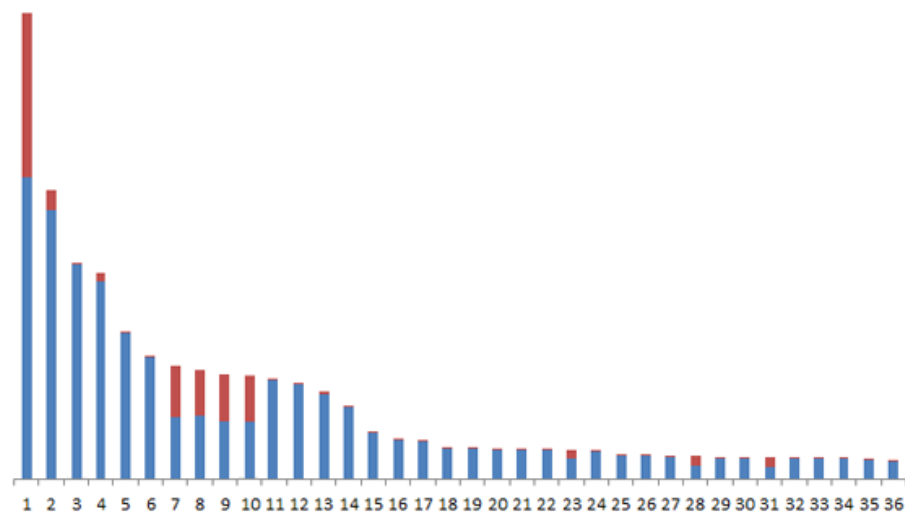
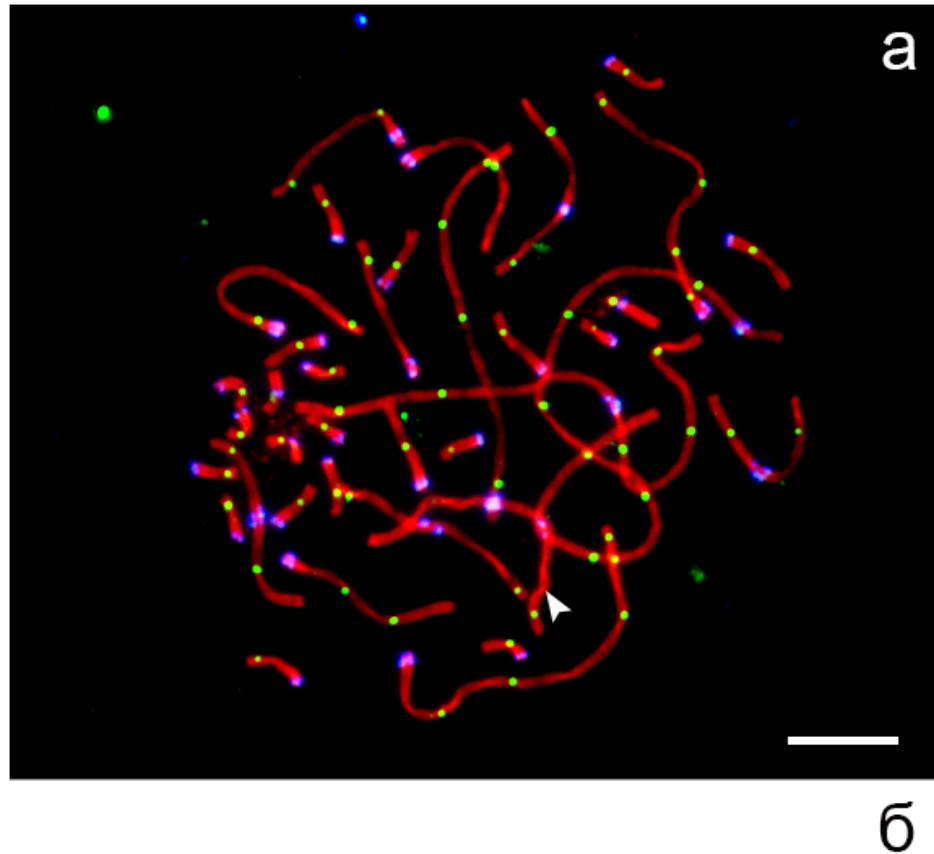


Рисунок 18. Хромосомы черной крачки (*Chlidonias niger*). а: пластинка СК. Красный: SYCP3, зеленый: MLH1, синий: центромера. Стрелка: половой бивалент. Масштаб: 5 мкм. б: идиограмма аутосомного набора. Красный: короткое плечо, синий: длинное плечо.

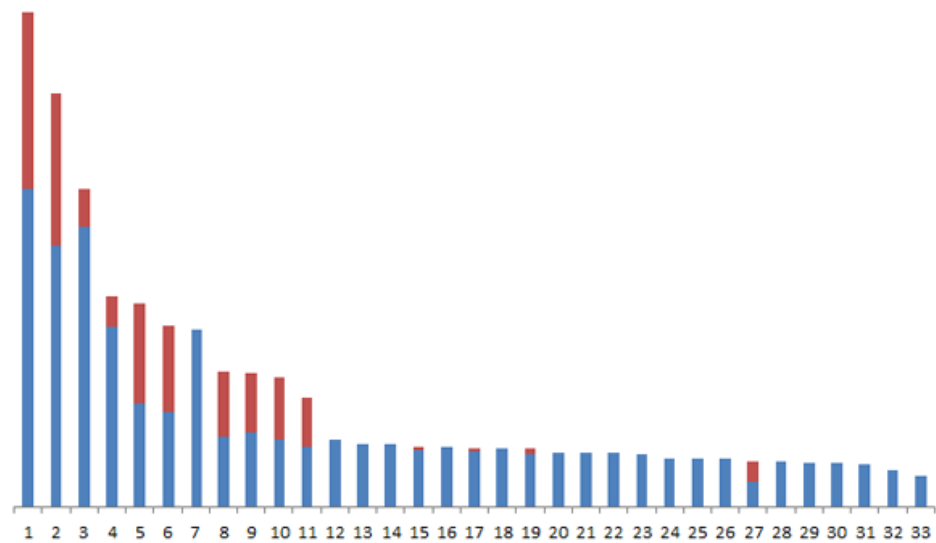
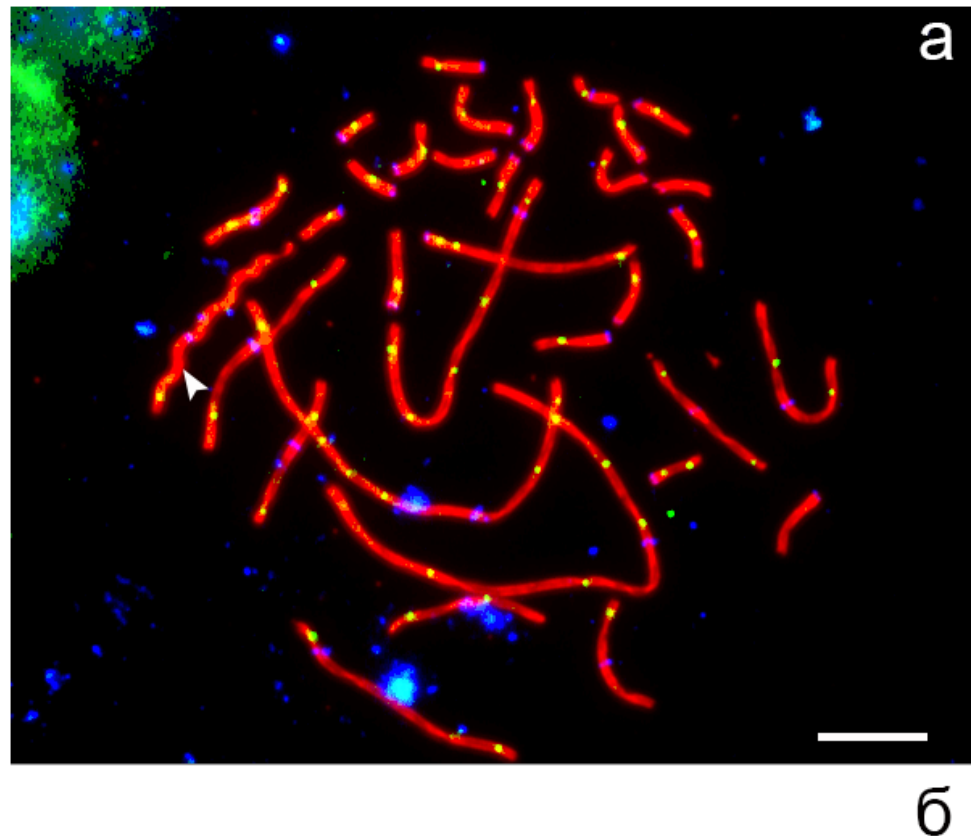


Рисунок 19. Хромосомы речной крачки (*Sterna hirundo*). *a*: пластинка СК. Красный: SYCP3, зеленый: MLH1, синий: центромера. Стрелка: половой бивалент. Масштаб: 5 мкм. *б*: идиограмма аутосомного набора. Красный: короткое плечо, синий: длинное плечо.

Псевдоаутосомный район был определен как район хромосомы, в котором присутствовали сигналы MLH1. Он был расположен в терминальной части короткого плеча W-хромосомы и терминальной части одного из плеч Z-

хромосомы. У *Ch. niger* его длина составляет примерно 30% от длины короткого плеча, наиболее проксимальная координата сигнала MLH1 составила 71,2%. Однако 85% сигналов MLH1 находились на терминальных 20% плеча. У *S. hirundo* его длина также составляет примерно 30% от длины короткого плеча, наиболее проксимальная координата сигнала MLH1 составила 69,5% (Рисунок 21). Большинство сигналов MLH1, однако, приходится на последние 20% длины короткого плеча. Максимально удаленные от теломеры в абсолютном отношении сайты MLH1 располагались у черной крачки на расстоянии 1,8 мкм от конца бивалента, а у речной крачки на расстоянии 1,2 мкм. Ближайшие к теломере сайты находились у черной крачки на расстоянии 0,3 мкм, у речной на расстоянии 0,2 мкм. Средняя удаленность сайтов MLH1 от теломеры составила $0,8 \pm 0,3$ мкм у черной крачки и $0,6 \pm 0,2$ мкм у речной крачки.

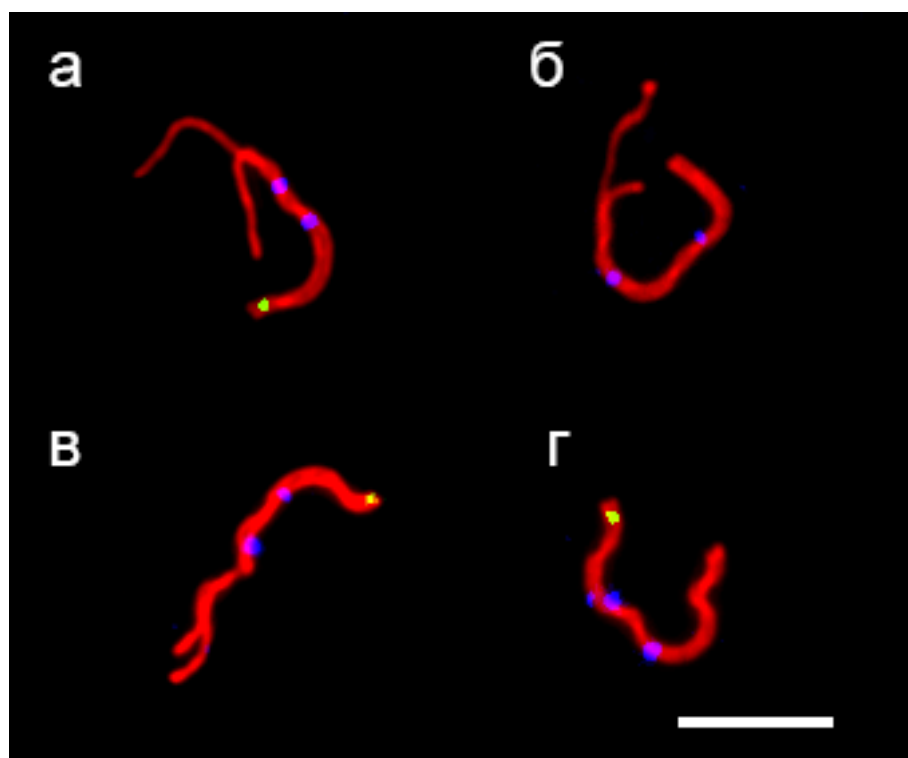


Рисунок 20. Спаривание полового бивалента у речной крачки (*Sterna hirundo*) (Лисачев и др., 2017). а-г: последовательные стадии синапсиса. Красный: SYCP3, зеленый: MLH1, синий: центромера. Масштаб: 5 мкм.

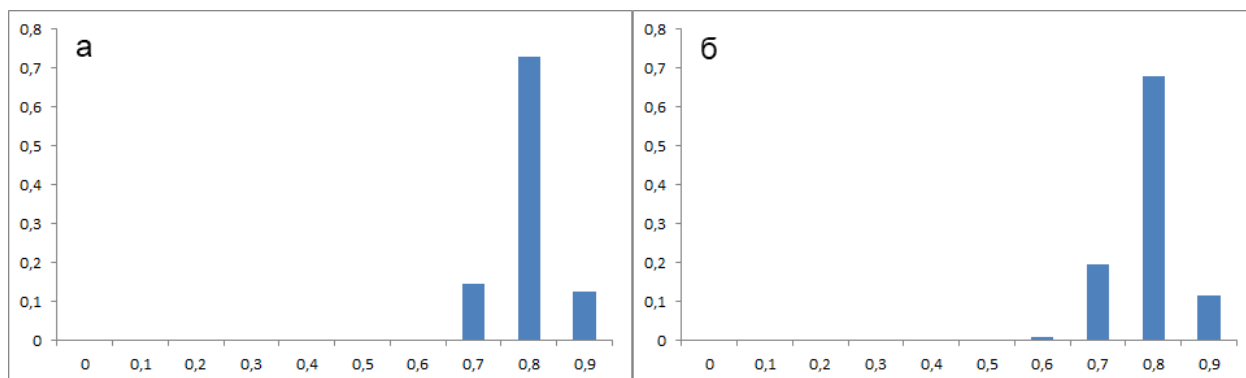


Рисунок 21. Относительное расположение сигналов MLH1 на коротком плече W-хромосомы крачек (Лисачев и др., 2017). *а*: черная крачка, *б*: речная крачка. Ось X: относительное расстояние от центромеры. Ось Y: относительное число сигналов MLH1.

3.3 Рекомбинация аутосом

Среднее число аутосомных сигналов MLH1 на клетку составило $53,0 \pm 4,2$ у *Ch. niger* и $44,1 \pm 5,0$ у *S. hirundo*. Для получения длины рекомбинационной карты мы умножили это число на 50 (один кроссовер – 50 сМ) и добавили 50 сМ для полового бивалента. Таким образом, длина рекомбинационной карты для *Ch. niger* составила 2700 сМ, а для *S. hirundo* – 2254 сМ. Для исследования числа и распределения сигналов MLH1 на аутосомах крачек была использована та же классификация хромосом, что и при описании кариотипов. Распределение чисел сигналов MLH1 на СК *Ch. niger* показано в Таблице 2 (г). Распределение числа сигналов MLH1 на разных СК *S. hirundo* показано в Таблице 3 (г). Видно, что среднее число сигналов MLH1 с уменьшением размера хромосом падает. Также была измерена величина кроссоверной интерференции в различных классах хромосом у обоих видов.

Таблица 2. Средняя длина и среднее число кроссоверов на СК *Ch. niger*

а. Обозначение	б. Морфология (ЦИ, $\pm$ SD)	в. Длина		г. Среднее число MLH1
		мкм, $\pm$ SD	%	
CNI1	0,34 $\pm$ 0,04	47,3 $\pm$ 9,7	16,2	5,1 $\pm$ 1,3
CNI2	0,08 $\pm$ 0,01	27,5 $\pm$ 5,3	9,5	3,2 $\pm$ 0,9
CNI3	0	22,5 $\pm$ 4,1	7,8	2,7 $\pm$ 0,8
CNI4	0,04 $\pm$ 0,01	19,4 $\pm$ 3,6	6,7	2,5 $\pm$ 0,7
CNI5-6	0	14,7 $\pm$ 2,8	5,1	2,1 $\pm$ 0,5
CNI7-10	0,45 $\pm$ 0,03	10,9 $\pm$ 1,9	3,8	1,8 $\pm$ 0,5
CNI11-14	0	8,9 $\pm$ 1,8	3,1	1,5 $\pm$ 0,4

Таблица 3. Средняя длина и среднее число кроссоверов на СК *S. hirundo*.

а. Обозначение	б. Морфология (ЦИ, $\pm$ SD)	в. Длина		г. Среднее число MLH1
		мкм, $\pm$ SD	%	
SHI1	0,35 $\pm$ 0,02	36,5 $\pm$ 7,6	15,2	4,2 $\pm$ 1,2
SHI2	0,36 $\pm$ 0,02	28,6 $\pm$ 6,0	12,0	3,6 $\pm$ 1,1
SHI3	0,09 $\pm$ 0,01	22,1 $\pm$ 4,6	9,2	2,8 $\pm$ 0,9
SHI4	0,15 $\pm$ 0,02	14,4 $\pm$ 3,0	6,1	1,8 $\pm$ 0,7
SHI5-6	0,48 $\pm$ 0,02	12,9 $\pm$ 2,7	5,4	2,0 $\pm$ 0,5
SHI7	0	12,0 $\pm$ 2,4	5,0	1,9 $\pm$ 0,6
SHI8-11	0,47 $\pm$ 0,02	8,2 $\pm$ 1,3	3,5	1,5 $\pm$ 0,5

Для визуализации распределения сигналов MLH1 вдоль хромосом все плечи были разделены на равные интервалы, в каждом интервале подсчитано относительное число сигналов MLH1. Один интервал соответствует одному микрометру средней длины. Распределение сигналов MLH1 у *Ch. niger* показано на Рисунок 22 (справа). Видны теломерные пики концентрации сигналов MLH1, особенно выраженные на небольших хромосомах, а также слабое влияние

центромерного эффекта: на акроцентриках и субacroцентриках, в отличие от хромосом гуппи, также есть теломерные пики. При этом в целом сигналы MLH1 на аутосомах у крачек распределены равномернее, чем у гуппи и тем более у анолисов. Распределение кроссоверов у *S. hirundo* показано на Рисунок 22 (слева).

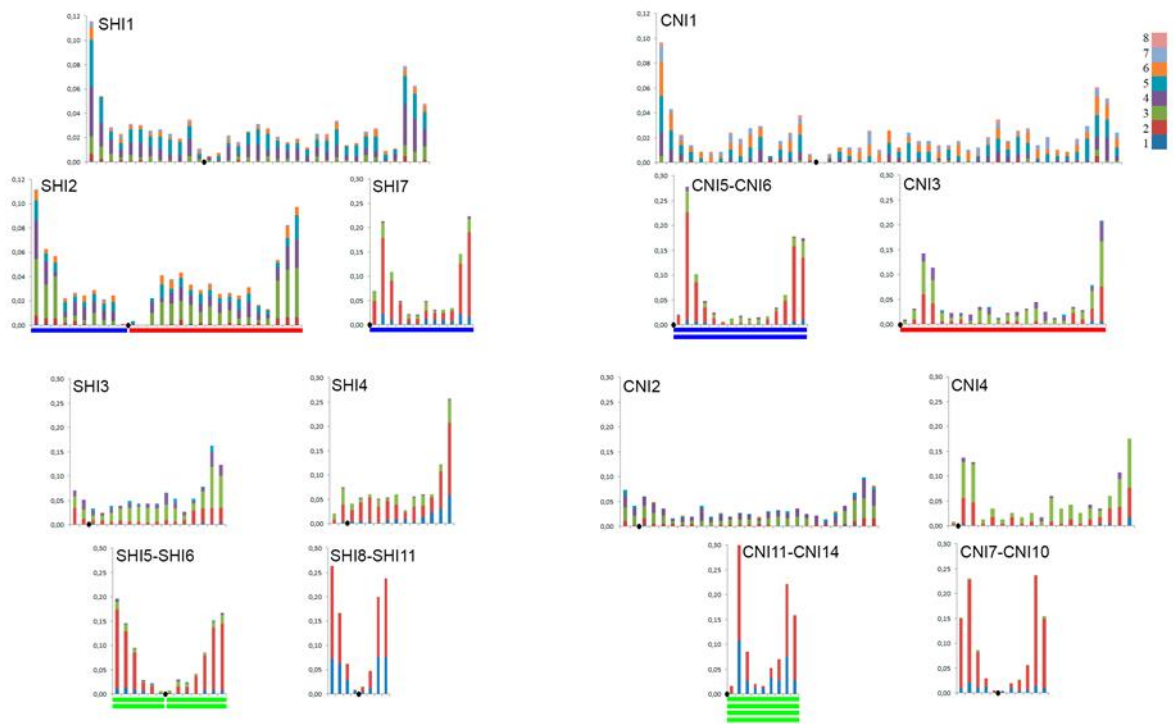


Рисунок 22. Распределение сигналов MLH1 на СК *Ch. niger* (справа) и *S. hirundo* (слева) (Лисачев и др., 2017). Цветовая шкала показана сверху справа. Черная отметка: центромера. Ось X: расстояние от центромеры (1 интервал – 1 мкм средней длины СК). Ось Y: относительное число бивалентов, содержащих сигнал MLH1 в указанном интервале. Синие, красные, зеленые линии: хромосомы, предположительно перестроенные у исследованных видов (см. стр. 85).

Таким образом, мы впервые описали кариотип черной крачки ($2n=74$) и уточнили информацию о кариотипе речной крачки ($2n=68$). Половые хромосомы крачек синаптируют позднее аутосом, в ходе синапсиса происходит подгонка более длинной Z-хромосомы к более короткой W-хромосоме. Крачки характеризуются высоким уровнем рекомбинации, до 8 кроссоверов на аутосомный бивалент, и более равномерным распределением кроссоверов, чем гуппи и анолисы. В этом они подобны большинству других птиц.

ОБСУЖДЕНИЕ

1. Начальные этапы дифференциации половых хромосом на примере гуппи (*Poecilia reticulata*, *Poecilia wingei*)

1.1 Особенности синапсиса X- и Y-хромосом

Характерные для гуппи черты процесса спаривания половых хромосом в мейозе, включающие задержанный негомологичный синапсис и эквивализацию неравных по длине хромосом, демонстрируют также многие другие животные с примитивными половыми хромосомами (Reed et al., 1990, Foresti et al., 1993). Эквивализацию длинного сегмента Y-хромосомы в пахитене ранее связывали с дистальным Y-специфичным сегментом, предполагая, что гомологичное объединение проксимальных районов ему предшествует (Traut, Winking, 2001). Эта гипотеза была предложена на основании представления об отсутствии гомологии в дистальной части половых хромосом гуппи. Нам удалось показать ошибочность такой точки зрения. Как следует из наших результатов, спаривание половых хромосом гуппи начинается с дистального участка, а эквивализации подвергается как раз проксимальный гомологичный район (Рисунок 9, Рисунок 10). Такая же последовательность спаривания, от дистальных районов к проксимальным, характерна и для аутосом гуппи. Сходные с нашими данные были получены для мейоза радужной форели, *Oncorhynchus mykiss* (Oliveira et al., 1995). У этого вида рыб также наблюдается задержка синапсиса XY-пары и эквивализация.

Аналогичным образом ведут себя в мейозе и древние половые хромосомы самок птиц (del Priore, Pigozzi, 2012). При этом имеющие сравнимый возраст половые хромосомы млекопитающих демонстрируют совершенно иной паттерн взаимодействия в мейотической клетке. У млекопитающих негомологичные сегменты остаются неспаренными, половой бивалент помещается на периферию клетки и сильно конденсируется (Turner, 2007). Неясно, связано ли это с большим уровнем дивергенции гоносом млекопитающих, природой гетерогаметной системы (XY против ZW) или же является просто специфической особенностью именно млекопитающих.

1.2 Рекомбинация X- и Y-хромосом

Традиционное представление о структуре половых хромосом группы, основанное на многократно цитируемых работах (Nanda et al., 1993, Traut, Winking, 2001), и повторенное в более новой работе (Nanda et al., 2014), изложено выше (Рисунок 23а). Согласно ему, Y-специфичный нерекombинирующий сегмент, содержащий ген-детерминатор пола, занимает наиболее дистальное положение на хромосоме. В пользу такой схемы говорили и результаты генетического картирования (Tripathi et al., 2009). Частота рекомбинации между половыми хромосомами группы, происходящей в проксимальном гомологичном сегменте, была оценена авторами как 2,6% (что дает частоту хиазм в 5,2%). Однако для нормального расхождения гомологичных хромосом в первой метафазе мейоза считается необходимым наличие хотя бы одного обмена на бивалент, то есть как минимум 50% рекомбинантных гамет. Если предположить, что принятые ранее взгляды верны, то у группы должен существовать неизвестный механизм, обеспечивающие нормальное ахиазматическое расхождение половых хромосом. Такого механизма, однако, нет даже у млекопитающих (за исключением единичных видов) и птиц, чьи половые хромосомы превосходят половые хромосомы группы возрастом и степенью дивергенции. На гоносомах млекопитающих и птиц присутствует псевдоаутосомный район или районы, в которых рекомбинация происходит с нормальной частотой.

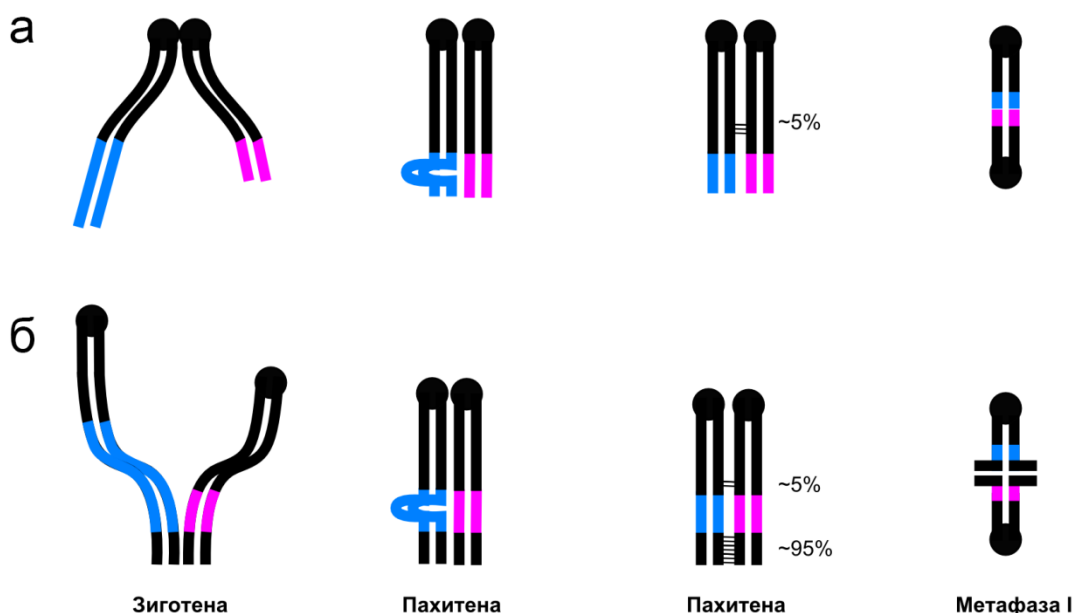


Рисунок 23. Две схемы строения половых хромосом гуппи. *а*: традиционная схема по Traut, Winking, 2001; Tripathi et al., 2009; *б*: схема, следующая из наших данных.

Нам удалось установить, что специфичный сегмент не является наиболее дистальным участком на Y-хромосоме гуппи. К схеме, изображенной в работе (Tripathi et al., 2009), мы можем добавить еще один, прителомерный гомологичный район свободной рекомбинации (Рисунок 23б). По-видимому, он не содержал ни одного генетического маркера и поэтому остался не замечен в исследовании данных авторов. Именно в дистальном гомологичном сегменте происходит большинство кроссоверных обменов. Значение 2,6%, таким образом, является сильно заниженным, и отражает достаточно редкие случаи рекомбинации, происходящие в проксимальном гомологичном сегменте. Подсчитанная нами частота наличия сайта рекомбинации в половых бивалентах, составившая 87%, близка к таковой для аутосомных бивалентов, и, таким образом, вероятнее всего связана с несинхронной рекомбинацией в разных бивалентах в процессе пахитены.

Пик рекомбинации в половом биваленте расположен более дистально, чем в аутосомных бивалентах. Очевидно, супрессия рекомбинации в Y-специфичном сегменте смещает рекомбинацию в дистальном направлении.

Именно в дистальном гомологичном сегменте инициируется спаривание гоносом. Следовательно, хотя негомологичное спаривание гетероморфного

сегмента предшествует гомологичному спариванию проксимального сегмента, инициация синапсиса все же происходит в гомологичном участке.

Указания на существование дистального района свободной рекомбинации содержатся в работе (Traut, Winking, 2001). При рассмотрении CGH-изображения Y-хромосомы виден маленький прителомерный участок, окрашенный обоими флуорохромами и имеющий желтый цвет. Кроме того, наблюдая хромосомы гуппи в первой метафазе мейоза, авторы заметили, что на большинстве пластинок X- и Y-хромосомы спарены дистальными участками, подобно аутосомам. Однако они интерпретировали это явление как «ахиазматическое спаривание».

Существование не рекомбинирующего у самцов, но рекомбинирующего у самок района, не ассоциированного с геном-детерминатором пола (MSNR1), можно объяснить тем, что у самок супрессирующее действие интерференции слабее и уровень рекомбинации в целом выше, чем у самцов. Так, у полосатого данио среднее число сайтов MLH1 на клетку у самок и самцов соотносится как 1.55/1 (Kochakpour, Moens, 2008). Также на ранних стадиях мейоза, когда формируются двцепочечные разрывы – предшественники рекомбинации, проксимальные сегменты хромосом из-за разницы их длин удалены друг от друга. Таким образом, вряд ли этот район следует особо выделять при рассмотрении структуры Y-хромосомы гуппи.

Данные секвенирования и картирования генома гуппи (Wright et al., 2017) подтверждают наши результаты. Согласно им, проксимально на X-хромосоме гуппи расположен первый псевдоаутосомный район (15 Мб), затем следует дифференцированный район (с 15-ой по 25-ую Мб, из которых с 22-ой по 25-ую Мб уровень дифференциации максимальный). Полная длина составляет 26,4 Мб (Künstner et al., 2016), то есть 1,4 Мб приходится на терминальный псевдоаутосомный район. В пределах дифференцированного района существует определенная дивергенция последовательностей между X-хромосомой и Y-хромосомой, однако в целом находящиеся в нем на X-хромосоме последовательности находят свои гомологи и на Y-хромосоме. Такой небольшой уровень дивергенции дополнительно свидетельствует об эволюционной молодости системы половых хромосом у гуппи. Отдельно из отсеквенированных геномов

самцов выделено 2,3 Мб последовательностей, которые не находят гомологии в геноме самок и которые не были картированы. Обилие повторов в гетерохроматизированном Y-специфичном участке затрудняет его секвенирование и исследование тех его фрагментов, которые не имеют гомологии с X-хромосомой.

1.3 Рекомбинация аутосом

Данные по числу и расположению точек кроссинговера на хромосомах группы позволяют предположить наличие у них сильной интерференции и центромерного эффекта. Об интерференции свидетельствует тот факт, что очень небольшая доля бивалентов, всего 0,6% от общего числа, содержала два сигнала MLH1, и ни один не содержал больше двух сигналов. Наличие такой сильной интерференции сильно понижает общую интенсивность рекомбинации.

Установить наличие центромерного эффекта позволяет расположение визуализированных сигналов MLH1. Большинство сигналов располагалось на значительном относительном расстоянии от центромеры, составившем 80-95% от общей длины бивалентов. Традиционно центромерный эффект объясняется ингибирующим влиянием центромерного гетерохроматина на рекомбинацию (Anderson et al., 1999, Froenicke et al., 2002). Однако у группы наблюдаются лишь небольшие блоки гетерохроматина в центромерах. Вероятно, дистальное расположение большинства сайтов рекомбинации связано скорее с более ранним вовлечением теломер в спаривание и выравнивание хромосом (Zickler, Kleckner, 2016).

Во многих клетках присутствовали биваленты, не имевшие ни одного сайта MLH1. Среднее число обменов на клетку составило 20,1, что предполагает общую длину генетической карты в 1005 сМ. По данным генетического картирования был получен близкий результат. Общая длина генетической карты составила 899 сМ, а генетическая длина одной хромосомы – в среднем 39 сМ (Tripathi et al., 2009a). Учитывая ограниченное число генетических маркеров, это явная недооценка, и наша более высокая оценка кроссинговера у группы точнее. Значение, меньшее, чем гаплоидное число хромосом, может быть связано с неодновременным протеканием процессов рекомбинации в разных бивалентах. Однако возможно и другое объяснение. Было показано, что в пахитенных клетках мужчин иногда

наблюдаются некрссоверные биваленты, частота которых коррелирует с частотой анеуплоидных гамет (Sun et al., 2006). Возможно, подобные нарушения мейоза имеют место и у гуппи.

Малая интенсивность рекомбинации у гуппи может иметь несколько объяснений. Было замечено, что у рыб и амфибий примитивные и древние группы характеризуются асимметричными (содержащими хромосомы с различной морфологией) бимодальными (содержащими макрохромосомы и микрохромосомы) и весьма разнообразными кариотипами, а при переходе к более молодым, продвинутым и специализированным группам кариотипы становятся симметричными (все хромосомы имеют схожую морфологию) унимодальными (все хромосомы имеют относительно близкие размеры, микрохромосом нет) и более консервативными в пределах таксонов (Ohno et al., 1969, Sessions, 2008). Кариотип гуппи по всем трем параметрам – типично продвинутый. Предполагается, что унификация элементов кариотипа и его стабилизация возникает у продвинутых групп для поддержания адаптивно важных синтенных комбинаций генов, снижения неконтролируемой изменчивости (Morescalchi, 1975). Уменьшение рекомбинации может служить тем же целям.

Существуют и другие гипотезы о связи между интенсивностью рекомбинации и различными чертами биологии видов. В исследовании (Burt, Bell, 1987) установлена корреляция между временем смены поколений и интенсивностью рекомбинации у млекопитающих. У видов с частой сменой поколений рекомбинация, как правило, менее интенсивна, чем у видов с длительным временем смены поколений, что позволяет им стабилизировать изменчивость и уравнивать среднее число рекомбинационных событий в абсолютную единицу времени на хромосому. Половозрелость у гуппи наступает в возрасте 3-6 месяцев, общая продолжительность жизни – до 1-2 лет. Таким образом, гуппи относится к видам с быстрой сменой поколений, и интенсивность рекомбинации у нее укладывается в схему, выявленную авторами для млекопитающих.

Интенсивность рекомбинации у полосатого данио несколько выше, чем у гуппи, однако тоже является достаточно низкой. На метацентрических хромосомах самцов данио, как правило, располагается один обмен, но в каждой клетке обычно

присутствует один или два бивалента с двумя обменами (Moens, 2006). Как и гуппи, данио имеет продвинутый кариотип и имеет небольшое время смены поколений. Для сравнения, у многих млекопитающих интерференция выражена гораздо слабее, и биваленты с двумя и более сигналами MLH1 присутствуют в большинстве клеток (Basheva et al., 2008).

Являясь эволюционно молодыми, половые хромосомы гуппи имеют небольшой уровень дивергенции. Даже в пределах нерекombинирующего сегмента большие районы хромосом остаются в высокой степени гомологичными, псевдоаутосомные районы имеют значительные размеры. Поэтому они имеют небольшую разницу в длине, облегчающую полный синапсис между X- и Y-хромосомами в мейозе. Таким образом, на данной стадии синаптические характеристики половых хромосом слабо отличаются от синаптических характеристик остальных хромосом. Распределение кроссоверов на половых хромосомах из-за небольшой длины дифференцированного района (особенно после его эквивализации) также подобно их распределению на аутосомах.

2. Промежуточные этапы дифференциации половых хромосом на примере анолисов (*Anolis carolinensis*, *Deiroptyx coelestinus*)

2.1 Идентификация и синапсис XY-бивалента

У *A. carolinensis* наиболее эффективным способом выявления полового бивалента является FISH с любой из двух сортировочных проб, содержащих X-хромосому. Без применения FISH-проб распознать его можно на ранней стадии по наличию боковой петли, на более поздних – по не выровненным центромерам, которые перемещаются при эквивализации. Однако не выровнены могут быть и центромеры аутосомных бивалентов, а у полового бивалента эквивализация может и не приводить к их перемещению. Хорошим маркером является DAPI-позитивный фрагмент, однако его видно лишь при очень хорошем распластывании хромосом, когда не только СК, но и ДНК-составляющие не накладываются друг на друга. Циклы денатурации-ренатурации при FISH и С-подобном окрашивании DAPI не приводят к лучшему контрастированию данного участка.

У *D. coelestinus* FISH-пробы из ДНК *A. carolinensis* не выявляют половой бивалент, но связываются с кластерами повторов на макрохромосомах. Данный результат говорит о существовании у каролинского и белогубого анолисов общих семейств повторов, сохранившихся за время их независимой эволюции. Таким образом, у *D. coelestinus* лучшими методами выявления полового бивалента остаются морфология и DAPI-окрашивание необработанных клеток.

Известно, что синапсис хромосом инициируется после и вследствие инициации рекомбинации (Viera et al., 2010). Следовательно, синапсис половых хромосом у обоих видов начинается, по всей видимости, в гомологичном районе, инициированный рекомбинацией. Разница в длине хромосом компенсируется вначале формированием боковой петли на более длинном гомологе в его гетероморфной части. Затем происходит синаптическая подгонка, при которой гомологично спаренные, но не вовлеченные в рекомбинацию фрагменты «разъезжаются» и спариваются негомологично (Bhalla, Dernburg, 2005; Turner et al., 2005). Синаптическая подгонка боковой петли, как правило, приводит к невыравниванию центромер гомологов (Рисунок 16д). Однако на ряде пластинок СК между половым бивалентом и аутосомными не выявлено морфологических отличий. Вероятно, выравнивание центромер происходит позднее в ходе более точной эквивализации. Известно также, что сайты кроссинговера, жестко соединяя гомологи, оказывают влияние на процесс синаптической подгонки гетероморфных бивалентов (Torgasheva et al., 2013). Таким образом, выравнивание или невыравнивание центромер на половом биваленте анолисов может также зависеть от локализации точки кроссинговера.

Похожая картина синапсиса наблюдалась при анализе СК заборных игуан рода *Sceloporus*, отдаленно родственных анолисам (Reed et al., 1990). Их микрохромосомный половой бивалент также демонстрировал боковую петлю на ранних стадиях, которая затем сглаживалась. Однако авторы установили, что у заборных игуан положение петли на хромосоме было изменчиво, тогда как у анолисов оно фиксировано. Возможно, это связано с более крупным размером половых хромосом у заборных игуан, и относительно более крупным гомологичным районом. Кариотипы представителей этого рода модифицированы

по сравнению с кариотипами анолисов: некоторые микрохромосомы у них исчезают ($2n=22-30$), сливаясь с другими хромосомами. Возможно, XY-хромосомы заборных игуан слились с одной или несколькими микро-аутосомами, что уменьшило степень различия между X и Y.

2.2 Рекомбинация половых хромосом и аутосом

Вопрос об особенностях рекомбинации у анолисов встал после секвенирования их генома, в ходе которого не было обнаружено изохорных различий в GC-составе хромосом (Fujita et al., 2011). GC-богатые изохоры, как правило, содержат много генов и мало повторов, являются эухроматиновыми (R-бэнды) и подвержены более интенсивной рекомбинации. GC-бедные изохоры являются гетерохроматиновыми (G-бэнды), бедны генами, слабее рекомбинируют (Eyre-Walker, Hurst, 2001). На настоящий момент неизвестно, как характерные признаки изохор связаны друг с другом причинно-следственными связями. По одной из наиболее распространенных гипотез, рекомбинация вызывает GC-предпочтительную конверсию генов (gBGC, GC-biased gene conversion), когда при разрешении двуцепочечного разрыва по некросоверному пути у гетерозиготы AT/GC AT-аллель будет с повышенной частотой превращаться в GC-аллель (Duret, Galtier, 2009; Duret, Arndt, 2008).

Поэтому было предположено, что отсутствие выраженных изохоров – следствие того, что у анолисов рекомбинация распространена по хромосомам равномерно. Затем при исследовании GC3-состава (GC-состава в третьих позициях кодонов) было показано, что он повторяет изохорную структуру геномов млекопитающих (Figuet et al., 2014). Авторы предполагают, что размытие изохоров связано с частыми вставками и делециями случайных нуклеотидов в некодирующих районах.

В нашей работе выявлена сильная дистализация обменов на макрохромосомах анолисов, что также не подтверждает гипотезу о равномерной рекомбинации как причине размытия изохор у анолисов. Теломерные пики в распределении кроссоверов обычны для многих животных и объясняются тем, что именно в теломерах происходит первоначальное сближение хромосом в лептотене (Zickler, Kleckner, 2016). Однако такая сильная дистализация, которую мы

наблюдаем у анолисов, является необычной. Интерференция не может быть причиной такого явления, так как она относительно слаба, а одиночные кроссоверы демонстрируют такую же сильную дистализацию, как и двойные. Возможный физиологический механизм заключается в том, что период инициации рекомбинации у анолисов начинается очень рано и длится очень коротко. Эволюционный смысл почти полного отсутствия рекомбинации в средней и прицентромерной частях плеч хромосом может заключаться в наличии там т. н. супергенов, то есть совокупностей совместно наследуемых аллелей (Murray, Clarke, 1973; Jones et al., 2012; Charlesworth, 2016). Это может быть связано с глубокой специализацией анолисов к древесному образу жизни и их обитанием в стабильных климатических условиях, что делает чрезмерную изменчивость невыгодной. Ограничение рекомбинации в прицентромерном участке также может быть преадаптацией при эволюции половых хромосом. Однако это верно только для макрохромосом. Микрохромосомы слишком малы, чтобы расположение кроссоверов на них могло дифференцироваться. Неполовые микрохромосомы демонстрируют почти равномерное распределение обменов по всей длине, обмены на них всегда только одиночные. Поэтому в записании рекомбинации на половых микрохромосомах, скорее всего, более активно участвуют инверсии, роль которых была показана в эволюции половых хромосом млекопитающих и птиц (Lahn, Page, 1999).

На основании расположения сайтов MLH1 мы предполагаем, что дифференцированный район находится в районе петли, а остальная часть хромосом гомологична. Так как при дифференциации Y-хромосома может и терять, и приобретать ДНК, мы не знаем, какой из гомологов является X-хромосомой, а какой – Y-хромосомой. Так как ранее было показано, что на Y-хромосоме утеряны некоторые гены, которые есть на X-хромосоме (Rovatsos et al., 2014), можно предположить, что длинный гомолог – это X-хромосома. Так как терминальная зона короткого плеча половых хромосом *D. coelestinus* (предположительно гомологичная терминальной зоне длинного плеча половых хромосом *A. carolinensis*) демонстрирует ровное спаривание, мы предполагаем, что гомология может существовать и там (Рисунок 24). В противном случае, вероятно,

наблюдалась бы не петля, а укорачивание свободного длинного конца, как у птиц и гуппи.

На основании карт гомологичных и дифференцированных районов на половых хромосомах анолисов можно реконструировать их происхождение. Мы предполагаем, что половые хромосомы “carolinensis-типа” являются более архаичными, а хромосомы “coelestinus-типа” могли возникнуть из них путем инверсии. Вначале инверсия переместила центромеру ближе к дифференцированному сегменту, но между ней и этим сегментом остался гомологичный участок. Затем рекомбинация в этом участке перенесла инверсию на гомологичную хромосому, и впоследствии он поглотился дифференцированным сегментом. Также проксимальный гомологичный участок длинного плеча мог поглотиться дифференцировкой и без инверсий. Так как у *D. coelestinus* петля непосредственно прилегает к центромере, обратный процесс маловероятен.

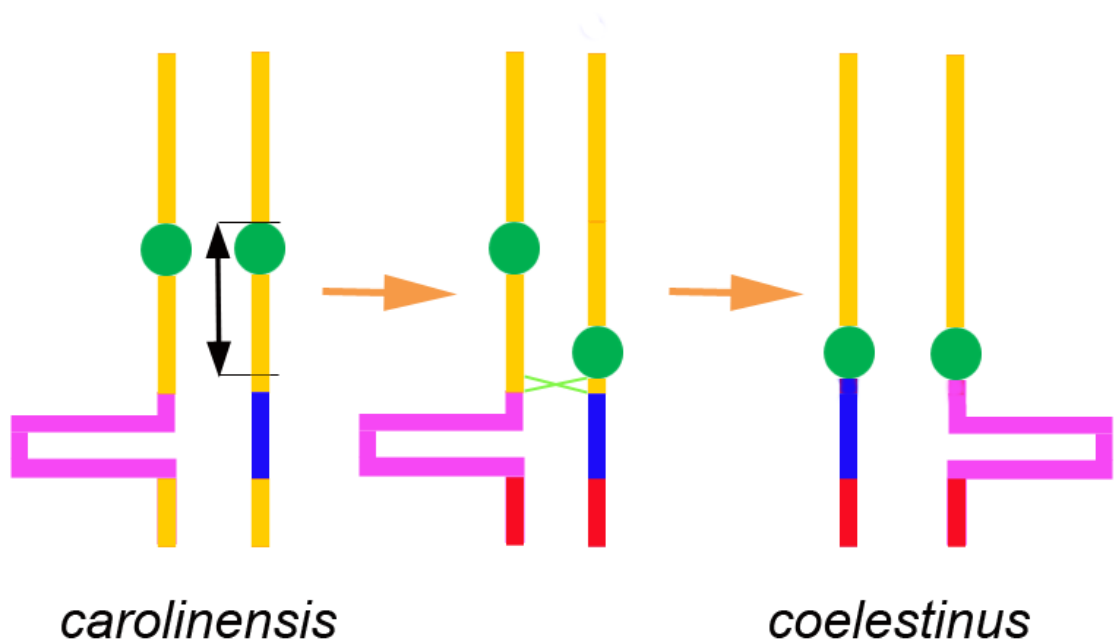


Рисунок 24. Схемы строения половых хромосом *A. carolinensis* и *D. coelestinus* и предположительная схема их эволюции путем инверсии. Розовый и голубой: дифференцированные сегменты. Желтый: район, в котором наблюдаются сигналы MLH1. Красный: предположительно гомологичные участки, где рекомбинация не наблюдалась непосредственно. Темно-зеленый: центромера.

Увеличение протяженности нерекombинирующего района и прогрессирующая деградация Y-хромосомы, сопровождающаяся потерей генов, характерны для эволюционно более дивергировавших хромосом, чем у гуппи. Половые хромосомы анолисов, тем не менее, сохраняют крупные псевдоаутосомные районы, занимающие 50-60% X-хромосомы. Увеличение разницы в длине между X- и Y-хромосомами при сохранении двух районов рекомбинации на концах, где инициируется синапсис, ведет к формированию боковой петли на более длинном гомологе. Аналогичная петля отмечалась на половых хромосомах других видов ящериц, различающихся по длине. Тем не менее, у анолисов сохраняется возможность за счет эквивализации петли и негомологичного спаривания добиться полного синапсиса XY-бивалента, что, однако, может вести к смещению центромер гомологов относительно друг друга. Таким образом, по сравнению с гуппи, половой бивалент анолисов четко отличается от аутосомных.

3. Поздние этапы дифференциации половых хромосом на примере крачек (*Sterna hirundo*, *Chlidonias niger*)

3.1 Кариотипы

Согласно последним исследованиям, предковым кариотипом для птиц является кариотип с $n=40$, около 30 из которых составляют микрохромосомы (Burt, 2002; Ellegren, 2009; Griffin et al., 2007; Romanov et al., 2014). Около 66% видов птиц сохраняют это хромосомное число или близкие к нему ($n=38-42$). Установленные нами числа хромосом $n=34$ и $n=37$ выходят за пределы этой вариации, однако в целом близки к предковым для птиц значениям. Кариотип *S. hirundo* соответствовал описанному в работе (Hammar, 1970). Для реконструкции хромосомных перестроек, обусловивших разницу между числами хромосом *S. hirundo* и *Ch. niger*, мы сопоставили морфологию и размеры элементов их кариотипов. Восемь макрохромосом *Ch. niger* находят соответствия в кариотипе *S. hirundo*. Это первая хромосома (CNI1 и SHI1), средние субacroцентрики (CNI2 и CNI4, SHI3 и SHI4), малый acроцентрик (CNI5 или CNI6 и SHI7) и малые метацентрики (CNI7-CNI10 и SHI8-SHI11). У CNI4 и SHI4 отличается

центромерный индекс (0,04 против 0,15) при сходном относительном размере, что, возможно, вызвано перицентрической инверсией. Шесть хромосом *Ch. niger* (acrocentрики CNI3, CNI5 или CNI6, CNI11-CNI14) и три хромосомы *S. hirundo* (субметацентрик SHI2, метацентрики SHI5 и SHI6) не находят соответствия в кариотипе другого вида. Мы предполагаем, что шесть акроцентрических хромосом *Ch. niger* гомологичны трем (суб)метацентрикам речной, что может быть проверено при помощи FISH с пробами хромосом курицы. Следовательно, макрохромосомные наборы двух видов крачек отличаются три полноплечевых слияния-разделения и одна перицентрическая инверсия или перемещение центромеры (Рисунок 25). Так как хромосомный набор *S. hirundo* похож на кариотип, описанный для отдаленно родственного вида, чайки *Larus fuscus*, можно предположить, что он является предковым, а кариотип *Ch. niger* – модифицированным (Hammar, 1970).

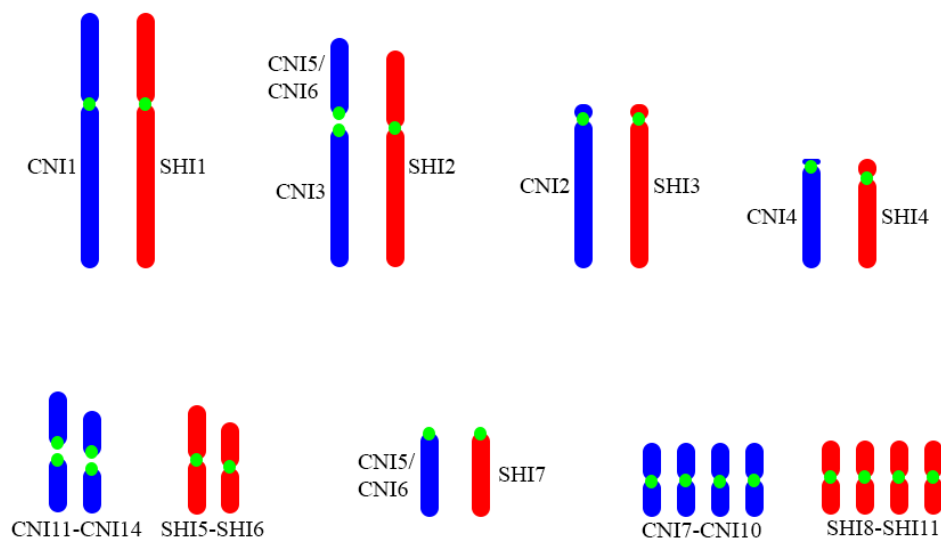


Рисунок 25. Предположительное гомеологическое соответствие между макрохромосомами крачек *Sterna hirundo* (SHI) и *Chlidonias niger* (CNI).

3.2 Синапсис и рекомбинация Z- и W-хромосом

У новонёбных птиц (Neognathae) наблюдается большое однообразие структуры половых хромосом по сравнению с бескилевыми (Paleognathae), хоть и

достигнутое в разных группах независимо. Половой бивалент четко отличается в их мейоцитах от аутосомных по набору признаков. Во-первых, он состоит из осевых элементов сильно отличающейся длины (впрочем, на поздних стадиях, при полной эквивализации, это слабо заметно). Во-вторых, центромеры аксиальных элементов не выравнены и находятся в разных частях бивалента. В-третьих, на половых хромосомах птиц присутствует лишь небольшой терминальный район гомологии, поэтому на ZW-биваленте есть только один сигнал MLH1, который находится у конца одного из плеч. У аутосом близкого к половому биваленту размера крайне редко встречаются единичные обмены. Всё это позволяет идентифицировать половой бивалент на любой пластинке СК новонёбной птицы, в отличие от гуппи и анолисов, у которых морфологическая идентификация может быть ненадежна. Данное наблюдение согласуется с более древним возрастом половых хромосом птиц и их более сильной дивергенцией. При этом дивергенция между половыми хромосомами птиц, по всей видимости, меньше, чем между половыми хромосомами млекопитающих, так как они все же спариваются в мейозе по всей длине, чего X- и Y-хромосомы млекопитающих сделать не способны, из-за большой разницы в длине, которую не может компенсировать эквивализация.

Мы не обнаружили никаких различий в морфологии, спаривании и рекомбинации половых хромосом у двух видов крачек. Это соответствует данным о большой консервативности как половых хромосом, так и в целом кариотипов у птиц (Ellegren, 2010). У млекопитающих при этом существует большое разнообразие X- и Y-хромосом, они могут быть разного размера и разной морфологии. Существуют млекопитающие с асинхроническими половыми хромосомами, утратившие половые хромосомы, виды с транслокациями на гоносомы аутосомного материала, в том числе с множественными половыми хромосомами (X1X2Y). У птиц известен лишь один пример транслокации аутосомного фрагмента на ZW-хромосомы (Pala et al., 2012). Среди возможных причин консервативности кариотипов птиц называют утрату повторенных последовательностей при уменьшении генома (как известно, хромосомные перестройки чаще происходят в локусах тандемных повторов), возможную нетолерантность систем мейотического чекпойнта к гетерозиготности по

перестройкам, важность многохромосомного кариотипа для более высокой частоты рекомбинации генов и несколько других гипотез (Griffin, Burt, 2014; Romanov et al., 2014). Нам представляется вероятной первая гипотеза. Жесткости пахитенного чекпойнта противоречит наличие «отклоняющихся» кариотипов у ряда птиц, в том числе разница по 5 или 6 перестройкам между изученными видами крачек. Кариотип с большим числом хромосом же можно сохранить и с высоким уровнем перестроек.

3.3 Рекомбинация аутосом

Высокая частота рекомбинации у птиц замечена во всех исследованиях, посвященных этому вопросу (Таблица 4). Это связывают с более высокой длиной СК у птиц по сравнению с другими животными. Ковариация уровня рекомбинации с общей длиной СК, а также отношением длины СК к размеру генома (степенью декомпактизации хромосом в пахитенных клетках) показана для человека, мыши и ряда других видов (Peterson et al., 1994; Lynn et al., 2002). Помимо этого, роль играют низкий уровень интерференции и слабый центромерный эффект: у птиц, в отличие от многих других исследованных позвоночных, слабо выражено подавление рекомбинации вблизи центромеры (Pigozzi, 2016). Это заметно при сравнении распределения кроссоверов на акроцентрических хромосомах гуппи и акроцентрических хромосомах крачек: у крачек есть два теломерных пика, с дистального и с проксимального концов, а у гуппи только один пик, с дистального конца.

Таблица 4. Число сайтов MLH1 у разных птиц

Вид	n	C (пг)	СК (мкм)	MLH1 на клетку	Длина генетической карты (сМ)	MLH1 на мкм	Источник
<i>Anser anser</i>	40	1,30	283±41	73,6±7,8	3682	0,24	Torgasheva, Borodin, 2017
<i>Anas platyrhinchos</i>	40	1,44	-	55,9±3,8	2845	-	Pigozzi, del Priore, 2016
<i>Columba livia</i>	40	1,54	228±22	62,7±4,9	3135	0,26	Pigozzi, Solari, 1999
<i>Gallus domesticus</i>	39	1,25	163	65,0±4,0	3251	0,40	Pigozzi, 2001
<i>Taenopygia guttata</i>	39	1,25	154±25	45,7±0,4	2285	0,30	Calderon, Pigozzi, 2006
<i>Coturnyx japonica</i>	39	1,35	239±34	55,3±2,1	2765	0,23	Calderon, Pigozzi, 2006
<i>Sterna hirundo</i>	34	1,40*	238±39	44,1±5,0	2254	0,19	наше исследование
<i>Chlidonias niger</i>	37	1,40*	288±47	53,0±4,2	2700	0,18	наше исследование

* - указан размер генома для крачки *Thalasseus sandvicensis*, так как размеры геномов исследованных видов неизвестны (Gregory, 2017).

Эволюционное значение высокой рекомбинации у птиц может быть связано с высокой внутривидовой конкуренцией, в том числе половым отбором, высокой подвижностью (а значит, жизнью в разнообразных условиях). Для более точного выяснения причин необходимо расширить выборку исследованных видов и провести сопоставление различий между ними по уровню рекомбинации с различиями по биологии и экологии.

При сравнении распределения кроссоверов на фрагментах, представляющих собой отдельные хромосомы у *Ch. niger*, но входящих в состав более крупных хромосом у *S. hirundo* (Рисунок 22) можно увидеть, что распределение обменов не зависит от конкретного элемента, а зависит от того, является ли он отдельной

хромосомой или же хромосомным плечом. Это можно объяснить тем, что кроссоверы формируются по мере сближения гомологичных участков в лептотене, которое начинается на теломерах (Zickler, Kleckner, 2015). Таким образом, когда акроцентрический элемент является отдельной хромосомой, первыми сближаются центромера и терминальный район, а середина – в последнюю очередь. Это соответствует двум теломерным пикам на акроцентрических хромосомах. Когда он является плечом (суб)метацентрической хромосомы, вначале сближаются терминальные районы, затем средние, и в последнюю очередь центромерные. Чем меньше хромосома, тем ярче выражены теломерные пики и «долина» между ними, так как на малой хромосоме два первых прителомерных обмена образуются, в абсолютном отношении, недалеко друг от друга, и в середине хромосомы суммируется их интерференционное воздействие.

Сравнивая рекомбинацию элементов, которые у обоих видов крачек являются отдельными хромосомами (Рисунок 22), можно увидеть, что здесь также различия обусловлены морфологией: заметно отличаются лишь распределения обменов на хромосоме 4 обоих видов, которая у *S. hirundo* имеет центромерный индекс 0,15, а у *Ch. niger* 0,04. У *Ch. niger* она ведет себя почти как акроцентрическая хромосома CNI3, а у *S. hirundo* теломерный пик у проксимального конца слабовыражен и распределением обменов эта хромосома подобна субacroцентрику SHI3.

На половых хромосомах птиц сохраняется только один псевдоаутосомный район, поэтому район инициации спаривания один и Z-хромосома не формирует боковую петлю. Потеря большинства генов W-хромосомой создает значительную разницу в длине между половыми хромосомами, которая с трудом компенсируется синаптической подгонкой. Синапсис половых хромосом птиц по этой причине всегда сопровождается невыравниванием центромер, и в основном негомологичен. Дивергенция между ними, однако, не настолько велика, чтобы вызвать непреодолимые нарушения синапсиса, наблюдаемые у млекопитающих. Псевдоаутосомный район у птиц значительно короче, чем у гуппи и анолисов,

поэтому параметры рекомбинации ZW-бивалента у них резко отличаются от аутосом.

4. Заключение.

Исследованные нами виды имеют половые хромосомы разного эволюционного возраста. Группы характеризуются относительно молодыми половыми хромосомами (около 10-15 млн лет), половые хромосомы птиц имеют возраст более 100 млн лет, а игуановые ящерицы имеют половые хромосомы промежуточного возраста, около 70-80 млн лет.

При сравнении мейотического поведения половых хромосом группы, анолисов и птиц видно, что дивергенция между гетероморфными хромосомами в этом ряду нарастает. Это отражается в морфологии бивалента: по мере увеличении эволюционного возраста и степени дивергенции увеличивается степень его отличия от аутосомных бивалентов. У всех трех таксонов в процессе синаптической подгонки половой бивалент становится больше похож на аутосомные.

У группы он демонстрирует задержанное спаривание и при незавершенной эквивализации выглядит утолщенным, но на поздних стадиях морфологически неотличим от аутосомных. У анолисов присутствует боковая петля, которая выравнивается лишь на наиболее поздних стадиях, что часто приводит к смещению центромер. Тем не менее, на многих пластинках смещение центромер не наблюдается и половой бивалент после подгонки не отличается от аутосомных. Причина формирования боковой петли состоит в том, что значительно различные по размеру гомологи начинают синаптировать с двух концов, и синапсис распространяется к середине. У группы подобная петля не формируется, так как синапсис и половых хромосом, и аутосом у них инициируется на одном конце, а не с обоих концов хромосомы. При этом у группы более длинной является Y-хромосома за счет накопления гетерохроматина, а у анолисов в результате деградации Y-хромосома становится короче, чем X. Склонность молодых Y- и W-хромосом на начальных этапах дифференциации не к сокращению, а к удлинению за счет накопления повторов была показана в ряде других таксонов (Schartl et al.,

2016). У птиц на ранних стадиях пахитены не спарены значительные участки более длинной Z-хромосомы, на любой стадии не выравнены центромеры и в большинстве клеток даже после синаптической подгонки видна Z-хромосома, оборачивающаяся вокруг W-хромосомы.

Наращение различий с возрастом половых хромосом проявляется и в рекомбинации. Основным направлением эволюции является увеличение относительно размера участков хромосом, запертых для рекомбинации, и, соответственно, сокращение размеров псевдоаутосомного района. Недавно было обнаружено, что даже у человека не существует четкой границы псевдоаутосомного района (Cotter et al., 2016). У гуппи, судя по распределению кроссоверов, эта нечеткость выражена еще сильнее: теломерный пик рекомбинации имеет более крутой склон, чем на аутосомах, однако в целом число кроссоверов при движении по хромосоме в проксимальном направлении падает постепенно. О том же свидетельствует слабая дивергенция между гомологичными X- и Y-последовательностями в пределах дифференцированного района половых хромосом гуппи (Wright et al., 2017). На половых хромосомах *A. carolinensis* в состав петли входит около трети длины длинного гомолога, у *D. coelestinus* около половины. В отличие от гуппи, у которых нерекombинирующие сегменты гетероморфных хромосом сохраняют большую степень гомологии, у анолисов на X-хромосоме картировано много генов, которых на Y-хромосоме нет (Rupp et al., 2016). Поэтому их псевдоаутосомный район имеет более четкую границу, проявляющуюся и в морфологии бивалента. Изначально в эволюционно молодых половых хромосомах есть два района гомологии, по обе стороны от дифференцированного участка. Кроссинговер может происходить только в одном из них или в обоих. На этой стадии его интенсивность в гомологичных районах гоносом соответствует интенсивности в аутосомах. Впоследствии при дальнейшем расширении дифференцированного района один из гомологичных сегментов может включаться в его состав и рекомбинация там прекращается. В частности, у крачек не рекомбинирует всё длинное плечо и 80% короткого плеча W-хромосомы. Сокращение допустимой зоны для рекомбинации при сохранении необходимости кроссинговера в половом биваленте для успешной сегрегации половых хромосом

постепенно усиливает удельную интенсивность рекомбинации в пределах псевдоаутосомного района и делает ее выше, чем в аутосомах.

У высших млекопитающих (сумчатых и плацентарных) поведение половых хромосом в мейозе резко отличается от поведения аутосом. Они, как правило, спариваются не полностью, а также подвергаются транскрипционной инактивации (Turner et al., 2005; Turner, 2007). У некоторых видов полёвок гомология и синапсис между половыми хромосомами полностью исчезают, хотя они продолжают формировать половой пузырь и находятся в сперматоците рядом друг с другом. Интересно, что асинапсис независимо возник в нескольких группах полевок, что говорит о существовании преадаптаций, облегчивших переход к такой модели поведения X- и Y-хромосом в мейозе (Borodin, et al., 2012; Borodin, Lisachov et al., 2013). У птиц половые хромосомы в пахитене также инактивируются, несмотря на полный синапсис и отсутствие «полового пузырька» (Schoenmakers et al., 2009). Неизвестно, есть ли инактивация у рептилий, рыб и других позвоночных с более молодыми половыми хромосомами. Исследования анеуплоидных мутантов млекопитающих (например, XYY) показывают, что данный эффект не зависит от природы хромосом: две Y-хромосомы формируют нормальный рекомбинирующий бивалент и инактивации не подвергаются (Turner, 2007). Следовательно, все особенности поведения XY-хромосом млекопитающих в мейозе являются проявлением неспецифического мейотического сайленсинга неспаренного хроматина, MSUC. Вопрос о причинах такого резкого отличия в мейотическом поведении гоносом млекопитающих от гоносом других позвоночных сводится, таким образом, к вопросу о причинах отсутствия у млекопитающих полного синапсиса между X- и Y-хромосомами.

Как показывают половые хромосомы птиц, для полного синапсиса не обязательно наличие протяженных районов гомологии. Следовательно, неспособность половых хромосом млекопитающих полностью синаптировать связана, вероятно, с большой разницей в длине.

ВЫВОДЫ

1. Впервые с использованием иммунофлуоресцентной локализации белков, вовлеченных в синапсис и рекомбинацию хромосом (SYCP3, MLH1) и белков центромеры, а также FISH с хромосом-специфичными и геномными пробами выявлены закономерности синапсиса и рекомбинации половых хромосом и аутосом у носителей половых хромосом разного эволюционного возраста (10-15 млн лет у гуппи, 70-80 млн лет у анолисов, и более 120 млн лет у крачек). Установлено, что по мере увеличения степени дивергенции половых хромосом затрудняется синаптическая подгонка и уменьшается ее итоговая точность; граница региона подавленной рекомбинации на биваленте становится выражена резче.

2. Впервые показано, что, в противовес ранее принятой модели, синапсис эволюционно молодых половых X- и Y-хромосом гуппи, как и их аутосом, начинается в дистальном районе, где локализуется подавляющее большинство кроссоверов. За терминальным псевдоаутосомным районом следует дифференцированный сегмент половых хромосом, где рекомбинация сильно подавлена, и проксимальный псевдоаутосомный район.

3. Впервые показано, что, в противовес ранее принятой точке зрения, X- и Y-микрохромосомы каролинского и белогубого анолисов различаются по размеру и морфологии. На них определена локализация дифференцированного района. Выявлена инверсия, отличающая друг от друга половые хромосомы изученных видов. Из-за разницы в размерах половых хромосом на ранних стадиях синапсиса на половом биваленте формируется боковая петля, которая в ходе синаптической подгонки исчезает. Показано, что на промежуточных этапах дифференциации половых хромосом рекомбинационная граница между дифференцированным и псевдоаутосомными районами становится четче, но районы свободной рекомбинации продолжают составлять значительную часть хромосомы.

4. Впервые выявлены кариотипические различия между речной и черной крачками, описаны особенности синапсиса и рекомбинации их Z- и W-хромосом, определены размеры и расположение псевдоаутосомного района. Половые хромосомы крачек синаптируют позднее аутосом, в ходе синапсиса происходит подгонка более длинной Z-хромосомы к более короткой W-хромосоме. Несовершенство подгонки проявляется в невыравнивании центромер. Псевдоаутосомный район занимает короткий дистальный сегмент на р-плече W-хромосомы. Показано, что при сокращении псевдоаутосомного района до минимальных размеров интенсивность рекомбинации на нем становится выше, чем на аутосомах, и граница цитологически идентифицируемого псевдоаутосомного района становится выражена резче.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Лисачев А. П., Бородин П. М. Портрет Y-хромосомы в юности // Природа. 2014. V. 11. I. 1191. P. 23-31.
- Лисачев А. П., Малиновская Л. П., Бородин П. М., Друзьяка А. В., Торгашева А. А. Синапсис и рекомбинация аутосом и половых хромосом у двух видов крачек (Sternidae, Charadriiformes, Aves) // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. V. 21. I. 2. P. 259-268.
- Alföldi J. et al. The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals // Nature. 2011. V. 477. I. 7366. P. 587-591.
- Anderson L.K. et al. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein // Genetics. 1999. V. 151. P. 1569-1579.
- Ayers K. L. et al. RNA sequencing reveals sexually dimorphic gene expression before gonadal differentiation in chicken and allows comprehensive annotation of the W-chromosome // Genome biology. 2013. V. 14. I. 3. P. 1-17.
- Badenhorst D. et al. A ZZ/ZW microchromosome system in the spiny softshell turtle, *Apalone spinifer*, reveals an intriguing sex chromosome conservation in Trionychidae // Chromosome Research. 2013. V. 21. I. 2. P. 137-147.
- Barros e Silva A. E., Guerra M. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures // Biotech Histochem. 2010. V. 85. P. 115-125.
- Basheva E.A., Bidau C.J., Borodin P.M. General pattern of meiotic recombination in male dogs estimated by MLH1 and RAD51 immunolocalization // Chromosome Research. 2008. V. 16. P. 709-719.
- Bella J. L., Gosálvez J. C-banding with specific fluorescent DNA-ligands: a new approach to constitutive heterochromatin heterogeneity // Biotech Histochem. 1991. V. 1. P. 44-52.
- Bellott D. W. et al. Convergent evolution of chicken Z and human X chromosomes by expansion and gene acquisition // Nature. 2010. V. 466. I. 7306. P. 612-616.

- Bertollo L.A., Mestriner C.A. The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. II. Meiotic analyses // *Chromosome Research*. 1998. V. 6. P. 141-147.
- Bhalla N., Dernburg A. F. A conserved checkpoint monitors meiotic chromosome synapsis in *Caenorhabditis elegans* // *Science*. 2005. V. 310. I. 5754. P. 1683-1686.
- Black D.A., Howell W.M. The North American mosquitofish, *Gambusia affinis*: an unique case in sex chromosome evolution // *Copeia*. 1979. V. 3. P. 509-513.
- Blaser O., Grossen C., Neuenschwander S., Perrin N. Sex-chromosome turnover induced by deleterious mutation load // *Evolution*. 2012.
- Booth W. et al. New insights on facultative parthenogenesis in pythons // *Biological Journal of the Linnean Society*. 2014. V. 112. I. 3. P. 461-468.
- Borodin P.M. et al. Multiple independent evolutionary losses of XY pairing at meiosis in the grey voles // *Chromosome Research*. 2012. V. 20. P. 259-268.
- Borodin P. M. et al. Parallel occurrence of asynaptic sex chromosomes in gray voles // *Paleontological Journal*. 2013. V. 47. I. 9. P. 1-6.
- 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 // *Molecular phylogenetics and evolution*. 2005. V. 35. I. 2. P. 459-469.
- Brunner B. et al. Genomic organization and expression of the doublesex-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for DMRT1 // *Genomics*. 2001. V. 77. P. 8-17.
- Bruslé S. Sex-inversion of the hermaphroditic, protogynous teleost *Coris julis* L. (Labridae) // *J. Fish Biol.* V. 30. P. 605-616.
- Burt A., Bell G. Mammalian chiasma frequencies as a test of two theories of recombination // *Nature*. 1987. V. 326. P. 803-805.
- Burt D. W. Origin and evolution of avian microchromosomes // *Cytogenetic and Genome Research*. 2002. V. 96. I. 1-4. P. 97-112.
- Calderon P. L., Pigozzi M. I. MLH1-focus mapping in birds shows equal recombination between sexes and diversity of crossover patterns // *Chromosome Research*. 2006. V. 14. I. 6. P. 605-612.

Campos-Ramos R. et al. An investigation of sex determination in the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*, using synaptonemal complex analysis, FISH, sex reversal and gynogenesis // *Aquaculture*. 2002. V. 221. P. 125-140.

Campos-Ramos R. et al. Identification of putative sex chromosomes in the blue tilapia, *Oreochromis aureus*, through synaptonemal complex and FISH analysis // *Genetica*. 2001. V. 111. P. 143-153.

Capilla L., Garcia Caldés M., Ruiz-Herrera A. Mammalian meiotic recombination: a toolbox for genome evolution // *Cytogenetic and Genome Research*. 2016. V. 150. I. 1.

Carrasco L., Penman D. J., Bromage N. Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes // *Aquaculture*. 1999. V. 173. P. 207-218.

Charlesworth D. The status of supergenes in the 21st century: recombination suppression in Batesian mimicry and sex chromosomes and other complex adaptations. Evolutionary applications. 2016. V. 9. I. 1. P. 74-90.

Charlesworth D., Charlesworth B., Marais G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes // *Heredity* (Edinb). 2005. V. 95. P. 118-128.

Cotter D. J. et al. Genetic diversity on the human X chromosome does not support a strict pseudoautosomal boundary // *Genetics*. 2016. V. 203. I. 2.

D'Cotta H. et al. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus* // *Molecular reproduction and development*. 2001. V. 59. I. 3. P. 265-276.

del Priore L., Pigozzi M.I. Chromosomal axis formation and meiotic progression in chicken oocytes: a quantitative analysis // *Cytogenet Genome Res*. 2012. V. 137. P. 15-21.

Devlin R., Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences // *Aquaculture*. V. 208. P. 191364.

Duret L., Arndt P. F. The impact of recombination on nucleotide substitutions in the human genome // *PLoS Genet*. 2008. V. 4. I. 5. e1000071.

Duret L., Galtier N. Biased gene conversion and the evolution of mammalian genomic landscapes // *Annual review of genomics and human genetics*. 2009. V. 10. P. 285-311.

Ellegren H. Genomic evidence for a large-Z effect // *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2009. V. 276. I. 1655. P. 361-366.

Ellegren H. Evolutionary stasis: the stable chromosomes of birds // *Trends in ecology & evolution*. 2010. V. 25. I. 5. P. 283-291.

Eyre-Walker A., Hurst L. D. The evolution of isochores // *Nature Reviews Genetics*. 2001. V. 2. I. 7. P. 549-555.

Ezaz T. et al. The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes // *Chromosome Research*. 2005. V. 13. I. 8. P. 763-776.

Ezaz T. et al. Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems // *Curr Biol*. 2006. V. 16. P. R736-743.

Ezaz T. et al. Molecular marker suggests rapid changes of sex-determining mechanisms in Australian dragon lizards // *Chromosome Research*. 2009. V. 17. I. 1. P. 91-98.

Fabig G., Müller-Reichert T., Paliulis L. V. Back to the roots: segregation of univalent sex chromosomes in meiosis // *Chromosoma*. 2015. P. 1-10.

Figuet E. et al. Biased gene conversion and GC-content evolution in the coding sequences of reptiles and vertebrates // *Genome biology and evolution*. 2015. V. 7. I. 1. P. 240-250.

Foresti F. et al. Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) // *Genome*. 1993. V. 36. P. 1124-1128.

Franch R. et al. A genetic linkage map of the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* L // *Genetics*. 2006. V. 174. P. 851-861.

Froenicke L. et al. Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting // *Am J Hum Genet*. 2002. V. 71. P. 1353-1368.

Fujita M. K., Edwards S. V., Ponting C. P. The *Anolis* lizard genome: an amniote genome without isochores // *Genome biology and evolution*. 2011. V. 3. P. 974-984.

Gabriel W. N. et al. Alligator aromatase cDNA sequence and its expression in embryos at male and female incubation temperatures // *Journal of Experimental Zoology*. 2001. V. 290. I. 5. P. 439-448.

Gamble T. A review of sex determining mechanisms in geckos (Gekkota: Squamata) // *Sexual Development*. 2010. V. 4. I. 1-2. P. 88-103.

Gamble T. et al. Anolis sex chromosomes are derived from a single ancestral pair // *Evolution*. 2014. V. 68. I. 4. P. 1027-1041.

Gauthier F., Martin O. C., Falque M. CODA (crossover distribution analyzer): quantitative characterization of crossover position patterns along chromosomes // *BMC bioinformatics*. 2011. V. 12. I. 1. P. 1.

Gorman G. C., Atkins L. Chromosomal heteromorphism in some male lizards of the genus *Anolis* // *American Naturalist*. 1966. P. 579-583.

Gorman G. C., Atkins L. New karyotypic data for 16 species of *Anolis* (Sauria: Iguanidae) from Cuba, Jamaica, and the Cayman Islands // *Herpetologica*. 1968. V. 24. I. 1. P. 13-21.

Graves J. A. M. Sex and death in birds: a model of dosage compensation that predicts lethality of sex chromosome aneuploids // *Cytogenetic and genome research*. 2003. V. 101. I. 3-4. P. 278-282.

Graves J. A. M. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals // *Cell*. 2006. V. 124. P. 901-914.

Graves J. A. M. How to evolve new vertebrate sex determining genes // *Developmental Dynamics*. 2013. V. 242. I. 4. P. 354-359.

Graves J. A. M. Avian sex, sex chromosomes, and dosage compensation in the age of genomics // *Chromosome Research*. 2014. V. 22. I. 1. P. 45-57.

Gregory T. R. Animal Genome Size Database [электронный ресурс]. 2017. URL: <http://www.genomesize.com> (дата обращения: 27.03.2017).

Griffin D.K. Is the Y chromosome disappearing?--both sides of the argument // *Chromosome Research*. 2012. V. 20. P. 35-45.

Griffin D.K., Burt D. W. All chromosomes great and small: 10 years on // *Chromosome Research*. 2014. V. 22. I. 1. P. 1-6.

Griffin D. K. et al. The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetics // *Cytogenetic and genome research*. 2007. V. 117. I 1-4. P. 64-77.

Guioli S., Lovell-Badge R., Turner J. M. A. Error-prone ZW pairing and no evidence for meiotic sex chromosome inactivation in the chicken germ line // *PLoS Genet*. 2012. V. 8. I. 3. P. e1002560.

Guo Y. et al. Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish *Dmrt1* // *Biochem Biophys Res Commun*. 2005. V. 330. P. 950-957.

Haaf T., Schmid M. An early stage of ZW/ZZ sex chromosome differentiation in *Poecilia sphenops* var. *melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes) // *Chromosoma*. 1984. V. 89. P. 87-91.

Hammar B. O. The karyotypes of thirty-one birds // *Hereditas*. 1970. V. 65. I. 1. P. 29-58.

Handley L.J., Ceplitis H., Ellegren H. Evolutionary strata on the chicken Z chromosome: implications for sex chromosome evolution // *Genetics*. 2004. V. 167. P. 367-376.

Hartfield M., Keightley P. D. Current hypotheses for the evolution of sex and recombination // *Integrative zoology*. 2012. V. 7. I. 2. P. 192-209.

Hattori A. Socially Controlled Growth and Size-Dependent Sex Change in the Anemonefish *Amphiprion frenatus* in Okinawa, Japan // *Japan. J. Ichtyol*. 1991. V. 38. P. 165-177.

He C.L. et al. Differential *Dmrt1* transcripts in gonads of the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* // *Cytogenet Genome Res*. 2003. V. 101. P. 309-313.

Hedin M. C. et al. Synaptonemal complex analysis of sex chromosome pairing in the common ground skink, *Scincella lateralis* (Sauria, Scincidae) // *Copeia*. 1990. P. 1114-1122.

Heng H. H. Q., Tsui L. C. Modes of DAPI banding and simultaneous in situ hybridization // *Chromosoma*. 1993. V. 102. I. 5. P. 325-332.

Holleley C. E. et al. Sex reversal triggers the rapid transition from genetic to temperature-dependent sex // *Nature*. 2015. V. 523. I. 7558. P. 79-82.

Hrbek T., Seckinger J., Meyer A. A phylogenetic and biogeographic perspective on the evolution of poeciliid fishes // *Mol Phylogenet Evol.* 2007. V. 43. P. 986-998.

Itoh Y., Kampf K., Arnold A. P. Disruption of FEM1C-W gene in zebra finch: evolutionary insights on avian ZW genes // *Chromosoma.* 2009. V. 118. I. 3. P. 323-334.

Janes D. E. et al. Recombination and nucleotide diversity in the sex chromosomal pseudoautosomal region of the emu, *Dromaius novaehollandiae* // *Journal of Heredity.* 2009. V. 100. I. 2. P. 125-136.

Jones K. W., Singh L. Snakes and the evolution of sex chromosomes // *Trends in Genetics.* 1985. V. 1. P. 55-61.

Jones R. T. et al. Evolution of a mimicry supergene from a multilocus architecture // *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences.* 2012. V. 279. I. 1727. P. 316-325.

Kawagoshi T. et al. The ZW micro-sex chromosomes of the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*, Trionychidae, Testudines) have the same origin as chicken chromosome 15 // *Cytogenetic and genome research.* 2009. V. 125. I. 2. P. 125-131.

Kawagoshi T. et al. The Staurotypus turtles and Aves share the same origin of sex chromosomes but evolved different types of heterogametic sex determination // *PloS one.* 2014. V. 9. I. 8. P. e105315.

Kawagoshi T., Nishida C., Matsuda Y. The origin and differentiation process of X and Y chromosomes of the black marsh turtle (*Siebenrockiella crassicollis*, Geoemydidae, Testudines) // *Chromosome research.* 2012. V. 20. I. 1. P. 95-110.

Kawai A. et al. The ZW sex chromosomes of *Gekko hokouensis* (Gekkonidae, Squamata) represent highly conserved homology with those of avian species // *Chromosoma.* 2009. V. 118. I. 1. P. 43-51.

Keightley P.D., Otto S.P. Interference among deleterious mutations favours sex and recombination in finite populations // *Nature.* 2006. V. 443. I. 7107. P. 89-92.

Kobayashi T. et al. Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes* // *Dev Dyn.* 2004. V. 231. P. 518-526.

Kochakpour N., Moens P. B. Sex-specific crossover patterns in Zebrafish (*Danio rerio*) // *Heredity (Edinb).* 2008. V. 100. P. 489-495.

Kondo M. et al. Differences in recombination frequencies during female and male meioses of the sex chromosomes of the medaka, *Oryzias latipes* // Genet Res. 2001. V. 78. P. 23-30.

Künstner A. et al. The Genome of the Trinidadian Guppy, *Poecilia reticulata*, and Variation in the Guanapo Population // PLoS ONE. 2016. V. 11. I. 12. e0169087.

Küpper C. et al. Triploid plover female provides support for a role of the W chromosome in avian sex determination // Biology letters. 2012. V. 8. I. 5. P. 787-789.

Kupriyanova L., Kuksin A., Odierna G. Karyotype, chromosome structure, reproductive modalities of three Southern Eurasian populations of the common lacertid lizard, *Zootoca vivipara* (Jacquin, 1787) // Acta Herpetologica. 2008. V. 3. I. 2. P. 99-106.

Lahn B. T., Page D. C. Functional coherence of the human Y chromosome // Science. 1997. V. 278. P. 675-680.

Lahn B. T., Page D. C. Four evolutionary strata on the human X chromosome // Science. 1999. V. 286. P. 964-967.

Laopichienpong N. et al. Evolutionary dynamics of the gametologous CTNNB1 gene on the Z and W chromosomes of snakes // Journal of Heredity. 2016. esw074.

Lawrie N. M., Tease C., Hultén M. A. Chiasma frequency, distribution and interference maps of mouse autosomes // Chromosoma. 1995. V. 104. P. 308-314.

Lin M. et al. Development of the gonads in the triploid (ZZW and ZZZ) fowl, *Gallus domesticus*, and comparison with normal diploid males (ZZ) and females (ZW) // Reproduction, Fertility and Development. 1995. V. 7. I. 5. P. 1185-1197.

Lisachov A. P. New method for visualization of C-heterochromatin in synaptonemal complex spreads // Comparative Cytogenetics. 2013. V. 7. P. 131-138.

Lisachov A. P., Zadesenets K. S., Rubtsov N. B., Borodin P. M. Sex chromosome synapsis and recombination in male guppies // Zebrafish. 2015. V. 12. I. 2. P. 174-180.

Lisachov A. P., Trifonov V. A., Giovannotti M., Ferguson-Smith M. A., Borodin P. M. Heteromorphism of “homomorphic” sex chromosomes in two anole species (Squamata, Dactyloidae) revealed by synaptonemal complex analysis // Cytogenetic and Genome Research. 2017a.

Lisachov A. P., Trifonov V. A., Giovannotti M., Ferguson-Smith M. A., Borodin P. M. Immunocytological analysis of meiotic recombination in two anole lizards (Squamata, Dactyloidae) // *Comparative Cytogenetics*. 2017b. V. 11. I. 1. P. 129-141.

Lynn A. et al. Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates // *Science*. 2002. V. 296. I. 5576. P. 2222-2225.

Mank J. E. Small but mighty: the evolutionary dynamics of W and Y sex chromosomes // *Chromosome Res.* 2012. V. 20. P. 21-33.

Mank J. E., Ellegren H. Parallel divergence and degradation of the avian W sex chromosome // *Trends Ecol Evol*. 2007. V. 22. P. 389-391.

Marchand O. et al. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // *Biochim Biophys Acta*. 2000. V. 1493. P. 180-187.

Matsubara K. et al. Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. V. 103. I. 48. P. 18190-18195.

Matsubara K. et al. Highly differentiated ZW sex microchromosomes in the Australian *Varanus* species evolved through rapid amplification of repetitive sequences // *PloS one*. 2014. V. 9. I. 4. P. e95226.

Matsubara K. et al. No Interstitial Telomeres on Autosomes but Remarkable Amplification of Telomeric Repeats on the W Sex Chromosome in the Sand Lizard (*Lacerta agilis*) // *Journal of Heredity*. 2015. P. esv083.

Matsuda Y. et al. Highly conserved linkage homology between birds and turtles: bird and turtle chromosomes are precise counterparts of each other // *Chromosome Research*. 2005. V. 13. I. 6. P. 601-615.

Mengden G. A., Stock A. D. Chromosomal evolution in Serpentes; a comparison of G and C chromosome banding patterns of some colubrid and boid genera // *Chromosoma*. 1980. V. 79. I. 1. P. 53-64.

Meredith R. W. et al. Molecular phylogenetic relationships and the coevolution of placentalotrophy and superfetation in *Poecilia* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes) // *Mol Phylogenet Evol*. 2011. V. 59. P. 148-157.

Moens P. B. Zebrafish: chiasmata and interference // *Genome*. 2006. V. 49. P. 205-208.

Montiel E. E. et al. Discovery of the youngest sex chromosomes reveals first case of convergent co-option of ancestral autosomes in turtles // *Chromosoma*. 2016. P. 1-9.

Morais da Silva S. et al. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds // *Nature genetics*. 1996. V. 14. I. 1. P. 62-68.

Murray J., Clarke B. Supergenes in polymorphic land snails—examples from genus *Partula* // *Genetics*. 1973. V. 74. P. 188-189.

Nam K., Ellegren H. The chicken (*Gallus gallus*) Z chromosome contains at least three nonlinear evolutionary strata // *Genetics*. 2008. V. 180. P. 1131-1136.

Nanda I. et al. Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences // *Chromosoma*. 1992. V. 101. P. 301-310.

Nanda I. et al. Primitive sex chromosomes in poeciliid fishes harbor simple repetitive DNA sequences // *J Exp Zool*. 1993. V. 265. P. 301-308.

Nanda I. et al. 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9 // *Nature genetics*. 1999. V. 21. I. 3. P. 258-259.

Nanda I. et al. Synteny conservation of the Z chromosome in 14 avian species (11 families) supports a role for Z dosage in avian sex determination // *Cytogenetic and genome research*. 2008. V. 122. I. 2. P. 150-156.

Nanda I. et al. Sex chromosome polymorphism in guppies // *Chromosoma*. 2014. V. 123. I. 4. P. 373-383.

Naurin S. et al. Sex-biased gene expression on the avian Z chromosome: highly expressed genes show higher male-biased expression // *PLoS One*. 2012. V. 7. I. 10. P. e46854.

Nishida-Umehara C. et al. The molecular basis of chromosome orthologies and sex chromosomal differentiation in palaeognathous birds // *Chromosome Research*. 2007. V. 15. I. 6. P. 721-734.

Mallery Jr C. S., Carrillo M. M. A case study of sex-linkage in *Python regius* (Serpentes: Boidae), with new insights into sex determination in Henophidia // *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*. 2016. V. 15. I. 1. P. 29-42.

O'Meally D. et al. Non-homologous sex chromosomes of birds and snakes share repetitive sequences // *Chromosome research*. 2010. V. 18. I. 7. P. 787-800.

O'Meally D. et al. Are some chromosomes particularly good at sex? Insights from amniotes // *Chromosome research*. 2012. V. 20. I. 1. P. 7-19.

Ogawa A., Murata K., Mizuno S. The location of Z-and W-linked marker genes and sequence on the homomorphic sex chromosomes of the ostrich and the emu // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998. V. 95. I. 8. P. 4415-4418.

Ohno S. et al. Microchromosomes in holocephalian, chondrosteian and holostean fishes // *Chromosoma*. 1969. V. 26. P. 35-40.

Oliveira C. et al. Synaptonemal complex analysis in spermatocytes and oocytes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Salmonidae): the process of autosome and sex chromosome synapsis // *Chromosome Res.* 1995. V. 3. P. 182-190.

Olmo E. Rate of chromosome changes and speciation in reptiles // *Genetica*. 2005. V. 125. I. 2-3. P. 185-203.

Olmo E., Odierna G., Capriglione T. Evolution of sex-chromosomes in lacertid lizards // *Chromosoma*. 1987. V. 96. I. 1. P. 33-38.

Otto S. P., Barton N. H. The evolution of recombination: removing the limits to natural selection // *Genetics*. 1997. V. 147. P. 879-906.

Pala I. et al. Evidence of a neo-sex chromosome in birds // *Heredity*. 2012. V. 108. I. 3. P. 264-272.

Pandian T. J., Sheela S. G. Hormonal induction of sex reversal in fish // *Aquaculture*. 1995. V. 138. P. 1-22.

Perrin N. Sex reversal: a fountain of youth for sex chromosomes? // *Evolution*. 2009. V. 63. P. 3043-3049.

Peters A. H. et al. A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline // *Chromosome research*. 1997. V. 5. I. 1. P. 66-71.

Peters V. G. Vergleichende Untersuchungen an drei Subspecies von *Xiphophorus helleri* Heckel (Pisces): (Morphologische Merkmale, geschlechtliche Differenzierung, Wachstum und Geschlechtsverhältnisse) // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 1964. V. 2. I. 1-3. P. 185-266.

Peterson D. G. et al. The relationship between synaptonemal complex length and genome size in four vertebrate classes (Osteichthyes, Reptilia, Aves, Mammalia) // Chromosome Research. 1994. V. 2. I. 2. P. 153-162.

Pigozzi M. I. Distribution of MLH1 foci on the synaptonemal complexes of chicken oocytes // Cytogenetic and Genome Research. 2001. V. 95. I. 3-4. P. 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. V. 139. I. 6. P. 771-777.

Pigozzi M. I. The Chromosomes of Birds during Meiosis // Cytogenetic and Genome Research. 2016.

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

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 Research. 1997. V. 5. I. 6. P. 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 Research. 1999. V. 7. I. 7. P. 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. V. 48. I. 2. P. 286-290.

Pokorná M. et al. Strong conservation of the bird Z chromosome in reptilian genomes is revealed by comparative painting despite 275 million years divergence // Chromosoma. 2011a. V. 120. I. 5. P. 455-468.

Pokorná M., Kratochvíl L. Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: are sex chromosomes an evolutionary trap? // Zoological Journal of the Linnean Society. 2009. V. 156. I. 1. P. 168-183.

Pokorná M. J., Kratochvíl L. What was the ancestral sex-determining mechanism in amniote vertebrates? // Biological Reviews. 2014.

Pokorná M., Kratochvíl L., Kejnovský E. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two

lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*) // BMC genetics. 2011b. V. 12. I. 1. P. 1.

Polani P. E. Centromere localization at meiosis and the position of chiasmata in the male and female mouse // Chromosoma. 1972. V. 36. P. 343-374.

Pressley P. H. Pair Formation and Joint Territoriality in a Simultaneous Hermaphrodite: The Coral Reef Fish *Serranus tigrinus* // Z. Tierpsychol. 1981. V. 56. P. 33-46.

Reed K. M. et al. Synaptonemal complex analysis of sex chromosomes in two species of *Sceloporus* // Copeia. 1990. P. 1122-1129.

Revenkova E., Jessberger R. Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins // Chromosoma. 2006. V. 115. P. 235-240.

Rice W. R. The accumulation of sexually antagonistic genes as a selective agent promoting the evolution of reduced recombination between primitive sex chromosomes // Evolution. 1987. V. 41. P. 911-914.

Rice W.R. Evolution of the Y Sex Chromosome in Animals // BioScience. 1996. V. 46. P. 331-343.

Roeder G. S., Bailis J. M. The pachytene checkpoint // Trends Genet. 2000. V. 16. P. 395-403.

Romanov M. N. et al. Reconstruction of gross avian genome structure, organization and evolution suggests that the chicken lineage most closely resembles the dinosaur avian ancestor // BMC genomics. 2014. V. 15. I. 1. P. 1060.

Rovatsos M. et al. Cretaceous park of sex determination: sex chromosomes are conserved across iguanas // Biology letters. 2014. V. 10. I. 3. P. 20131093.

Rovatsos M. et al. Evolutionary stability of sex chromosomes in snakes // Proc. R. Soc. B. 2015a. V. 282. I. 1821. P. 20151992.

Rovatsos M. et al. Female heterogamety in Madagascar chameleons (Squamata: Chamaeleonidae: *Furcifer*): differentiation of sex and neo-sex chromosomes // Scientific reports. 2015b. V. 5.

Rovatsos M., Vukić J., Kratochvíl L. Mammalian X homolog acts as sex chromosome in lacertid lizards // Heredity. 2016. V. 117. P. 8-13.

Rozen S. et al. Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes // *Nature*. 2003. V. 423. P. 873-876.

Rupp S. M. et al. Evolution of dosage compensation in *Anolis carolinensis*, a reptile with XX/XY chromosomal sex determination // *Genome Biol Evol*. 2016. V. 9. I. 1. P. 231-240.

Russo C. et al. A cytogenetic analysis of *Gambusia holbrooki* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) from the River Sarno // *Ital. J. Zool*. 1999. V. 66. P. 291-296.

Saxena R. et al. The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned // *Nat Genet*. 1996. V. 14. P. 292-299.

Schartl M. Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates // *Curr Opin Genet Dev*. 2004. V. 14. P. 634-641.

Schartl M., Schmid M., Nanda I. Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs // *Chromosoma*. 2016. V. 125. I. 3 P. 553-571.

Schoenmakers S. et al. Female meiotic sex chromosome inactivation in chicken // *PLoS Genetics*. 2009. V. 5. I. 5. e1000466

Schultheis C. et al. Sex determination diversity and sex chromosome evolution in poeciliid fish // *Sex Dev*. 2009. V. 3. P. 68-77.

Sessions S.K. Evolutionary cytogenetics in salamanders // *Chromosome Research*. 2008. V. 16. P. 183-201.

Shetty S. et al. DMRT1 in a ratite bird: evidence for a role in sex determination and discovery of a putative regulatory element // *Cytogenetic and genome research*. 2003. V. 99. I. 1-4. P. 245-251.

Shetty S., Griffin D. K., Graves J. A. M. Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution // *Chromosome Research*. 1999. V. 7. I. 4. P. 289-295.

Skaletsky H. et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes // *Nature*. 2003. V. 423. P. 825-837.

Smith C. A. et al. Genetic evidence against a role for W-linked histidine triad nucleotide binding protein (HINTW) in avian sex determination // *International Journal of Developmental Biology*. 2009. V. 53. I. 1. P. 59.

Smith C. A. et al. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken // *Nature*. 2009. V. 461. I. 7261. P. 267-271.

Smith C. A. et al. Conservation of a sex-determining gene // *Nature*. 1999. V. 402. P. 601-602.

Sola L., Monaco P. J., Rasch E. M. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. I. C-bands, Ag-NOR polymorphisms, and sex chromosomes in three populations of *Poecilia latipinna* // *Cytogenet Cell Genet*. 1990. V. 53. P. 148-154.

Solari A. J. Equalization of Z and W axes in chicken and quail oocytes // *Cytogenetic and Genome Research*. 1992. V. 59. I. 1. P. 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 // *Cytogenetic and Genome Research*. 1993. V. 64. I. 3-4. P. 268-272.

Soto C. G., Leatherland J. F., Noakes D. L. G. Gonadal histology in the self-fertilizing hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* (Pisces, Cyprinodontidae) // *Can. J. Zool*. 1992. V. 70. P. 2338-2347.

Sreenivasulu K., Ganesh S., Raman R. Evolutionarily conserved, DMRT1, encodes alternatively spliced transcripts and shows dimorphic expression during gonadal differentiation in the lizard, *Calotes versicolor* // *Mechanisms of development*. 2002. V. 119. P. S55-S64.

Srikulnath K. et al. Identification of the linkage group of the Z sex chromosomes of the sand lizard (*Lacerta agilis*, Lacertidae) and elucidation of karyotype evolution in lacertid lizards // *Chromosoma*. 2014. V. 123. I. 6. P. 563-575.

Srikulnath K. et al. Karyotype Reorganization in the Hokou Gecko (*Gekko hokouensis*, Gekkonidae): The Process of Microchromosome Disappearance in Gekkota // *PloS one*. 2015. V. 10. I. 8. P. e0134829.

Suh A. et al. Retroposon insertions and the chronology of avian sex chromosome evolution // *Molecular biology and evolution*. 2011. V. 28. I. 11. P. 2993-2997.

Sun F. et al. Analysis of non-crossover bivalents in pachytene cells from 10 normal men // *Hum Reprod.* 2006. V. 21. P. 2335-2339.

Torgasheva A.A., Borodin P.M. Immunocytological analysis of meiotic recombination in the gray goose (*Anser anser*) // *Cytogenetic and Genome Research.* 2017.

Torgasheva A.A., Rubtsov N.B., Borodin P.M. Recombination and synaptic adjustment in oocytes of mice heterozygous for a large paracentric inversion // *Chromosome research.* 2013. V. 21. I. 1. P. 37-48.

Traut W., Winking H. Meiotic chromosomes and stages of sex chromosome evolution in fish: zebrafish, platyfish and guppy // *Chromosome Research.* 2001. V. 9. P. 659-672.

Tripathi N. et al. Linkage analysis reveals the independent origin of Poeciliid sex chromosomes and a case of atypical sex inheritance in the guppy (*Poecilia reticulata*) // *Genetics.* 2009a. V. 182. P. 365-374.

Tripathi N. et al. Genetic linkage map of the guppy, *Poecilia reticulata*, and quantitative trait loci analysis of male size and colour variation // *Proc Biol Sci.* 2009b. V. 276. P. 2195-2208.

Turner B. J. *Evolutionary genetics of fishes.* New York: Plenum Press. 1984. XVIII, 636 p.

Turner J. M. A. Meiotic sex chromosome inactivation // *Development.* 2007. V. 134. P. 1823-1831.

Turner J. M. A. et al. Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse // *Nature genetics.* 2005. V. 37. I. 1. P. 41-47.

Uno Y. et al. Extraordinary Diversity in the Origins of Sex Chromosomes in Anurans Inferred from Comparative Gene Mapping // *Cytogenetic and Genome Research.* 2015. V. 145. I. 3-4. P. 218-229.

Valleley E. et al. Characterisation and expression of Sox9 in the leopard gecko, *Eublepharis macularius* // *Journal of Experimental Zoology.* 2001. V. 291. I. 1. P. 85-91.

Veith A.M. et al. Cloning of the *dmrt1* gene of *Xiphophorus maculatus*: *dmY/dmrt1Y* is not the master sex-determining gene in the platyfish // *Gene.* 2003. V. 317. P. 59-66.

- Veith A.M. et al. Tissue-specific expression of *dmrt* genes in embryos and adults of the platyfish *Xiphophorus maculatus* // *Zebrafish*. 2006. V. 3. P. 325-337.
- Veyrunes F. et al. Bird-like sex chromosomes of platypus imply recent origin of mammal sex chromosomes // *Genome Res*. 2008. V. 18. P. 965-973.
- Vicoso B. et al. Comparative sex chromosome genomics in snakes: differentiation, evolutionary strata, and lack of global dosage compensation // *PLoS Biol*. 2013. V. 11. I. 8. P. e1001643.
- Viets B. E. et al. Temperature-dependent sex determination in the leopard gecko, *Eublepharis macularius* // *Journal of Experimental Zoology*. 1993.V.265.I. 6. P. 679-683.
- Volff J. N., Schartl M. Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes // *Genetica*. 2001. V. 111. P. 101-110.
- Wallace H., Wallace B. M., Badawy G. M. Lampbrush chromosomes and chiasmata of sex-reversed crested newts // *Chromosoma*. 1997. V. 106. P. 526-533.
- Wang C. et al. Identification of sex chromosomes by means of comparative genomic hybridization in a lizard, *Eremias multiocellata* // *Zoological science*. 2015. V. 32. I. 2. P. 151-156.
- Webster M. T., Hurst L. D. Direct and indirect consequences of meiotic recombination: implications for genome evolution // *Trends in genetics*. 2012. V. 28. I. 3. P. 101-109.
- Winkler C. et al. Developmentally regulated and non-sex-specific expression of autosomal *dmrt* genes in embryos of the Medaka fish (*Oryzias latipes*) // *Mech Dev*. 2004. V. 121. P. 997-1005.
- Wright A. E. et al. Convergent recombination suppression suggests role of sexual selection in guppy sex chromosome formation // *Nat Commun*. 2017. V. 8. P. 14251
- Zarkower D. Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity? // *Nat Rev Genet*. 2001. V. 2. P. 175-185.
- Zarkower D. DMRT genes in vertebrate gametogenesis // *Current topics in developmental biology*. 2012. V. 102. P. 327-356.
- Zhou Q. et al. Complex evolutionary trajectories of sex chromosomes across bird taxa // *Science*. 2014. V. 346. I. 6215. P. 1246338.

Zickler D., Kleckner N. Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis // Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2015. V. 7. I. 6. P. a016626.

Zickler D., Kleckner N. A few of our favorite things: Pairing, the bouquet, crossover interference and evolution of meiosis // Seminars in cell & developmental biology. 2016. V. 54. P. 135-148.