

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ СИБИРСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НОВОСИБИРСКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ» (НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ,
НГУ)

На правах рукописи

ТИШАКОВА КАТЕРИНА ВАЛЕРЬЕВНА

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СОСТАВ ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМ
ИГУАНООБРАЗНЫХ И ГЕККОНООБРАЗНЫХ**

1.5.7. - генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
д.б.н., профессор РАН В.А. Трифонов

НОВОСИБИРСК – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
Актуальность исследования	7
Цели и задачи исследования.....	9
Научная новизна	10
Научно-практическая ценность.....	10
Основные положения, выносимые на защиту	10
Личный вклад автора	11
Степень достоверности и апробация результатов.....	11
Публикации	12
Структура и объем работы	12
Благодарности.....	12
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Разнообразие систем определения пола.....	14
1.2. Состав половых хромосом.....	17
1.3. Многообразие генов, определяющих пол	20
1.4. Деграция половых хромосом.....	23
1.5. Методы идентификации и исследования половых хромосом.....	26
1.6. Цитогенетические и геномные исследования рептилий.....	29
1.6.1. Инфраотряд игуанообразные.....	34
1.6.2. Инфраотряд gekkoniformes	35
1.7. Заключение по обзору литературы.....	37
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1. Материалы.....	38
2.2. Праймеры	38
2.3. Животные	38
2.4. Клеточные культуры	38
2.5. Приготовление суспензий фиксированных метафазных клеток	39
2.6. С-окрашивание с использованием флуоресцентных красителей	40
2.7. Выделение ДНК.....	40
2.8. Получение специфичных хромосомных ДНК-библиотек.....	41
2.9. ПЦР-картирование Y-специфичных RAD-seq маркеров <i>C. calypttratus</i>	41

2.10.	Получение зондов для FISH на основе хромосомоспецифичных ДНК-библиотек	41
2.11.	Получение зондов, содержащих сатДНК, гены рибосомной РНК и теломерные повторы	42
2.12.	Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i>	43
2.13.	Секвенирование и анализ данных	44
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ	47
3.1.	Генетический состав половых хромосом заборной малахитовой игуаны (<i>Sceloporus malachiticus</i> , SMA)	47
3.1.1.	Цитогенетический анализ кариотипа <i>S. malachiticus</i> и получение ДНК-библиотек, специфичных для половых хромосом	47
3.1.2.	Сравнительный анализ данных секвенирования ДНК-библиотек <i>S. malachiticus</i>	48
3.1.3.	Идентификация и локализация последовательностей сатДНК, специфичных для половых хромосом <i>S. malachiticus</i>	50
3.2.	Поиск предполагаемых половых хромосом йеменского хамелеона (<i>Chamaeleo calytratus</i> , CCA) и анализ их генетического состава	57
3.2.1.	Идентификация предполагаемых половых хромосом <i>C. calytratus</i>	57
3.2.2.	Сравнительный анализ данных секвенирования ДНК-библиотек <i>C. calytratus</i>	58
3.2.3.	Идентификация и локализация последовательностей сатДНК в геноме <i>C. calytratus</i>	60
3.3.	Генетический состав половых хромосом юкатанского полосатого геккона (<i>Coleonyx elegans</i> , CEL) и центральноамериканского геккона (<i>Coleonyx mitratus</i> , CMI)	62
3.3.1.	Цитогенетическое сравнение половых хромосом <i>C. elegans</i> и <i>C. mitratus</i>	62
3.3.2.	Сравнительный анализ данных секвенирования ДНК-библиотек, специфичных половым хромосомам <i>C. elegans</i>	64
3.3.3.	Идентификация и локализация последовательностей сатДНК, специфичных для половых хромосом <i>C. mitratus</i>	65
4.	ОБСУЖДЕНИЕ	72
4.1.	Половые хромосомы представителей инфраотряда игуанообразные (Iguania)	72
4.1.1.	Заборная малахитовая игуана (<i>Sceloporus malachiticus</i>)	72
4.1.2.	Йеменский хамелеон (<i>Chamaeleon calytratus</i>)	74
4.2.	Половые хромосомы представителей инфраотряда гекконообразные (Gekkota)	77
5.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	81
	ВЫВОДЫ	82
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	83
	ПРИЛОЖЕНИЕ 1	103

ПРИЛОЖЕНИЕ 2	109
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	122

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ЛУК – ледяная уксусная кислота
- п.н. – пара нуклеотидов
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- сатДНК – сателлитная ДНК
- ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
- ВАС (bacterial artificial chromosome) – искусственная бактериальная хромосома
- СуЗ – цианин-3
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) – 4,6-диамин-2-фенилиндо́л
- DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) – фосфатный буфер модификации Дульбекко
- DOP (degenerated oligonucleotide primer) – частично вырожденный праймер
- ESD (environmental sex determination) – определение пола факторами окружающей среды
- FBS (fetal bovine serum) – сыворотка эмбрионов крупного рогатого скота
- FISH (fluorescent *in situ* hybridization) – флуоресцентная гибридизация *in situ*
- FITC (fluorescein isothiocyanate) – флуоресцеинизотиоционат
- GSD (genetic sex determination) – генетический механизм определения пола
- ITS (internal transcribed spacer) – внутренний транскрибируемый спейсер
- PAR (pseudoautosomal region) – псевдоаутосомный район
- PSD (polygenic sex determination) – полигенный механизм определения пола
- qPCR (quantitative polymerase chain reaction) – количественная полимеразная цепная реакция
- RAD-seq (restriction site-associated DNA sequencing) – секвенирование ДНК, ассоциированное с сайтами рестрикции
- SSC (saline-sodium citrate buffer) – цитратно-солевой раствор стандартный солевой буфер
- SDS (sodium dodecyl sulphate) – додецилсульфат натрия
- TSD (temperature-dependent sex determination) – температуро-зависимый механизм определения пола

Для сокращения латинских названий видов использовались трехбуквенные обозначения: первая буква родового названия и две первые буквы видового. Например, *Sceloporus malachiticus* – SMA.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Половое размножение описано у большинства эукариот. Формирование определенного пола может контролироваться средовыми факторами, например, температурой окружающей среды, или генетическим факторами, когда присутствует один или несколько геномных локусов, определяющих пол.

У большинства позвоночных животных пол определяется посредством половых хромосом. Существующие теории предполагают, что половые хромосомы формируются на основе аутосомных пар (Graves 2016). Как правило, одна хромосома из пары приобретает локус, отвечающий за определение пола. Подавление рекомбинации между гомологами препятствует переносу локуса с одной хромосомы на другую, при этом часто один из гомологов накапливает мутации и деградирует, что может приводить к формированию дифференцированных половых хромосом.

В разных эволюционных линиях позвоночных различные пары аутосом могут вовлекаться в формирование половых хромосом, поэтому генетический состав половых хромосом в филогенетических линиях может существенно отличаться (Graves 2016). До сих пор остается неясным, по каким причинам некоторые аутосомные пары становятся половыми хромосомами чаще, чем другие; какие эволюционные механизмы могут этому способствовать, а также как происходит вырождение одного из гомологов и что способствует накоплению на нем повторяющихся последовательностей.

Теплокровные позвоночные обладают относительно древними и стабильными половыми хромосомами: для птиц описаны половые хромосомы системы ZZ/ZW, а для плацентарных и сумчатых млекопитающих – XX/XY. В то же время пойкилотермные позвоночные – рептилии, амфибии и рыбы – демонстрируют удивительное разнообразие систем определения пола: в рамках крупных семейств могут встречаться виды как со средовым, так и с генетическим механизмом определения пола, в том числе и с половыми хромосомами систем XX/XY и ZZ/ZW (Carpel 2017). У видов с хромосомным определением пола могут быть как гомоморфные половые хромосомы, не отличимые морфологически друг от друга,

так и гетероморфные половые хромосомы, имеющие выраженные морфологические отличия. Кроме того, у пойкилотермных позвоночных часто наблюдаются переходы от одной системы определения пола к другой (Pennell et al. 2018). Подобное разнообразие систем определения пола делает холоднокровных животных удобными объектами для изучения эволюции половых хромосом.

Одними из наиболее перспективных объектов для исследования процессов формирования и последующей эволюции половых хромосом являются рептилии из отряда Чешуйчатые (Squamata), которые до сих пор остаются малоизученными как на геномном, так и на цитогенетическом уровне. Данные со сборками геномов хромосомного уровня доступны для относительно небольшого числа видов; большинство геномных проектов останавливается на уровне скаффолдов значительно меньших по размеру, чем хромосомы (Pinto et al. 2023).

Инфраотряды игуанообразные (Iguania) и gekконообразные (Gekkota) являются одними из самых многочисленных таксонов среди чешуйчатых. Для игуанообразных из клады Pleurodonta, описаны половые хромосомы системы XX/XY, которые часто вовлекаются в хромосомные перестройки (Giovannotti et al. 2017, Altmanová et al. 2018), в то время как среди представителей клады Acrodonta встречаются виды как со средовым, так и генетическим определением пола (Ezaz et al. 2005, Nielsen et al. 2018, Rovatsos et al. 2019b). Для gekконообразных характерно разнообразие систем определения пола: в крупных семействах могут встречаться виды как с системами половых хромосом XX/XY, ZZ/ZW, так и виды с гомоморфными половыми хромосомами или температурозависимым определением пола (Gamble 2010). Для данной работы в качестве модельных объектов были выбраны два вида игуанообразных (заборная малахитовая игуана, *Sceloporus malachiticus*, Iguanidae, и йеменский хамелеон, *Chamaeleo calyptratus*, Chamaeleonidae) и два вида gekконообразных (юкатанский полосатый gekкон, *Coleonyx elegans*, и центральноамериканский gekкон, *C. mitratus*, Eublepharidae).

Изучение генетического состава половых хромосом с последующим сравнительным анализом позволяет определить основные закономерности их эволюции. Наиболее эффективные подходы исследования генетического состава половых хромосом базируются на сочетании цитогенетических методик с биоинформатическим анализом последовательностей ДНК (Deakin et al. 2019).

Поэтому для исследования синтенных групп, вовлеченных в формирование половых хромосом, мы использовали метод ChromSeq (Single Chromosome Sequencing), основанный на секвенировании ДНК-библиотек, специфичных для отдельных хромосом, с последующим выравниванием последовательностей на геномы референсных видов (Iannucci et al. 2021). Для оценки степени обогащения вырождающихся гомологов tandemными повторами мы секвенировали геномную ДНК исследуемых видов, выделили из полученных прочтений наиболее распространенные в геномах последовательности сателлитной ДНК и локализовали их на метафазных хромосомах.

Цели и задачи исследования

Целью настоящего исследования является выявление закономерностей эволюции половых хромосом у игуанообразных и гекконообразных с помощью комплексного использования молекулярно-цитогенетических и биоинформатических подходов.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) С помощью проточной сортировки хромосом получить специфичные ДНК-библиотеки половых хромосом для заборной малахитовой игуаны (*Sceloporus malachiticus*), йеменского хамелеона (*Chamaeleo calypttratus*), юкатанского полосатого геккона (*Coleonyx elegans*) и секвенировать их;
- 2) Идентифицировать половые хромосомы в геноме йеменского хамелеона (*C. calypttratus*) с помощью ПЦР-ассоциированного картирования Y-специфичных маркеров;
- 3) Посредством биоинформатического анализа выявить районы гомологии между половыми хромосомами исследуемых видов и геномами референсных видов (североамериканский красногорлый анолис, *Anolis carolinensis*, и др.) для определения синтенных групп, вовлеченных в формирование половых хромосом;
- 4) С помощью биоинформатических и цитогенетических подходов исследовать содержание сателлитной ДНК в гетерохроматиновых районах половых хромосом у заборной малахитовой игуаны (*S. malachiticus*),

йеменского хамелеона (*C. calyptratus*) и центральноамериканского геккона (*Coleonyx mitratus*).

Научная новизна

Исследован генетический состав половых хромосом четырех видов чешуйчатых. Определены синтенные группы генов, вовлеченные в формирование половых хромосом у заборной малахитовой игуаны (*Sceloporus malachiticus*), йеменского хамелеона (*Chamaeleo calyptratus*), юкатанского полосатого геккона (*Coleonyx elegans*) и центральноамериканского геккона (*C. mitratus*). Впервые определена предполагаемая пара гомоморфных половых хромосом йеменского хамелеона. В геномах заборной малахитовой игуаны, йеменского хамелеона и центральноамериканского геккона впервые выявлены последовательности наиболее распространенной сателлитной ДНК, определена их хромосомная локализация, идентифицированы повторы, которые являются специфичными для половых хромосом.

Научно-практическая ценность

Полученные результаты расширяют фундаментальные знания о структуре половых хромосом у чешуйчатых, в том числе об их генетическом составе и преобразованиях в ходе эволюции. Некоторые из последовательностей сателлитной ДНК, описанные в данной работе, могут быть использованы в качестве маркеров для идентификации отдельных пар хромосом. Результаты работы могут быть использованы для сборки или уточнения сборки геномов исследованных видов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Синтенные группы генов, формирующие половые хромосомы у рептилий – заборной малахитовой игуаны (*Sceloporus malachiticus*, Iguanidae), йеменского хамелеона (*Chamaeleo calyptratus*, Chamaeleonidae), юкатанского полосатого и центральноамериканского гекконов (*Coleonyx elegans* и *C. mitratus*, Eublepharidae), часто встречаются в составе половых хромосом у многих видов чешуйчатых, что свидетельствует о конвергентном использовании одних и тех же групп сцепления в эволюции их половых хромосом.

2. Процесс гетерохроматинизации половых хромосом у игуаны *S. malachiticus* и геккона *C. mitratus* сопровождается накоплением различных сателлитных последовательностей, значительная часть которых имеет ауточомное происхождение.

Личный вклад автора

Автор выполнила большую часть экспериментальных работ, включающую получение и культивирование клеточных культур, приготовление суспензий фиксированных метафазных клеток и цитологических препаратов метафазных хромосом; получение зондов хромосомоспецифичных ДНК-библиотек, последовательностей сателлитной ДНК и их локализацию с помощью FISH; выделение ДНК из тканей и клеточных культур. Автор провела микроскопический анализ изображений хромосом, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа, осуществила обработку и анализ цитогенетических данных, а также принимала прямое участие в биоинформатическом анализе. Автор принимала непосредственное участие в подготовке материалов и написании отдельных разделов статей про половые хромосомы заборной игуаны и гекконов рода *Coleonyx*, а также самостоятельно подготовила манускрипт статьи о половых хромосомах йеменского хамелеона.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов подтверждается логическим обоснованием выводов и согласованностью результатов данной работы с результатами, полученными другими группами. Результаты работы представлены и обсуждены на XVIII Всероссийской молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2021), III Всероссийской конференции «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (Новосибирск, 2022), 13-й Международной мультikonференции «Биоинформатика Геномной Регуляции и Структурной/Системной Биологии» (Новосибирск, 2022).

Публикации

Материал диссертации представлен в трех публикациях в зарубежных рецензируемых журналах, входящих в международные базы цитирования (WoS, Scopus):

1. Lisachov A. P., **Tishakova K. V.**, Romanenko S. A., Molodtseva A. S., Prokopov D. Y., Pereira J. C., Ferguson-Smith M. A., Borodin P. M., Trifonov V. A. Whole-chromosome fusions in the karyotype evolution of *Sceloporus* (Iguania, Reptilia) are more frequent in sex chromosomes than autosomes. // Philosophical Transactions of the Royal Society B. – 2021. – Т. 376. – № 1833. – С. 20200099.

2. **Tishakova K. V.**, Prokopov D. Y., Davletshina G. I., Rumyantsev A. V., O'Brien P. C., Ferguson-Smith M. A., Giovannotti M., Lisachov A. P., Trifonov, V. A. Identification of Iguania Ancestral Syntenic Blocks and Putative Sex Chromosomes in the Veiled Chameleon (*Chamaeleo calyptratus*, Chamaeleonidae, Iguania). // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Т. 23. – №24. – С. 15838.

3. Lisachov A., **Tishakova, K.**, Romanenko S., Lisachova L., Davletshina G., Prokopov D., Kratochvíl L., O'Brien P., Ferguson-Smith M., Borodin P., Trifonov V. Robertsonian fusion triggers recombination suppression on sex chromosomes in *Coleonyx* geckos. // Scientific Reports. – 2023. –Т. 13. –№ 1. – С. 15502.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка использованной литературы (190 ссылок). Общий объем составляет 123 страницы машинописного текста. Представлено 16 рисунков, 11 таблиц и 3 приложения.

Благодарности

Автор искренне признателен научному руководителю В. А. Трифонову за руководство и всестороннюю помощь; М. Джованнотти и Л. С. Лисачевой за предоставленных животных, С. А. Романенко за помощь в работе с клеточными культурами, М. Фергюсон-Смиту и Дж. Перейра за проведение хромосомного сортирования, А. С. Молодцевой и Г. И. Давлетшиной за подготовку ДНК-библиотек к секвенированию, Д. Ю. Прокопову, А. П. Лисачеву, А. В. Румянцеву за помощь в

биоинформатическом анализе, а также коллективу отдела разнообразия и эволюции геномов за техническую и моральную поддержку.

Работа проводилась на базе лаборатории сравнительной геномики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН и на разных этапах была поддержана грантом РФФИ 19-54-26017 и грантами Министерства образования и науки РФ FSUS-2020-0040, FSUS-2024-0018.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Разнообразие систем определения пола

Половое размножение широко распространено среди эукариот. Благодаря поддержанию генетического разнообразия и очищению популяций от мутаций с негативным эффектом оно получило эволюционное преимущество по сравнению с бесполом размножением (Crow 1994).

Среди различных филогенетических линий позвоночных наблюдается удивительное разнообразие систем определения пола (Рис.1).

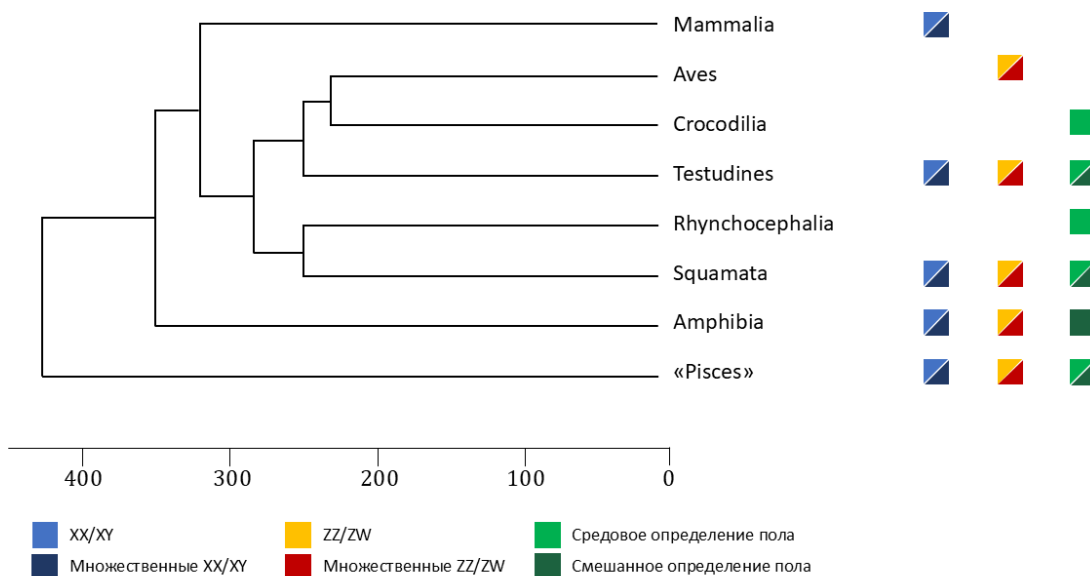


Рисунок 1. Упрощенная схема разнообразия систем определения пола у позвоночных животных. Филогенетическое древо показывает системы определения пола, обнаруженные у представителей соответствующей клады. Группа рыбы взята в кавычки как парафилетический таксон. Схема адаптирована из Capel 2017.

Традиционно выделяют два основных механизма определения пола: средовое (environmental sex determination, ESD) и генетическое (genetic sex determination, GSD) (Bull 1983). При ESD пол особи определяется посредством воздействия внешних факторов на развивающийся организм. Например, социальные факторы могут изменить уже сложившийся фенотип у коралловых рыб (Todd et al. 2019), а эндопаразиты некоторых насекомых способны элиминировать самцов из

популяции, убивая их на стадии зародыша или трансформируя в самок (Negri et al. 2006, Sheeley and Mcallister 2009). Наиболее распространенным средовым фактором, влияющим на определение пола, является температура окружающей среды, поэтому его часто выделяют в отдельный механизм – TSD (temperature-dependent sex determination). TSD влияет на определение пола у крокодилов, некоторых чешуйчатых, черепах и рыб (Merchant-Larios and Diaz-Hernandez 2013). Недавние исследования позволили определить генетические механизмы, и в частности, роль гена *Kdm6b*, контролирующие TSD у красноухой пресноводной черепахи (*Trachemys scripta elegans*) и миссисипского аллигатора (*Alligator mississippiensis*) (Ge et al. 2018, Toyota et al. 2023).

TSD широко распространено в тех линиях позвоночных, для которых различные условия среды оказывают разное влияние на приспособленность самцов и самок (Bachtrog et al. 2014). В непредсказуемых или, наоборот, слишком стабильных условиях, ESD может приводить к дисбалансу соотношения полов и появлению особей, имеющих признаки обоих полов. В подобных условиях GSD является более выгодным по сравнению со ESD, поскольку обеспечивает относительно стабильное соотношение полов (Bull 1983).

В рамках GSD различают моногенное и полигенное определение пола. В случае, когда несколько локусов или аллелей, располагающихся на разных парах хромосом, влияют на определение пола, говорят о полигенном определении пола (polygenic sex determination, PSD) (Moore and Roberts 2013). Полигенные системы возникают на основе модификаций уже имеющихся половых хромосом с помощью создания третьей функциональной половой хромосомы, как это произошло, например, у африканских цихлид (*Metriacroma pyrrhonotus*) (Ser et al. 2010); либо при модификации аутосомных локусов, находящихся в разных участках генома, как, например, у полосатого данио (*Danio rerio*) (Liew et al. 2012).

При моногенном определении пола только один локус отвечает за определение пола. Пара хромосом, несущая определяющий пол локус, является половой. Моногенное определение пола описано у многих видов с генетическим определением пола. В зависимости от того, какой пол является гетерогаметным, выделяют две системы половых хромосом: XX/XY и ZZ/ZW. У видов с системой XX/XY гетерогаметным полом являются самцы (XY), а самки – гомогаметным (XX).

Такая система половых хромосом характерна для большинства млекопитающих, некоторых рептилий и рыб. У видов с системой половых хромосом ZZ/ZW самки (ZW) являются гетерогаметным полом, а самцы (ZZ) – гомогаметным. Среди позвоночных эта система описана у всех птиц, большинства змей, некоторых ящериц, амфибий и рыб (Ezaz et al. 2006).

Согласно классической теории эволюции, половые хромосомы формируются на основе аутосомной пары, в которой один из гомологов приобрел определяющий пол локус (Bull 1983, Charlesworth 1991). В ходе дальнейшей эволюции рядом с локусом, определяющим пол, постепенно накапливаются гены, которые обеспечивают специфичные для данного пола функции и оказывают негативное влияние на приспособленность противоположного пола (Bergero and Charlesworth 2009). Для того, чтобы сохранить созданную группу сцепления, рекомбинация в этом районе подавляется, что приводит к деградации одного из гомологов путем вырождения генов и накопления повторяющихся последовательностей. В результате формируются различия между половыми хромосомами (гетероморфизм), а вырожденный гомолог впоследствии может элиминироваться из генома (Vicoso et al. 2013, Cortez et al. 2014).

Основные положения классической теории были сформулированы с использованием данных, полученных на модельных организмах. Однако расширение сведений о разнообразии половых хромосом, степени их деградации и эволюции у немодельных организмов пошатнуло основы классической теории и способствовало появлению научных трудов, дополняющих старую теорию новыми данными, либо предлагающих альтернативные гипотезы (Furman et al. 2020, Charlesworth 2021, Kratochvíl et al. 2021a, 2021b).

В обзоре литературы будут подробно рассмотрены наиболее известные на текущий момент гипотезы и экспериментальные данные о том, что является источником генетического материала для половых хромосом, какие гены могут быть кандидатами на роль определителей пола, как происходит деградация половых хромосом. Кроме того, будут описаны основные методы изучения половых хромосом и показано, почему рептилии являются удобной моделью для изучения эволюции половых хромосом у позвоночных животных.

1.2. Состав половых хромосом

В различных линиях позвоночных разные пары аутосом могут быть вовлечены в формирование половых хромосом (Graves 2016). Сравнительный анализ генетического состава половых хромосом у разных видов позвоночных в большинстве своем подтверждает данную теорию. Например, X-хромосома плацентарных млекопитающих ортологична короткому плечу аутосомы 4 и участку аутосомы 1 курицы, а Z-хромосома птиц ортологична участкам аутосом 5 и 9 человека (Marshall Graves and Shetty 2000, Nanda et al. 2000). Z-хромосома змей ортологична участку хромосомы 2 курицы, а Z-хромосома птиц ортологична р-плечу хромосомы 2 змей (Matsubara et al. 2006).

Помимо аутосом, источниками генетического материала для формирования половых хромосом могут быть добавочные хромосомы (В-хромосомы). Несколько случаев происхождения половых хромосом из В-хромосом описаны у насекомых (Samacho et al. 2011). Среди позвоночных выявлено несколько подобных случаев у рыб и амфибий. Так, у цихлид (*Metriaclichia pyrrhonotus*) озера Малави уже имеются половые хромосомы системы XX/XY, а единственная В-хромосома выступает как унивалентная W-хромосома, которая эпистатически доминирует над Y-хромосомой. В результате особи с генотипами XY-W0, XX-W0 и XX-00 будут развиваться как самки (Clark and Kocher 2019). Похожий вариант формирования половой хромосомы из добавочной описан у новозеландских лягушек (*Leiopelma hochstetteri*), генотип самцов которых 00, а самок 0W. Предполагается, что унивалентная W-хромосома произошла в результате приобретения В-хромосомой феминизирующего гена-определителя пола (Green et al. 1993). В то же время у пещерных рыб (*Astyanax mexicanus*), у которых половые хромосомы не обнаружены, наличие в геноме В-хромосомы способствует развитию эмбрионов с мужским фенотипом (Imarazene et al. 2021).

Многие таксоны позвоночных – млекопитающие, змеи и птицы, – характеризуются стабильными и консервативными половыми хромосомами. Однако у некоторых рептилий, земноводных и рыб описаны частые переходы от одной пары хромосом, задействованной в определении пола, к другой. Нередко при смене половых хромосом происходит и смена систем с XY на ZW и наоборот (Pennell et al. 2018).

Смена половых хромосом начинается с возникновения новых локусов, определяющих пол, в новых местах генома. Часто новый локус оказывает положительный эффект на приспособленность особей, что способствует его распространению в популяции и замещению функций старого локуса. В результате исходная пара половых хромосом возвращается в аутосомное состояние. Переходы особенно вероятны при наличии гомоморфных половых хромосом, когда генетические различия между гомологами еще не выражены и комбинации WW или YY не являются летальными (Bachtrog et al. 2014).

Для изменения системы определения пола смена хромосомной пары не является обязательным условием. Например, у двух видов лягушек и пецилий описана смена системы XX/XY на ZZ/ZW в рамках одной и той же пары хромосом (Volff and Schartl 2001, Miura et al. 2012, Miura 2018). У рыб рода *Takifugu* зафиксирована смена локуса, определяющего пол и несущего ген *Amhr2*, на другой, расположенный на противоположном от предыдущего локуса конце той же хромосомы (Ieda et al. 2018). Наиболее экзотический случай описан у гуппи, для которых, по всей видимости, на смену деградировавшей Y-хромосоме пришла X-хромосома (Charlesworth et al. 2021). Авторы данной работы предполагают, что нечто подобное произошло со слепушонками рода *Ellobius*, некоторые виды которых утратили предковую Y-хромосому, и теперь оба пола у этих грызунов несут по две X-хромосомы (Charlesworth et al. 2021).

Менее подвержены подобного рода переходам высокодифференцированные гетероморфные половые хромосомы, поскольку превращение Y или W в аутосомы может оказаться вредным. С одной стороны, у особей с генотипом YY или WW отсутствует большая часть генов с X- или Z-хромосомы, что снижает их жизнеспособность. С другой стороны, поскольку Y- и W-хромосомы могут содержать гены, оказывающие влияние на приспособленность гетерогаметного пола, выживаемость самцов XX и самок ZZ будет снижена (Vicoso 2019). Предполагается, что гетероморфные половые хромосомы действуют как «эволюционные ловушки», которые блокируют переходы от одной системы определения пола к другой и стабилизируют хромосомную пару, несущую определяющий пол локус (Pokorná and Kratochvíl 2009).

Обнаружение у некоторых позвоночных, например, таких как осетровые (Kuhl et al. 2021) и сцинковые (Kostmann et al. 2021) гомоморфных половых хромосом, эволюционно стабильных на протяжении длительных временных промежутков, а также несколько зафиксированных переходов гетероморфных половых хромосом в аутосомы, ставят под сомнение состоятельность как гипотезы «эволюционной ловушки» (Kostmann et al. 2021), так и классическую теорию эволюции половых хромосом в целом (Kratochvíl et al. 2021a).

По мере увеличения количества видов с исследованным генетическим составом половых хромосом обнаружилось, что одни и те же синтенные группы генов могут встречаться в составе половых хромосом у разных, филогенетически далеких друг от друга, таксонов позвоночных. По-прежнему остается неясным, является ли данный процесс случайным из-за ограниченности предкового набора хромосом или же есть генетические (например, наличие генов-участников каскада определения пола) или филогенетические предпосылки для вовлечения одних и тех же групп генов в формирование половых хромосом чаще, чем других (O'Meally et al. 2012).

Наиболее интересной оказалась полемика относительно происхождения половых хромосом амниот – крупной клады позвоночных, к которой относят рептилий, птиц и млекопитающих. На данный момент можно выделить две гипотезы. Первая гипотеза предполагает, что у общего предка амниот пол определялся факторами среды, а половые хромосомы формировались независимо из разных пар аутосом в разных линиях амниот. В таком случае сходство генетического состава между половыми хромосомами филогенетически далеких видов являются конвергентными (Pokorná and Kratochvíl 2016). Подтверждением этой гипотезы является филогенетическая реконструкция систем определения пола у рептилий и рыб (Pokorná and Kratochvíl 2009, Gamble et al. 2015b, Pennell et al. 2018).

Альтернативная гипотеза предполагает, что у общего предка амниот была «супер-половая хромосома», в состав которой входил генетический материал Z-хромосомы птиц и X-хромосомы плацентарных млекопитающих. С течением времени «супер-половая хромосома» распалась на несколько хромосом, некоторые из которых до сих пор выполняют функцию половых хромосом в разных, филогенетически далеких линиях амниот. В качестве доказательств авторы данной

гипотезы предъявляют сравнительно сходный генетический состав между Z-хромосомой птиц, половыми хромосомами однопроходных и Z-хромосомой японского геккона (*Gekko hokouensis*), а также между половыми хромосомами плацентарных млекопитающих и настоящими ящерицами (Ezaz et al. 2017). Появление видов со средовым определением пола среди некоторых линий амниот рассматривается как вторичное. Однако эта гипотеза не объясняет, как в рамках «супер-половой» хромосомы могут сочетаться и одновременно функционировать несколько генов-определителей пола, таких как *amh*, *dmrt1* и *sox3* (Ezaz et al. 2017).

Таким образом, для подтверждения или опровержения гипотез «эволюционной ловушки» половых хромосом, конвергентного сходства генетического состава и «супер-половой хромосомы» амниот необходим детальный молекулярный анализ половых хромосом с использованием методов секвенирования нового поколения у таксонов с богатым разнообразием систем определения пола, таких как рептилии, земноводные и рыбы, а также высших амниот с нестандартными половыми хромосомами (Pennell et al. 2018, Vicoso 2019).

1.3. Многообразие генов, определяющих пол

Для генетического определения пола необходимо наличие локуса, который осуществляет контроль над каскадом определения пола. Обычно подобные генетические элементы формируются на основе уже существующих генов, функциональность которых может изменяться в результате точечных мутаций (Kamiya et al. 2012, Myosho et al. 2012), дупликаций (Yoshimoto et al. 2008), делеций (Smith et al. 2009), регуляторных изменений (Herpin et al. 2010) и других, не обнаруженных механизмов. Если ген-определитель пола располагается на Y или W, то он является доминантным, и одной его копии достаточно для формирования фенотипа по мужскому типу (ген располагается на Y) или по женскому (ген располагается на W). В случае, когда локус, определяющий пол, располагается на X или Z, то его функциональность является дозозависимой, и для определения пола необходимо две действующие копии, чтобы формировался репродуктивный фенотип самца (ген располагается на Z) или самки (ген располагается на X) (Furman et al. 2020).

Большинство описанных генов, определяющих пол, условно можно разделить на три группы: гены семейства *sox*; гены, содержащие домен DM; и гены семейства TGF- β (Li and Gui 2018). Гены семейства *sox* (Sry-related HMG-box genes) кодируют факторы транскрипции, которые связываются с последовательностями ДНК и могут активировать или подавлять транскрипцию (Kiefer et al. 2007). Наиболее известным и изученным представителем данного семейства является ген *sry* (sex determination region Y) – универсальный ген-определитель пола у терий (сумчатых и плацентарных млекопитающих). *Sry* располагается на Y-хромосоме, и одной его копии достаточно для инициации превращения бипотенциальных гонад в семенники. Предполагается, что *sry* произошел из гена *sox3*, который располагается на X-хромосоме терий (Ezaz et al. 2006).

Эксперименты на трансгенных линиях мышей показали, что многие гены семейства *sox*, в частности такие как *sox3* (Sutton et al. 2011), *sox9* (Vidal et al. 2001), *sox10* (Polanco et al. 2010), способны заменить *sry*, если будут экспрессироваться в нужных тканях в нужное время. Данный факт позволяет предположить, что многие гены семейства *sox* могут брать на себя функцию гена-определителя пола и активировать развитие зародыша по мужскому пути (Capel 2017). Подтверждают эту идею исследования генов-определителей пола у других позвоночных. Например, у индийских оризий (*Oryzias dancena*) ортолог гена *sox3* на Y-хромосоме участвует в определении пола самцов (Takehana et al. 2014), в то время как у японской медаки (*Oryzias latipes*) в определении пола участвует ген *sox5*, подавляя активность гена *dmy*, который является у этих рыб основным геном-определителем пола (Schartl et al. 2018).

Гены, содержащие домен DM (*doublesex* и *mab-3*), являются самыми консервативными участниками генетического каскада определения пола. Домен DM был открыт благодаря выявлению сходных последовательностей у генов, участвующих в определении пола у дрозофил (*doublesex*, *dsx*) и нематод (*male abnormal 3*, *mab-3*) (Matson and Zarkower 2012). Впоследствии гены с DM-доменом были обнаружены у обширного числа изученных видов позвоночных и беспозвоночных животных. Функции большинства из них связаны с определением пола, регуляцией полового развития и контролем полового диморфизма (Matson and Zarkower 2012).

Ген *dmrt1* (doublesex and mab-3-related transcription factor 1) играет важную роль в развитии по мужскому пути у позвоночных, является главным геном, определяющим пол у рыбы - малабарской циноглоссы (*Cynoglossus semifasciatus*) (Cui et al. 2017), а также считается наиболее вероятным кандидатом на эту роль у птиц (Shan et al. 2000, Smith et al. 2009). Примечательно, что в обоих случаях ген *dmrt1* локализуется на Z-хромосоме, а его действие является дозозависимым: необходимо две копии гена для развития самцов (Smith et al. 2009, Cui et al. 2017). Известно несколько паралогов гена *dmrt1*, влияющих на определение пола у позвоночных. Ранее ген *dmy*, который является перенесенной на Y-хромосому копией *dmrt1*, был описан как главный переключатель пола у японской медаки (Matsuda et al. 2002). Однако, как уже упоминалось выше, активность данного гена может изменяться под влиянием гена *sox5*. Ген *dm-w*, отвечающий за развитие самок у шпорцевых лягушек (*Xenopus laevis*), является дупликацией *dmrt1* на W-хромосоме (Yoshimoto et al. 2008).

Гены семейства TGF- β (transforming growth factor β) часто выступают в роли генов-определителей пола (Pan et al. 2021). Ярким представителем этого семейства является ген *amh* (anti-Müllerian hormone), который играет важную роль в развитии самцов у позвоночных животных. Предполагается, что у утконоса вариант гена *amh*, располагающийся на хромосоме Y5 (*dmhy*), является основным кандидатом на роль гена-определителя пола (Cortez et al. 2014, Zhou et al. 2021). Для нескольких видов рыб копии гена *amh* на Y-хромосомах описаны как главные определители пола (Hattori et al. 2012, Kamiya et al. 2012, Li et al. 2015). Кроме того, у рыб выявлено еще как минимум два представителя семейства TGF- β , *gsdf* (gonadal soma derived factor) и *gdf6y* (growth differentiation factor 6), которые выступают в качестве определителей пола (Myosho et al. 2012, Reichwald et al. 2015).

Известны случаи, когда роль гена-определителя пола начинают играть гены, не участвовавшие исходно в регуляции полового развития. Например, у радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) из семейства лососёвые ген *sdy*, паралог аутосомного регуляторного фактора интерферона 9 (*irf9*), кодирует белок, который утратил ДНК-связывающий домен, но сохранил домен взаимодействия с белком. Избыточная экспрессия *sdy* индуцирует дифференцировку семенников, а направленная инактивация *sdy* приводит к дифференцировке яичников. Эти результаты

демонстрируют, что *sdy* является геном, определяющим пол у *O. mykiss*; однако, как *sdy* запускает развитие мужских гонад, остается неясным (Yano et al. 2012). Несмотря на то, что у лососёвых нет общей консервативной синтении Y-хромосомы, *sdy* является консервативным геном определителем пола у большинства представителей данного семейства (Yano et al. 2013).

Чрезвычайное разнообразие переключателей, определяющих пол у позвоночных, указывает на то, что гены, определяющие пол, могут возникать многократно, при этом участники генетического каскада определения пола являются наиболее вероятными кандидатами на роль предшественников генов-переключателей (Li and Gui 2018).

1.4. Деграция половых хромосом

Одной из отличительных черт половых хромосом является деграция одного из гомологов. Предполагается, что данный процесс взаимосвязан с появлением на половых хромосомах района, в котором рекомбинация между гомологами подавляется (Bergero and Charlesworth 2009). К цитогенетическим причинам супрессии кроссинговера можно отнести хромосомные перестройки (инверсии и транслокации), постепенное снижение частоты кроссинговера за счет увеличения размера гетерохроматиновых районов или же под влиянием инсерции мобильных генетических элементов (Charlesworth et al. 2005, Natri et al. 2013, Li et al. 2016). Существует несколько гипотез, предполагающих, что некоторые эволюционные процессы, например, такие как половой антогонизм, мейотический драйв, генетический дрейф и преимущество гетерозигот могут быть причиной подавления рекомбинации между гомологами у гетерогаметного пола. Однако несмотря на убедительные теоретические обоснования, лишь малое количество экспериментальных данных подтверждает эти теории (Ponnikas et al. 2018).

Для успешного прохождения мейоза все же необходимо, чтобы между половыми хромосомами сохранялась область гомологии, в которой возможна рекомбинация, так называемый псевдоаутосомный район (pseudoautosomal region, PAR) (Otto et al. 2011). Его размеры могут варьировать в зависимости от возраста половых хромосом и скорости их деграции, причем вариация наблюдается даже у линий с консервативными половыми хромосомами. Например, размеры PAR в W-

хромосоме птиц варьируют в широком диапазоне: от практически идентичных морфологически Z и W у бескилевых птиц, до экстремально маленькой W-хромосомы у курицы (Yazdi and Ellegren 2014).

Вероятно, супрессия рекомбинации является ступенчатым процессом. Нередко старые системы половых хромосом характеризуются наличием нескольких «эволюционных пластов» с разной степенью расхождения последовательностей между гомологами. При этом наиболее удаленные от PAR участки хромосомы утратили способность к кроссинговеру первыми и потому являются самыми старыми, в то время как более молодые «пласты» располагаются ближе к PAR. Подобные «эволюционные пласты» идентифицированы на половых хромосомах млекопитающих, птиц и змей (Charlesworth 2017).

Для большинства систем гетероморфных половых хромосом характерно накопление повторяющихся последовательностей ДНК. Опубликовано множество работ по физическому картированию повторяющихся элементов на половых хромосомах позвоночных животных. Чаще всего в таких районах обнаруживались накопления сателлитной ДНК, теломерные последовательности, увеличенное число копий генов мультигенных семейств (pДНК и гистонов) и мобильных генетических элементов (LINEs и SINEs) (Ezaz and Deakin 2014). Избыточное накопление повторяющихся элементов на Y- или W-хромосоме может увеличивать её физический размер относительно гомолога, что и произошло у некоторых видов амфибий, рептилий и рыб (Schartl et al. 2016). Причины, вызывающие накопление повторяющейся ДНК на половых хромосомах, до сих пор не ясны. С одной стороны, амплификация повторяющихся последовательностей на одном из гомологов может вносить весомый вклад в процесс подавления рекомбинации между половыми хромосомами. С другой стороны, районы со сниженным количеством сайтов кроссинговера особенно уязвимы перед избыточным накоплением повторяющихся элементов (Ezaz and Deakin 2014). Несмотря на отсутствие неравного кроссинговера, который является одним из основных механизмов накопления повторяющейся ДНК и сателлитной ДНК в частности, обогащение нерекombинирующих участков повторами может происходить за счет активности мобильных генетических элементов, проскальзывании ДНК при репликации и амплификации внехромосомной ДНК по типу катящегося кольца (обзор: Thakur et al. 2021).

Еще одной характерной чертой вырождающихся половых хромосом является деградация кодирующих последовательностей на Y- и W-хромосомах. Рекомбинация способствует очищению от аллелей, несущих вредные мутации, однако в районах ее подавления на Y- и W-хромосомах подобный отбор не производится. В результате гены, попавшие в нерекombинирующий участок, накапливают вредные мутации, теряют свою функциональность и элиминируются, либо, в редких случаях, приобретают новые функции (Bachtrog 2006).

Эволюционные силы, влияющие на скорость деградации и потери генов, до сих пор остаются недостаточно исследованными. Ранние теоретические модели предсказывали, что деградация Y-хромосомы должна происходить быстрее, чем W-хромосомы. Подобного рода теории основывались на том, что для самцов характерна высокая частота мутаций и меньший эффективный размер популяций. Кроме того, на самцов сильнее действует отбор. Поэтому ожидалось, что быстрое накопление вредных мутаций у самцов будет влиять на скорость вырождения нерекombинирующих районов на Y-хромосоме (Bachtrog et al. 2011). Однако сравнение степени вырожденности половых хромосом в разных системах определения пола у филогенетически близких таксонов не подтверждают эти предположения. Например, у змей были обнаружены линии с гетероморфными ZZ/ZW половыми хромосомами, а также линии с гомоморфными XX/XY; при этом нет данных, подтверждающих значительную эволюционную разницу по времени возникновения этих систем половых хромосом (Kratohvíl et al. 2021a). Современные теоретические модели предсказывают быструю потерю функциональных генов сразу после формирования на одном из гомологов нерекombинирующего района. Предполагается, что с уменьшением количества генов в таком районе скорость деградации и потери генов тоже постепенно снижается. Однако эта теория также требует уточнений с опорой на экспериментальные данные (Charlesworth 2021).

Потеря генов одним из гомологов рано или поздно приводит к неравной экспрессии генов у мужских и женских особей, а также на половых хромосомах и аутосомах. Для достижения равной экспрессии генов необходимо формирование механизмов дозовой компенсации (Vicoso and Bachtrog 2009). У разных таксонов задействованы разные механизмы для решения этой задачи. Например, для

млекопитающих характерна инактивация одной из X-хромосом у самок, в то время как у плодовых мушек (*Drosophila melanogaster*) увеличивается уровень транскрипции генов на X-хромосоме самцов (Straub and Becker 2007, Payer and Lee 2008). Однако для многих видов насекомых, рыб, птиц, рептилий и утконоса описаны механизмы частичной компенсации, когда разница в дозе генов между полами выравнивается только для определенных генов (Gu and Walters 2017).

1.5. Методы идентификации и исследования половых хромосом

Современные методы исследования генетического материала половых хромосом, их деградации и смены систем определения пола базируются на обработке данных высокопроизводительного секвенирования с помощью биоинформатических инструментов в сочетании с цитогенетическим анализом. Подбор методов зависит от степени дифференцированности гомологов. Ниже мы рассмотрим наиболее распространенные подходы.

Так, у видов с гомоморфными половыми хромосомами первостепенной задачей является идентификация системы половых хромосом. Несмотря на то, что на цитологическом уровне различия между гомологами не видны, в районе, связанном с определением пола, накапливаются вредные мутации и происходит потеря генов. Биоинформатическое сравнение данных секвенирования геномной ДНК противоположных полов позволяет обнаружить подобного рода различия. Например, у видов с половыми хромосомами системы XX/XY X-связанные гены будут представлены у самок в двух копиях, а у самцов в одной. Разницу в числе копий генов между полами можно подтвердить путем количественной полимеразной цепной реакции. Кроме того, эту методику можно использовать для оценки примерного возраста половых хромосом путем сравнения числа копий X-связанных генов у родственных видов. С помощью подобного подхода были изучены гомоморфные системы половых хромосом у широкого спектра рептилий (Rovatsos et al. 2015, Altmanová et al. 2018, Kostmann et al. 2021).

Методы исследования половых хромосом также могут базироваться на секвенировании РНК. Сравнение у разных полов уровней экспрессии генов, локализованных в половых хромосомах, позволяет понять, какие из генов потерялись или утратили свои функции на вырождающемся гомологе (Bergero et al.

2015, Papadopoulos et al. 2015). Кроме того, выравнивание транскриптов, полученных для гетерогаметного пола, на эталонную сборку транскриптома гомогаметного пола помогает собрать участки хромосом, специфичные для Y- или W-хромосомы (Cortez et al. 2014).

Большинство различий между полами в последовательностях ДНК и числе копий функциональных генов накапливается в районах подавления рекомбинации. Поэтому методы, основанные на секвенировании и сравнении геномной ДНК разных полов, довольно часто упускают генетический материал, входящий в состав псевдоаутосомного района. Разрешить эту проблему позволяют качественные сборки геномов до хромосомного уровня, однако в случае гетероморфных половых хромосом сборка вырожденного гомолога может вызывать сложности из-за избыточного накопления повторяющихся элементов. Поэтому часто эталонные сборки геномов производят для гомогаметного пола (Deakin et al. 2019).

Другим эффективным подходом исследования генетического состава половых хромосом является метод секвенирования ДНК-библиотек, специфичных для отдельных хромосом (Single Chromosome Sequencing, ChromSeq). В этом случае ДНК-библиотеки получают с помощью хромосомного сортирования или микродиссекции, а их специфичность подтверждают с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Последовательности ДНК, полученные в результате секвенирования, можно использовать для сборки хромосом *de novo*, либо сравнить с уже опубликованными геномными сборками для обнаружения гомологичных районов (Iannucci et al. 2021).

Для исследования гетероморфных половых хромосом у видов с неопубликованными геномами также могут быть полезны цитогенетические методы, основанные на картировании с помощью FISH уже известных зондов, специфичных для отдельных хромосом или ВАС-клонов (bacterial artificial chromosomes) половых хромосом родственных видов. Данный подход успешно использован для изучения хромосомных перестроек X-хромосомы парнокопытных (Proskuryakova et al. 2017) или W-хромосомы птиц (Bellott et al. 2017).

В случае гетероморфных половых хромосом с выявляемыми цитологически различиями помимо исследования их генетического состава также актуально изучение механизмов дозовой компенсации и гетерохроматинизации. Современные

исследования дозовой компенсации часто основываются на совместном сравнительном анализе данных секвенирования геномов и транскриптомов у разных полов, а также на изучении основных эпигенетических модификаций хроматина (например, с помощью метода ChiP-seq) (Marin et al. 2017).

Как уже обсуждалось выше, одним из отличительных признаков вырождения половых хромосом является накопление повторяющихся элементов на гетероморфном гомологе. Обычно в геномах выделяют два типа организации повторяющихся ДНК: tandemно организованные повторы и рассеянные элементы (обзор: Biscotti et al. 2015). Tandemно организованная ДНК формирует протяженные массивы, в которых мономеры повторов располагаются друг за другом. К таким типам последовательностей относят микросателлиты (длина мономера составляет от 1 до 10 п. н.), мини- и макросателлиты (длина мономера до 100 п. н. и более 100 п. н., соответственно), а также мультигенные семейства генов. К рассеянным повторам относят различные типы мобильных генетических элементов (МГЭ), такие как ДНК-транспозоны и ретротранспозоны (обзор: Biscotti et al. 2015). Определить основные типы повторяющейся ДНК в рамках гетерохроматиновых районов половых хромосом можно путем сравнения их представленности в геномной ДНК разных полов с помощью биоинформатических подходов (Chalopin et al. 2015, Jesionek et al. 2021). Например, программы RepeatExplorer (Novák et al. 2013), TAREAN (Novák et al. 2017) и Tandem Repeat Finder (Benson 1999) широко используются для поиска и аннотации tandemно организованной сателлитной ДНК. Принадлежность обнаруженных последовательностей мономеров сатДНК гетерохроматиновым участкам половых хромосом может быть определена с помощью проведения FISH на метафазных хромосомах гетерогаметного пола. Существует множество программ, направленных на поиск рассеянных повторов в геномной ДНК, например, таких как Repeat Modeler (Flynn et al. 2020). Поскольку МГЭ часто хаотично распределены по геному, определение их хромосомной локализации с помощью FISH не всегда эффективно.

1.6. Цитогенетические и геномные исследования рептилий

Современные рептилии – класс позвоночных животных, который относится к амниотам и объединяет современных черепах, крокодилов, клювоголовых (гаттерии) и чешуйчатых (ящерицы и змеи) (Рис. 2).

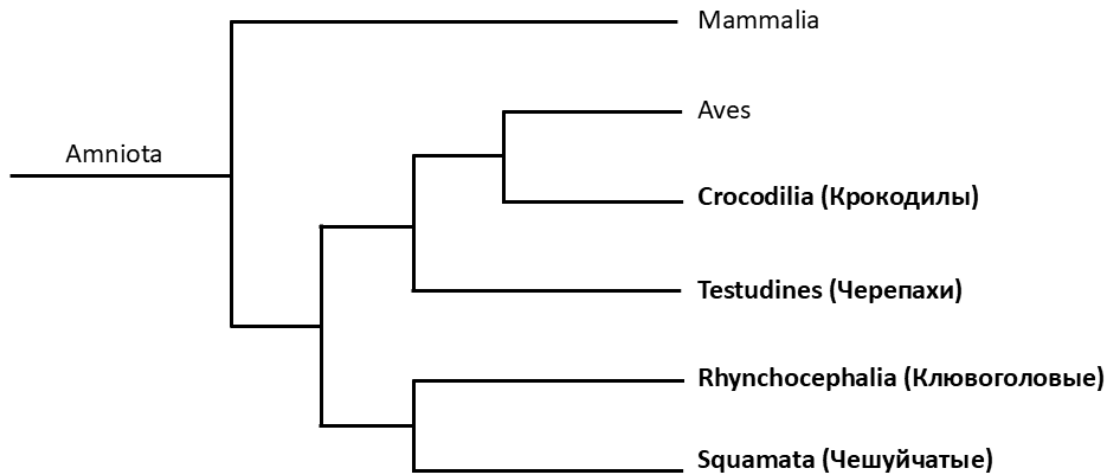


Рисунок 2. Положение основных групп рептилий (выделены жирным шрифтом) на филогенетическом древе амниот. Кладограмма построена в соответствии с Lee et al., 2013.

Рептилии считаются парафилетическим таксоном, поскольку они дали начало птицам, которых традиционно выделяют в отдельный класс (Modesto and Anderson 2004). Филогенетически рептилии (включая птиц) отделились от млекопитающих около 320 млн лет назад; примерно 280 млн лет назад рептилии разделились на две клады: архозавры (птицы и крокодилы) и лепидозавры (чешуйчатые и клювоголовые) (Alföldi et al. 2011). Долгое время предполагалось, что черепахи занимают базальное положение относительно остальных рептилий, однако сейчас их принято считать сестринской группой для птиц и крокодилов (Chiari et al. 2012, Lee 2013).

Рептилии являются не только филогенетически, но и кариотипически разнородной группой. Организация геномов представителей некоторых отрядов и подотрядов (например, таких, как змеи и ящерицы) сходна с анамниями (рыбы и земноводные), тогда как геномы других (черепахи и крокодилы) - общие черты с гомойотермными животными (Olmo 2008).

Различия между разнымикладами рептилий начинаются на геномном уровне. Например, известно, что геномы крокодилов и черепах, также как и геномы птиц и млекопитающих, имеют изохорную структуру организации (Costantini et al. 2009). Изохорами принято называть протяженные районы генома с определенным содержанием GC-оснований (Bernardi 1993). Районы, богатые GC-основаниями, являются эухроматиновыми и содержат много генов, в них более интенсивно происходят рекомбинационные события. Районы, обедненные GC-основаниями, содержат мало генов и, как правило, гетерохроматинизируются (Eyre-Walker and Hurst 2001). У чешуйчатых (Squamata), как и у ряда рыб и амфибий, изохорная структура генома менее выражена (Costantini et al. 2009). Исследования состава генома североамериканского красногорлого анолиса (*Anolis carolinensis*) выявили, что его гомогенность по GC-составу (Fujita et al. 2011). Однако GC-состав по позициям третьего кодона белок-кодирующих последовательностей (GC3) и распределение этих нуклеотидов в геноме североамериканского красногорлого анолиса сходны с таковыми у птиц и млекопитающих (Figuet et al. 2015).

На хромосомном уровне крупные группы рептилий различаются по типу организации кариотипа. Среди них встречаются и унимодальные, и бимодальные типы организации кариотипов. В составе бимодальных кариотипов можно выделить два типа хромосом, которые отличаются друг от друга размерами: макрохромосомы и микрохромосомы. Известно, что бимодальные кариотипы являлись предковыми для большинства тетрапод, а унимодальные произошли в результате слияний микрохромосом между собой и с макрохромосомами (Morescalchi 1977). Для большинства чешуйчатых и черепах характерны бимодальные кариотипы, а представители семейства настоящие ящерицы (Lacertidae), отряда крокодилы (Crocodilia) и инфраотряда gekkoобразные (Gekkota) имеют независимо сформировавшиеся унимодальные кариотипы (Uno et al. 2012).

Исследования, посвященные эволюции кариотипов внутри крупных клад, таких, как семейства и близкие группы семейств, показали низкую скорость изменения кариотипов рептилий (Trifonov et al. 2011, Srikulnath et al. 2013, 2014, 2015, Pokorná et al. 2015). Множество видов, разнообразных по внешнему виду, образу жизни и системе определения пола, могут иметь сходное число и морфологию хромосом. Так, М. Покорна с соавторами с помощью хромосомного

пейнтинга и локализации генов при помощи метода FISH показали консервативность большинства хромосом для представителей инфраотряда гекконообразные (Pokorná et al. 2015). Несмотря на то, что морфология некоторых хромосом могла меняться в результате робертсоновских и tandemных слияний и разрывов, генный состав хромосомных плеч и отдельных хромосом гекконообразных оставался консервативным на протяжении десятков миллионов лет эволюции.

Аналогичные результаты, но для более протяженных эволюционных периодов, были показаны для клады Toxicofera, которая включает в себя змей (Serpentes), игуанообразных (Agamidae, Iguanidae, Chamelionidae), варанов (Varanidae) и другие более мелкие группы чешуйчатых (Srikulnath et al. 2013, 2014, 2015).

Геномы рептилий являются наименее изученными по сравнению с геномами представителей других классов. Продолжительное время единственным видом, геном которого был секвенирован, оставался североамериканский красногорлый анолис (*A. carolinensis*) (Alföldi et al. 2011), однако в последние годы увеличилось число видов, геномы которых секвенированы. По данным на 10.06.2024 геномы опубликованы для 174 видов рептилий, при для 49 из них геномы собраны до хромосомного уровня. Большинство сборок останавливаются на уровне скаффолдов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>).

В отличие от млекопитающих и птиц, для которых описаны эволюционно стабильные половые хромосомы, для рептилий характерно удивительное разнообразие механизмов определения пола. В рамках крупных семейств могут встречаться виды как со средовым (ESD), так и с генетическим (GSD) определением пола, в том числе с дифференцированными половыми хромосомами систем XY и ZW.

ESD описано для всех крокодилов, большинства черепах, гаттерий и некоторых чешуйчатых. Основным фактором среды, влияющим на определение пола у рептилий, является температура инкубации зародышей. Температура, при которой развивается более 90% самок, может отличаться в диапазоне до 5 °C от температуры, при которой развивается более 90 % самцов (Ciofi and Swingland 1997). У многих черепах инкубация при повышенной температуре приводит к

формированию самок, в то время как при пониженной температуре развиваются самцы (Standora and Spotila 1985). У некоторых ящериц и аллигаторов, напротив, самцы развиваются при повышенной температуре, а самки – при пониженной (Lang and Andrews 1994).

Рептилии характеризуются богатым разнообразием способов GDS. Для большинства змей, за исключением питонов и удавов с гомоморфными половыми хромосомами системы XY, описаны половые хромосомы системы ZW, которые имеют общее происхождение (Rovatsos et al. 2015). Несмотря на то, что у многих черепах пол зависит от температуры инкубации зародышей, у некоторых видов обнаружены половые хромосомы систем XY и ZW (Kawagoshi et al. 2009, Mazzoleni et al. 2020).

Среди ящериц с GDS описаны виды как с гомоморфными половыми хромосомами, так и с гетероморфными половыми хромосомами систем XY или ZW, а также системы множественных половых хромосом (Alam et al. 2018). Стоит отметить, что наибольшее разнообразие систем определения пола наблюдается у представителей инфраотряда gekkoniformes. Например, в рамках семейства Gekkonidae встречается температурозависимое определение пола, а также системы половых хромосом XY, ZW. Исследовано по меньшей мере восемь переходов систем определения пола у представителей данного инфраотряда (Gamble 2010).

Для некоторых видов рептилий описано смешанное определение пола: в кариотипах таких видов обнаружены половые хромосомы, однако при определенных условиях пол зародыша может определяться температурой инкубации. Например, у сцинков рода *Acritoscincus* (альтернативное название *Bassiana*) описаны половые хромосомы системы XY. После инкубации зародышей при очень низкой температуре все особи являются самцами, включая особей с генотипом XX. Предполагается, что в данном случае дозочувствительный ген-определитель пола располагается на X-хромосоме, а его белковые продукты не работают при низких температурах (Radder et al. 2008).

Гетероморфные половые хромосомы описаны для многих видов рептилий. При этом вырождающиеся гомологи могут характеризоваться накоплением сателлитных последовательностей, теломерных повторов, генов рРНК, псевдогенов (обзор: Scharl et al. 2016). Накопление повторяющихся элементов может оказывать

влияние на механизмы определения пола. Наиболее яркий пример подобного явления описан у бородатых агам (*Pogona vitticeps*) (Zhang et al. 2022). Для данного вида характерны гетероморфные половые хромосомы системы ZZ/ZW, при этом на W-хромосоме присутствуют гетерохроматиновые области, содержащих повторяющиеся элементы, благодаря чему она легко идентифицируется при проведении С-окрашивания (Ezaz et al. 2005). Однако наиболее вероятный кандидат на роль гена-определителя пола у бородатых агам (ген *nr5a1*, кодирующий стероидогенный фактор SF1) обнаруживается в неизменном состоянии в последовательности ДНК у обоих гомологов (Zhang et al. 2022). Разница между полами наблюдается на уровне транскриптомов: с W-хромосомы транскрибируются укороченные транскрипты, с которых транслируются изоформы белка SF1, ингибирующие формирование семенников. Предполагается, что эпигенетические модификации, влияющие на конфигурацию гетерохроматиновой W-хромосомы у бородатой агамы, приводят к изменению конформации первичного транскрипта гена *nr5a1* и формированию изоформ белка SF1 (Zhang et al. 2022). В тоже время, для бородатых агам показано смешанное определение пола, поскольку при инкубации яиц в нормальном температурном диапазоне соотношение полов составляет 1:1, а при более высоких температурах все вылупившиеся детеныши будут самками, часть которых будет иметь генотип ZZ (Ezaz et al. 2005).

Поскольку рептилии продолжительное время оставались вне интересов крупных геномных исследований, информации о разнообразии генов-определителей пола для данного таксона получено было мало. Помимо бородатых агам, предполагаемые гены-определители пола описаны для ограниченного количества видов, а функциональные тесты, подтверждающие или опровергающие роль предполагаемых локусов в запуске каскада определения пола, пока не проводились (Zhu et al. 2022, Pinto et al. 2023).

Благодаря разнообразию систем определения пола чешуйчатые являются интересными модельными объектами для изучения различных аспектов эволюции половых хромосом. В нашем исследовании мы изучали представителей двух крупных инфраотрядов чешуйчатых: игуанообразных и гекконообразных.

1.6.1. Инфраотряд игуанообразные

Игуаны являются второй по численности группой чешуйчатых рептилий после гекконов: в настоящее время описано 2081 вид (<http://www.reptile-database.org/>, по данным на 13.05.2024). Инфраотряд состоит из двух крупных сестринских клад: Acrodonta и Pleurodonta. Представители клады Acrodonta распространены исключительно в Старом Свете и формируют семейства Agamidae и Chamaeleonidae. Представители клады Pleurodonta встречаются только в странах Нового Света и на Мадагаскаре, и делятся на двенадцать семейств (Corytophanidae, Crotaphytidae, Dactyloidae, Hoplocercidae, Iguanidae, Leiocephalidae, Leiosauridae, Liolaemidae, Opluridae, Phrynosomatidae, Polychrotidae, Tropiduridae) (Townsend et al. 2011). Большинство игуанообразных ведут дневной образ жизни.

Предполагается, что кариотип общего предка игуанообразных состоял из 36 хромосом и включал 6 пар метацентрических макрохромосом и 12 пар микрохромосом (Gorman 1973). Подобный кариотип встречается у многих современных видов агам и игуан. В то же время число хромосом в кариотипах игуанообразных может варьировать от $2n=20$ до $2n=48$ (<http://chromorep.univpm.it>). Секвенированы геномы для 25 видов игуанообразных, из них для восьми получены хромосомные сборки (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly>, по данным на 13.05.2024).

Представители клады Acrodonta характеризуются разнообразием способов определения пола. Среди них встречаются виды как с TSD, так и с описанными гетероморфными половыми хромосомами систем XX/XY, ZZ/ZW (Ezaz et al. 2005, Nielsen et al. 2018, Rovatsos et al. 2019b). Для большинства представителей клады Pleurodonta описаны гетероморфные половые хромосомы системы XY, возраст которых составляет около 73-93 млн лет. По своей морфологии половые хромосомы этой группы рептилий являются микрохромосомами и содержат синтенную группу, соответствующую X-хромосоме североамериканского красногорлого анолиса (гомологична хромосоме 15 курицы, GGA 15), однако размер может варьировать между видами из-за аутосомных транслокаций (Giovannotti et al. 2017, Altmanová et al. 2018). Несмотря на общее происхождение и выраженную дифференцированность половых хромосом игуановых, недавние исследования обнаружили смену половой

хромосомной пары, которая произошла у мексиканского полосатого василиска (*Basiliscus vittatus*) (Corytophanidae, Pleurodonta) (Nielsen et al. 2019).

В данной работе изучены два представителя игуанообразных: заборная малахитовая игуана (*Sceloporus malachiticus*) из семейства Phrynosomatidae (Pleurodonta, Iguania) и йеменский хамелеон (*Chamaeleon calyptratus*) из семейства Chamaeleonidae (Acrodonta, Iguania). Кариотип *S. malachiticus* состоит из 22 метацентрических хромосом, среди которых выделяют 6 пар макрохромосом и 5 пар микрохромосом, образовавшихся в результате слияний микрохромосом предкового кариотипа (Hall 2009). Также для этого вида описаны половые хромосомы системы XY, которые имеют участок гомологии с X-хромосомой североамериканского красногорлого анолиса и увеличены в размерах в результате аутосомных транслокаций (Hall 2009, Rovatsos et al. 2014).

Кариотип йеменского хамелеона включает 12 пар хромосом: 6 пар макрохромосом и 6 пар микрохромосом. Уменьшение числа хромосом по сравнению с предковым кариотипом произошло, как предполагается, в результате робертсоновских слияний между хромосомами (Rovatsos et al. 2017b). Также для йеменского хамелеона были определены гомоморфные половые хромосомы системы XY и подобраны маркеры, специфичные для самцов, однако, до сих пор остается неясным, какая из хромосомных пар является половой (Nielsen et al. 2018).

1.6.2. Инфраотряд gekkoобразные

Гекконы являются богатым видами таксоном ящериц: описано около 2316 видов (<http://www.reptile-database.org/>, по данным на 13.05. 2024). Несмотря на то, что гекконы отделились от остальных чешуйчатых около 200 млн лет назад, эта кладка является монофилетической (Zheng and Wiens 2016). Инфраотряд состоит из семи семейств (Gekkonidae, Phyllodactylidae, Sphaerodactylidae, Eublepharidae, Diplodactylidae, Carphodactylidae, Pygopodidae), представители которых распространены в тропических и субтропических областях Старого и Нового Света (Pyron et al. 2013). Большинство гекконов активны в темное время суток, однако иногда встречаются виды, ведущие дневной образ жизни (Gamble et al. 2015a).

Диплоидное число хромосом в кариотипах gekkoобразных может варьировать от $2n=16$ до $2n=46$ (de Smet 1981, Schmid et al. 1994), однако у

большинства изученных видов $2n=38-42$ (Olmo 1986). Как и для игуанообразных, для гекконов описан предполагаемый кариотип предка, состоящий из 38 постепенно уменьшающихся в размере акроцентрических хромосом (Gorman 1973, Pokorná et al. 2010). Кариотипы современных гекконообразных отличаются от предкового кариотипа малым количеством хромосомных перестроек, таких как инверсии, хромосомные слияния и транслокации (Trifonov et al. 2011, Pokorná et al. 2015).

В последнее время возрастает интерес к изучению гекконообразных на геномном уровне. По данным на 13.05.2024 секвенированы геномы девяти видов, а сборки геномов до хромосомного уровня доступны для четырех видов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>).

Семейство Eublepharidae характеризуется разнообразием систем определения пола, среди ранее исследованных представителей этого семейства встречаются виды как TSD, так и с описанными половыми хромосомами системы XX/XY (Keating et al. 2022). В данной работе изучены два представителя Eublepharidae: юкатанский полосатый геккон (*Coleonyx elegans*) и центральноамериканский геккон (*Coleonyx mitratus*). Кариотип *C. elegans* состоит из 14 пар акроцентрических аутосом и множественных половых хромосом $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, а кариотип *C. mitratus* не был описан ранее. Известно, что на X_1 -хромосоме *C. elegans* локализуются кластеры рибосомной ДНК. Предполагается, что система множественных половых хромосом этого вида возникла в результате Робертсоновского слияния предковой половой хромосомы (соответствующей X_1 -хромосоме) с аутосомой (Pokorná et al. 2010). Ранее генетический состав половых хромосом *C. elegans* уже пытались исследовать с помощью сравнения секвенированных геномов самца и самки. Авторы статьи обнаружили около 200 X-сцепленных генов, которые у самцов находятся в гемизиготном состоянии. Для 57 X-сцепленных генов являются ортологами генов курицы, расположенными на хромосомах 1, 6 и 11 (Pensabene et al. 2020). Авторы предположили, что половые хромосомы *C. mitratus* должны иметь сходный генетический состав с таковыми у *C. elegans*, однако цитогенетических подтверждений этому не было. Генетический состав псевдоаутосомного района и соответствие уже найденных синтенных групп генов конкретным X-хромосомам также не изучены.

1.7. Заключение по обзору литературы

Половые хромосомы являются одной из наиболее динамично изменяющихся частей эукариотических геномов. Происхождение и эволюция половых хромосом служат предметом множества научных споров. До сих пор остается неясным, является ли частое вовлечение одних и тех же синтенных групп в формирование половых хромосом случайным процессом, или же наличие определенных генов делает их благоприятной генетической основой для половых хромосом. Эволюционные процессы, сопровождающие деградацию половых хромосом, также остаются мало изученными.

Инфраотряды гуанообразные и гекконообразные являются одними из самых многочисленных таксонов среди чешуйчатых, которые характеризуются удивительным разнообразием систем определения пола. Для многих видов описаны половые хромосомы разной морфологии и степени вырожденности. Поэтому представители этих инфраотрядов являются перспективными объектами для исследования эволюции половых хромосом.

Большинство методов изучения половых хромосом, основанных на секвенировании и сравнении геномной ДНК разных полов, позволяют исследовать участки генома, находящиеся в гемизиготном состоянии. Однако подобные подходы не позволяют определить генетический состав псевдоаутосомных районов и исследовать процесс гетерохроматинизации деградирующих гомологов. Использование метода ChromSeq, основанного на секвенировании отдельных хромосом, в совокупности с поиском и локализацией наиболее распространенных последовательностей сателлитной ДНК позволяет проводить расширенный анализ генетического состава половых хромосом.

Таким образом, изучение генетического состава половых хромосом игуанообразных и гекконообразных с помощью сочетания цитогенетических и биоинформатических подходов позволит дополнить наши знания о том, как происходит эволюция половых хромосом у позвоночных животных и какие факторы влияют на данные процессы.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы

Список использованных в работе реактивов, рабочих растворов, конъюгатов, антибиотиков и антимикотиков, культуральных сред и коммерческих наборов приведен в **Приложении 1**.

2.2. Праймеры

Праймеры, использованные для амплификации и мечения последовательностей ДНК с помощью ПЦР, перечислены в **Приложении 1 (Таблицы 1-3)**.

2.3. Животные

Для получения первичных клеточных культур была использована взрослая особь (самец) заборной малахитовой игуаны (*Sceloporus malachiticus*), купленная в зоомагазине “АкваЛого”, и молодая особь центральноамериканского геккона (*Coleonyx mitratus*) из частной коллекции, предоставленная Л. С. Лисачевой.

2.4. Клеточные культуры

Клеточные культуры самки *Coleonyx elegans* и самца *Chamaeleo calypttratus* предоставлены Кембриджским ресурсным центром сравнительной геномики (Факультет ветеринарной медицины, Кембриджский университет, Великобритания). Первичные культуры фибробластов и суспензии фиксированных метафазных клеток самца *Sceloporus malachiticus*, а также суспензии метафазных клеток *C. calypttratus* получены в лаборатории цитогенетики животных (Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия) С. А. Романенко и А. В. Румянцевым. Автор самостоятельно получила суспензии фиксированных метафазных клеток из клеточных культур самки *C. elegans*, а также первичную культуру фибробластов и суспензии метафазных хромосом самца *C. mitratus*.

В качестве источника фибробластов *S. malachiticus* и *C. mitratus* использовали ткани легкого и межреберных хрящей. Для этого кусочки тканей измельчали и

инкубировали в смеси гиалуронидазы (1 мг/мл) и коллагеназы (1 мг/мл), 15% эмбриональной бычьей сыворотки в ростовой среде с антибиотиками: ампициллином (100 мг/л), стрептомицином (100 мг/л); и антимикотиком – амфотерицином В (1х=2.5 мг/л) в течение 24 часов при 37 °С. После инкубации суспензию клеток центрифугировали, к осадку добавляли ростовую среду и переносили в культуральный флакон (Stanyon and Galleni 1991, Romanenko et al. 2015).

Для культивирования фибробластов использовали среду α MEM с добавлением 15% эмбриональной бычьей сыворотки и комбинации антибиотиков (ампициллина (1х=100 мг/л) и стрептомицина (1х=100 мг/л)) и антимикотика – амфотерицина В (1х=2.5 мг/л). В ростовую среду культуры *C. elegans* добавляли 10% от объема среды AmnioMAX-II complete для стимуляции роста. Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе при 30°C и содержании CO₂ 5%. Смена среды проводилась раз в 2-3 дня, по необходимости клетки пересевали с использованием раствора для снятия клеток.

Полученные клеточные линии были депонированы в «Криобанк культур клеток» ИМКБ СО РАН, а также использовались для приготовления суспензий фиксированных метафазных клеток. Для криоконсервации использовали ранние пассажы клеточных культур на стадии активного роста. Из культурального флакона клетки снимались с использованием раствора для снятия клеток. Действие трипсина (1-3 минуты) останавливали, добавляя буферный раствор DPBS, а затем полученную суспензию центрифугировали (5 минут при 800g) для осаждения клеток. К осадку добавляли эмбриональную бычью сыворотку с 10% содержанием DMSO, который после суспендирования помещался в криопробирки. Криопробирки с фибробластами охлаждали до -70 °С с использованием ступенчатого криоконтейнера в течение 24 часов, а затем помещали в сосуды Дьюара, наполненные жидким азотом.

2.5. Приготовление суспензий фиксированных метафазных клеток

Для получения максимального количества клеток на стадии метафазы митоза во флаконы с растущими клетками на ночь (порядка 16 часов), на 10 мл культуральной среды добавляли 50 мкл колцемида (10 мкг/мл). На следующее утро, за три часа до фиксации во флаконы с клетками добавляли 50 мкл колцемида (10

мкг/мл) и 70 мкл бромистого этидия (0.5 мг/мл). По окончании культивирования клетки снимали с помощью раствора для снятия клеток, полученную суспензию переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали 5 минут при 800 g. После центрифугирования супернатант удаляли, а осадок разводили в 7-8 мл гипотонического раствора (0.075 M KCl, 2% FBS) и инкубировали при 30°C в течение 60 минут. Далее проводили предфиксацию. Для этого в суспензию добавляли несколько капель метанол-уксусного фиксатора (3:1), охлажденного до -20°C, затем суспензию выдерживали при +4°C в течение 10-12 минут и центрифугировали. Супернатант удаляли, а к полученному осадку добавляли 2-3 мл охлажденного фиксатора без перемешивания. Фиксацию проводили в течение 30 минут при -20°C. После проводили очередное центрифугирование и смену фиксатора с ресуспендированием осадка. Для проверки качества суспензии изготавливали несколько пробных препаратов.

2.6. С-окрашивание с использованием флуоресцентных красителей

Для выявления районов конститутивного гетерохроматина у *S. malachiticus* и *C. mitatus* проводили С-предобработку (Sumner 1972), но окрашивали препараты не красителем Гимза, а флуоресцентными красителями DAPI и хромомицином А3. Препараты метафазных хромосом выдерживали 20 минут в 0.2 N соляной кислоте, после 4 минуты в насыщенном растворе гидроксида бария при 55 °C. Затем препараты 60 минут выдерживали в 2×SSC при 60 °C. Для удаления остатков солей препарат промывали в дистиллированной воде, высушивали, а после наносили раствор среды для иммунофлуоресценции (EverBrite) с красителями DAPI (50 мкг/мл) и хромомицин А3 (20 мкг/мл), накрывали чистым покровным стеклом и проводили микроскопирование.

2.7. Выделение ДНК

Геномную ДНК *C. mitratus* выделяли из тканей стандартным фенол-хлороформным методом (Sambrook and Russell 2006). Для *S. malachiticus* и *C. calyptratus* геномную ДНК выделяли из клеточных культур с помощью набора реагентов GeneJET Genomic DNA Purification Kit «Thermo Scientific». Часть выделенной ДНК была фрагментирована прибором BANELIN Sonopuls на частоте

22 КГц до размера 100-200 п.н., чтобы использовать ее для супрессии повторяющихся последовательностей в пробах при проведении FISH. Концентрацию ДНК проверяли при помощи NanoDrop 2000C.

2.8. Получение специфичных хромосомных ДНК-библиотек

ДНК-библиотеки, специфичные для хромосом *S. malachiticus*, получены В. А. Трифоновым и Дж. Перейра с использованием высокоскоростного сортировщика клеток Mo-Flo® (Beckman Coulter) в Кембриджском ресурсном центре сравнительной геномики (Факультет ветеринарной медицины, Кембриджский университет, Великобритания), как описано ранее (Yang et al. 1995). Для *C. elegans* и *C. calypttratus* наборы сортированных хромосомных ДНК-библиотек были любезно предоставлены Л. Кратохвилем (Карлов университет, Прага, Чехия) и М. Джиованнотти (Политехнический университет Марке, Анкона, Италия), соответственно.

2.9. ПЦР-картирование Y-специфичных RAD-seq маркеров *C. calypttratus*

Для того, чтобы определить пару хромосом, несущую Y-специфичные RAD-seq маркеры *C. calypttratus*, сортировочные ДНК-библиотеки этого вида использовались в качестве ДНК-матрицы для ПЦР с праймерами к пяти Y-специфичным маркерам (M2, M3, M11, M12, M13), выявленных с помощью RAD-seq. Последовательности праймеров и условия ПЦР описаны в статье Нильсона с соавторами (Nielsen et al. 2018). Результаты ПЦР проверяли с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле.

2.10. Получение зондов для FISH на основе хромосомоспецифичных ДНК-библиотек

Наработку и мечение ДНК для гибридизационных зондов проводили при помощи DOP-ПЦР с использованием праймера 6-MW (5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3') (Telenius et al. 1992). ПЦР-смесь состояла из буфера для Taq-полимеразы (1x), 2.5мМ MgCl₂, 1 мкМ праймера, 250 мкМ dNTP, 1 е.а. Taq-полимеразы, 80 нг сортировочных ДНК-библиотек. Для мечения зондов концентрацию dTTP сокращали до 200 мкМ и в реакционную смесь добавляли модифицированные основания: биотин-11-dUTP (50мкМ) или дигоксигенин-11-dUTP (50мкМ).

Программа ПЦР была одинаковой для наработки и мечения: начальная денатурация при 95 °С в течение 3 минут, 30 циклов (15 секунд при 94 °С, 15 секунд при 55 °С, 1 минута при 72 °С) и финальной элонгации при 72 °С в течение 5 минут.

После проведения ПЦР качество полученных ДНК-библиотек проверяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле.

2.11. Получение зондов, содержащих сатДНК, гены рибосомной РНК и теломерные повторы

Для локализации генов 45pРНК использовали плазмидную ДНК (pHr13), содержащую фрагменты 18S, 28S и полную последовательность 5.8S рРНК, ITS1 и ITS2 (Maden et al. 1987). Теломерную ДНК синтезировали с использованием безматричного синтеза с праймерами (TTAGGG)₅ и (CCCTAA)₅ (Ijdo et al. 1991). Мечение зондов проводили с использованием набора реагентов для ферментативной фрагментации ДНК «FTP-Display» (ДНК-Дисплей): 50 мкл реакционной смеси содержали 80 нг ДНК-матрицы, 50 мкМ дигоксигенин-11-dUTP и биотин-11-dUTP. Протокол мечения включал фрагментацию при 37 °С в течение 90 минут, восстановление и аденилирование при 70 °С в течение 20 минут и охлаждение до 10 °С в течение 10 минут.

Описание последовательностей сатДНК приведено ниже. Амплификацию и мечение зондов сатДНК проводили с помощью ПЦР с использованием праймеров, представленных в **Приложении 1**. Подбор праймеров осуществлялся с помощью программы GeneRunner (версия 6.5.52×64 Beta). Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала буфер для Taq-полимеразы (1x), 2.5 mM MgCl₂, по 1 мкМ прямого и обратного праймеров, 250 мкМ dNTP, 1 е.а. Taq-полимеразы, 80 нг геномной ДНК. Для мечения зондов концентрацию dTTP сокращали до 200 мкМ и в реакционную смесь добавляли модифицированные основания: биотин-11-dUTP (50мкМ) или дигоксигенин-11-dUTP (50мкМ). Протокол ПЦР включал денатурацию при 95 °С в течение 3 минут, 30 циклов денатурации при 95 °С в течение 15 секунд, отжиг праймеров (температура отжига указана в **Приложении 1**) в течение 30 секунд и элонгацию при 72 °С в течение 1 минуты. Для оценки качества полученных зондов проводился электрофорез в 1% агарозном геле.

2.12. Флуоресцентная гибридизация *in situ*

Для проверки специфичности хромосомных библиотек проводили FISH с использованием полученных зондов на метафазных пластинках того же вида. FISH выполняли по стандартному протоколу, описанному Т. Лиром с соавторами, с модификациями (Liehr et al. 2016).

Препараты метафазных хромосом приготавливали в камере с влажностью 50-60%. Указанная влажность достигалась путем нагревания водяной бани до 60 °С. На влажные охлажденные предметные стекла наносили каплю клеточной суспензии объемом около 20 мкл, препарат помещали на подставку в водяной бане для улучшения распластывания хромосом, а на каплю суспензии с клетками добавляли 50 мкл фиксатора. Для проверки качества препаратов использовали световой микроскоп с фазовым контрастом.

Далее препараты прогревали в течении 30 минут при температуре 60 °С, а после обрабатывали раствором пепсина (0.001% пепсин в 0.01М HCl) 5 минут при комнатной температуре. Для остановки действия пепсина препараты инкубировали 5 минут в растворе 2×SSC.

ДНК зондов денатурировали при 96°С в течение 5 минут, а затем выдерживали 40 минут при 42°С для ренатурации повторяющихся последовательностей. В качестве супрессора повторяющихся последовательностей использовали фрагментированную геномную ДНК исследуемого вида, выделенную ранее с помощью фенол-хлороформного метода (Sambrook and Russell 2006).

Денатурацию метафазных хромосом проводили на водяной бане в 70% растворе формамида в 2×SSC 1 минуту при 70°С, затем препараты проводили по серии охлажденных до -20 °С спиртов (70%-80%-96%). На высушенные препараты наносили по 15 мкл предварительно подготовленного зонда в гибридизационной смеси, накрывали покровным стеклом и заклеивали резиновым клеем для предотвращения высыхания.

Гибридизацию проводили 18 часов при температуре 42°С. После гибридизации препараты отмывали 1 минуту в 2×SSC при комнатной температуре, затем по 5 минут при 50 °С в серии растворов SSC (0.4×SSC, 0.2×SSC, 0.2×SSC). Для блокирования неспецифического связывания антител на препараты наносили

блокирующий раствор ($4\times\text{SSC}$, 5% сухого обезжиренного молока) и инкубировали в течение 20 минут при 42°C .

Выявление ДНК-зондов, меченных биотином, проводилось в несколько этапов. На первом этапе на препарат наносили раствор авидина, конъюгированного с FITC (2.5 мг/мл), затем раствор биотинилированных антител против авидина (2.5 мг/мл), а после снова раствор авидина, конъюгированного с FITC (2.5 мг/мл). После нанесения каждого из растворов препарат инкубировали при 42°C в течение 30 мин, а избыток антител отмывали при 46°C в $4\times\text{SSCT}$ 3 раза по 5 мин. Выявление зондов, меченных дигоксигенином, проводили с использованием раствора Anti-digoxigenin-Cy3 (1,5 мг/мл) при 42°C в течение 30 мин. Избыток антител отмывали при 40°C в $4\times\text{SSCT}$ 3 раза по 5 мин. Далее препараты ополаскивали в $0.2\times\text{SSC}$, проводили по серии спиртов (70%-80%-96%) и высушивали. На сухие стекла наносили среду для иммунофлуоресценции с красителем DAPI (Vector Laboratories) и накрывали чистыми покровными стеклами.

Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе BX53 (Olympus, Япония), снабженном CCD-видеокамерой JenOptic (JENOPTIK Industrial Metrology Germany, Германия). Для обработки первичных изображений использовалось программное обеспечение VideoTest-FISH (ВидеоТест). Яркость и контраст изображений редактировались с помощью Corel PaintShop Pro X2 (Corel).

2.13. Секвенирование и анализ данных

Хромосомоспецифичные ДНК-библиотеки для всех видов, геномная ДНК *S. malachiticus* и *C. mitratus* были подготовлены для секвенирования с использованием набора TruSeq Nano DNA Prep Kit для библиотек низкой пропускной способности (Illumina). Секвенирование в режиме попарных прочтений проводили на платформе Illumina MiSeq с использованием набора реагентов v2, 600 циклов на базе ЦКП «Молекулярная и клеточная биология» ИМКБ СО РАН и ЦКП «Геномика» СО РАН. Средняя длина полученных прочтений составила 300 п. н.

Геномная ДНК *C. calyptratus* была приготовлена с помощью набора MGIEasy Universal DNA Library Prep Set (MGI) для секвенирования на платформе MGI на базе ЦКП «Геномика» СО РАН. Секвенирование в режиме попарных прочтений проводилось с использованием набора DNBSEQ-G400RS High-throughput

Sequencing Set (FCL PE100) на базе ЦКП «Геномика» СО РАН. Средняя длина полученных прочтений составила 200 п. н.

Полученные последовательности ДНК были депонированы в базу данных NCBI SRA под следующими номерами: PRJNA616430 - хромосомоспецифичные ДНК-библиотеки *S. malachiticus*, PRJNA832590 - хромосомоспецифичные ДНК-библиотеки *C. calypttratus*, PRJNA945407 - хромосомоспецифичные ДНК-библиотеки *C. elegans*, SRR20394369 - геномная ДНК *C. calypttratus*.

Результаты секвенирования хромосомоспецифичных ДНК-библиотек обрабатывали с использованием конвейера «DOPseq_analyzer» (Makunin и др., 2016). Использовали следующие параметры: для обрезки прочтений «amp» был установлен на «dor», обрезка адаптера Illumina была включена и указаны дополнительные параметры «cutadapt» «-trim-n -minimum-length 20». Обработанные прочтения были сопоставлены с геномами североамериканского красногорлого анолиса (*Anolis carolinensis*, AnoCar2.0), жабовидной плоскорогой ящерицы (*Phrynosoma platyrhinos*, PPL, MUOH_PhPlat_1.1) и пятнистого эubleфары (*Eublepharis macularis*, EMA, Emac_v1.0.1), загруженные из открытой базы данных (www.ensembl.org). Для сопоставления прочтений и геномов использовался алгоритм BWA MEM с параметрами по умолчанию и дополнительными фильтрами (минимальный MAPQ = 20 и минимальная длина выравнивания = 20). Для идентификации синтенных областей использовали скаффолды, соответствующие отдельным хромосомам, и скаффолды размером более 50 кб. Ключевым параметром в выводе «DOPseq_analyzer» для определения синтении между прочтениями, полученными после секвенирования хромосомоспецифичных ДНК-библиотек, и используемыми геномами является *pd_mean*. Данный параметр представляет собой среднее расстояние между позициями скаффолда, которые охватываются показаниями секвенирования. Целевые скаффолды характеризуются более низким значением *pd_mean*, а загрязненные скаффолды характеризуются более высоким значением *pd_mean*.

Поиск наиболее распространенных последовательностей сателлитной ДНК (сатДНК) в геномах исследуемых видов проводили с помощью программы RepeatExplorer2 и инструмента TAREAN (Tandem REpeat ANalyzer) (Novák et al. 2013, 2017). Необработанные прочтения геномной ДНК обрезали с помощью

инструмента fastp для удаления адаптерных и низкокачественных последовательностей, после чего использовали программу RepeatExplorer со стандартными настройками. Результатом поиска являлись консенсусные последовательности сателлитной ДНК, которые определены инструментом TAREAN как предполагаемые кластеры сатДНК с высокой и низкой степенью достоверности. Степень достоверности определяется программой при подсчете таких показателей, как индекс связанности компонентов (the connected component index, C) и индекс полноты пары (the pair completeness index, P) (Novák et al. 2017). Повторяющиеся последовательности ДНК, имеющие параметры $C=1$ и $P=1$, определяются программой как предполагаемые кластеры сатДНК с высокой степенью достоверности, а последовательности со значениями $P > 0.4$, $C > 0.7$ как кластеры сатДНК с низкой степенью достоверности (Novák et al. 2017). Все обнаруженные последовательности предполагаемых кластеров сатДНК использовались для подбора праймеров и последующей локализации на метафазных хромосомах.

Также последовательности сатДНК сравнили с опубликованными ранее последовательностями в открытых базах данных: NCBI BLAST (Johnson et al. 2008) и RepBase (Kohany et al. 2006) для поиска гомологичных последовательностей. Консенсусные последовательности сатДНК *C. calyptratus* были загружены в открытую базу данных GenBank (OP297933-OP297937), консенсусные последовательности сатДНК *S. malachiticus* и *C. mitratus* приведены в **Приложении 2**.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Генетический состав половых хромосом заборной малахитовой игуаны (*Sceloporus malachiticus*, SMA)

3.1.1. Цитогенетический анализ кариотипа *S. malachiticus* и получение ДНК-библиотек, специфичных для половых хромосом

Кариотип заборной малахитовой игуаны ($2n=22$), полученный в данной работе, соответствует описанному ранее (Hall 2009) и состоит из 6 пар макрохромосом и 4 пар микрохромосом, а также X- и Y-хромосом промежуточного размера. При проточной сортировке суспензии метафазных хромосом заборной игуаны был получен проточный кариотип, состоящий из 12 пиков (Рис. 3).

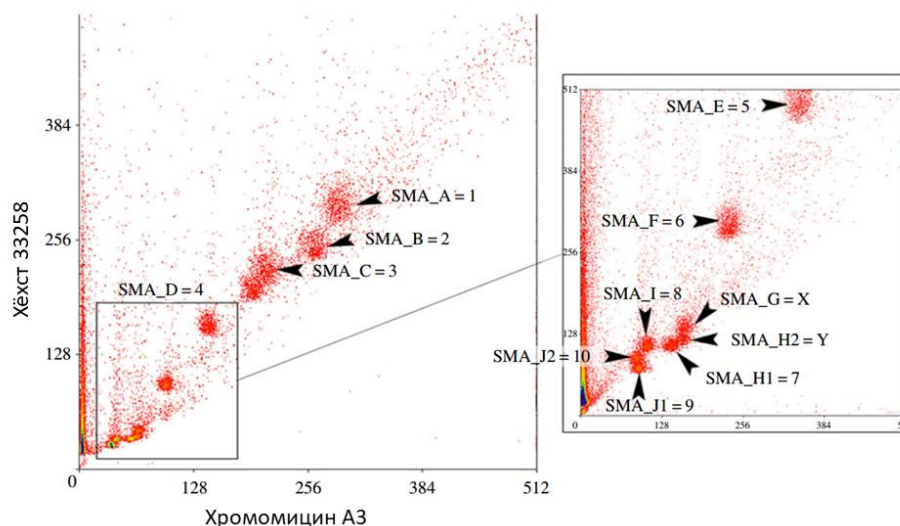


Рисунок 3. Проточный кариотип *S. malachiticus*. Обозначения пиков и их соответствие номерам хромосом указаны стрелками, например, “SMA_D=4” означает, что пик D содержит ДНК хромосомы SMA4. На осях X и Y указана интенсивность флуоресценции флуорохромов хромоциин A3 и Хёхст 33258.

Локализация зондов, созданных на основе сортировочных ДНК-библиотек *S. malachiticus* (SMA), на метафазных хромосомах того же вида показала, что большинство из них являются хромосомоспецифичными. Две ДНК-библиотеки окрашивали половые хромосомы, при этом библиотека, соответствующая SMA_X, не окрашивала DAPI-позитивный блок на Y-хромосоме, а библиотека, соответствующая SMA_Y, не окрашивала участок в перицентромерном районе X-хромосомы (Рис. 4: а, б).

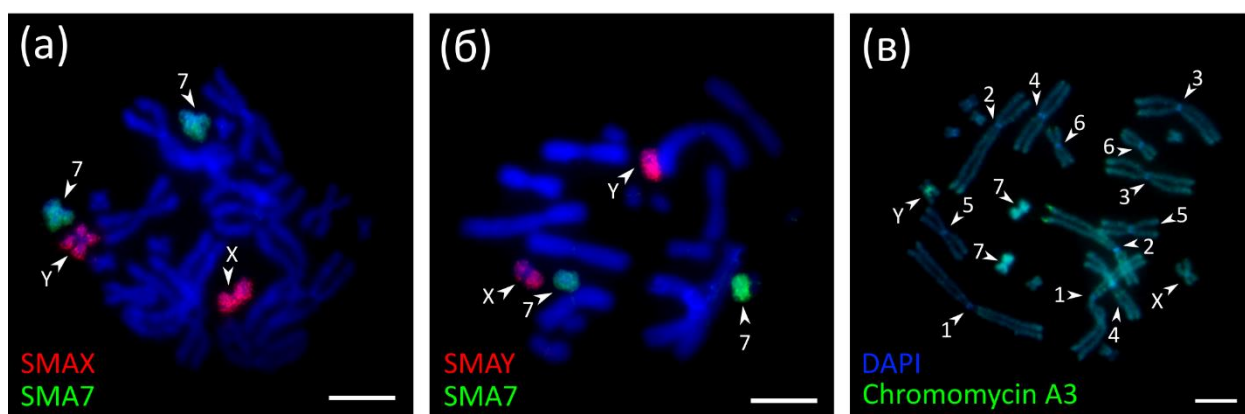


Рисунок 4. (а) FISH с зондами, специфичными для хромосомы X (красный, SMA7) и хромосомы 7 (зеленый, SMA7) на метафазных пластинках самца *S. malachiticus* (SMA). (б) FISH с зондами, специфичными для хромосомы Y (красный, SMA7) и хромосомы 7 (зеленый, SMA7) на метафазных пластинках самца *S. malachiticus* (SMA). (в) С-окрашивание метафазных хромосом самца *Sceloporus malachiticus*. Стрелками отмечены макрохромосомы 1-6, половые хромосомы XY и хромосома 7. Масштаб: 10 мкм.

С-окрашивание с использованием флуоресцентных красителей выявило небольшие DAPI-позитивные районы в перицентромерных участках всех хромосом. Хромомицин А3-позитивные блоки локализовались в перицентромерном районе р-плеча хромосомы 1, дистальных частях р- и q-плеч хромосом 2 и 3, дистальных концах хромосом 4, 5, 6 и XY (Рис. 4: в). Хромомицин А3 окрашивал дистальный конец q-плеча макрохромосомы 2, где расположен локус 45S рДНК (**Приложение 3, Рисунок 1б**). С-позитивные блоки с равномерным распределением флуоресцентных красителей были обнаружены по всей хромосоме 7, а также в перицентромерных районах половых хромосом, при этом блок на Y-хромосоме оказался больше, чем на X-хромосоме.

3.1.2. Сравнительный анализ данных секвенирования ДНК-библиотек *S. malachiticus*

Все ДНК-библиотеки секвенировали на платформе Illumina MiSeq. Количество полученных последовательностей варьировало в пределах 0,11-0,87 млн прочтений на ДНК-библиотеку. Мы сравнили полученные прочтения с опубликованным ранее геномом североамериканского красногорлого анолиса

(*Anolis carolinensis*, ACA, AnoCar2.0) с помощью конвейера DOPseq_analyzer (Makunin et al. 2016). Сравнительный анализ результатов секвенирования ДНК-библиотек *S. malachiticus* показал, что большинство макрохромосом заборной игуаны соответствуют таковым у анолиса, кроме двух исключений: небольшие участки SMA2 и SMA6 оказались ортологичны фрагментам ACA1.

Большинство микрохромосом заборной игуаны были образованы в результате слияния как минимум двух пар предковых микрохромосом (Таблица 1).

Таблица 1. Сходство хромосом *S. malachiticus* с хромосомами *A. carolinensis*

<i>S. malachiticus</i> хромосомо-специфичные ДНК-библиотеки	<i>Anolis carolinensis</i>
1	1
2	2, 1
3	3
4	4
5	5
6	6, 1
X	X, 11, 16, 17, 18
Y	11, 16, 17, 18
7	15
8	7, 10
9	9, 14
10	8, 12

Наибольшее количество слияний идентифицировано для половых хромосом. В составе X-хромосомы были обнаружено слияние синтенной группы,

соответствующей предковой половой хромосоме игуан клады *Pleurodonta* (АСАХ) с четырьмя аутосомами (Таблица 1). Примечательно, что мы не обнаружили значимого сходства последовательностей Y-хромосомы с синтенной группой АСАХ, однако было выявлено сходство с хромосомами АСА11, АСА16, АСА17 и АСА18.

3.1.3. Идентификация и локализация последовательностей сатДНК, специфичных для половых хромосом *S. malachiticus*

В результате секвенирования геномной ДНК самца *S. malachiticus* на платформе Illumina MiSeq мы получили около 10 млн прочтений, из них 6,7 млн прочтений использовались для поиска и анализа повторяющихся последовательностей с помощью программы RepeatExplorer2 и инструмента TAREAN (Novák et al. 2013, 2017). Результаты анализа позволили выделить 17 наиболее представленных последовательностей сатДНК. Найденным последовательностям сатДНК присваивались названия с использованием 3-буквенного идентификатора вида (SMA), за которым следовала приставка “Sat”, номер кластера и обозначение степени достоверности (H – для последовательностей с высокой степенью достоверности; L – для последовательностей с низкой степенью достоверности). Основные характеристики сатДНК приведены в Таблице 2, консенсусные последовательности сатДНК приведены в **Приложении 2**.

Мы сравнили последовательности сатДНК *S. malachiticus* с последовательностями из открытых баз данных и обнаружили гомологию с геномом родственного вида, *Sceloporus undulatus* (восточная заборная игуана), для 15 из 17 последовательностей (Таблица 2). Поиск гомологичных последовательностей в базе данных RepBase не дал значимых результатов.

Ко всем последовательностям сатДНК удалось подобрать праймеры и сделать зонды, которые мы локализовали на метафазных хромосомах *S. malachiticus* с помощью FISH (Рис. 5, **Приложение 3**, Рис. 1, 2).

Таблица 2. Основные характеристики последовательностей сатДНК *S. malachiticus*.

Название повторяющегося элемента	Содержание в исследованиях прочтениях (%)	Длина в п. н.	GC-содержание (%)	Гомология с последовательностям и геномов чешуйчатых, опубликованных в базе данных NCBI BLAST*	Локализация последовательностей сатДНК на метафазных хромосомах самца <i>S. malachiticus</i> .
SMA-Sat14H	0.430	27	33.3	<i>Sceloporus undulatus</i>	Сигналы в перичентромерных районах всех пар хромосом.
SMA-Sat79H	0.070	63	66.7	<i>Sceloporus undulatus</i>	Интерстициальные сигналы на 1p, 2q, 3q, 4q, 5q Дистальные сигналы на 6p, 8p, Xp, Yq
SMA-Sat133H	0.025	144	45.1	<i>Sceloporus undulatus</i>	Сигналы в перичентромерных районах p- и q-плечах хромосомы 1, интерстициальный сигнал на 2p.

SMA-Sat142H	0.023	19	42.1	-	Интерстициальный сигнал на 8p, наблюдается полиморфизм в распределении сигналов: на одном из гомологов наблюдается слабый рассеянный сигнал, на втором – яркий блок
SMA-Sat144H	0.022	57	40.3	<i>Sceloporus undulatus</i>	Сигналы в перицентромерных районах p-плеча X-хромосомы и q-плеча Y-хромосомы
SMA-Sat50L	0.140	85	58.8	<i>Sceloporus undulatus</i>	Сигнал в C-позитивном районе Y-хромосомы, рассеянный сигнал на аутосомах
SMA-Sat63L	0.099	84	42.9	<i>Sceloporus undulatus</i>	Сигналы на дистальном конце 2p, который ко-локализуется с 45S рДНК, локализация на всей хромосоме 7
SMA-Sat71L	0.083	88	57.9	<i>Sceloporus undulatus</i>	Сигнал в C-позитивном районе Y-хромосомы, рассеянный сигнал на аутосомах

SMA-Sat83L	0.064	58	60.3	-	Сигнал на дистальном конце 1q и интерстициальный сигнал на 1p, сигналы на дистальном 2q и в С-позитивном районе Y-хромосомы
SMA-Sat84L	0.060	74	59.4	<i>Sceloporus undulatus</i>	Рассеянный сигнал на аутосомах, блок в С-позитивном районе Y-хромосомы
SMA-Sat85L	0.060	69	47.8	<i>Sceloporus undulatus</i>	Выраженный интерстициальный сигнал на 1p, слабые сигналы в дистальном районе 1p и интерстициальном районе 1q
SMA-Sat86L	0.059	112	46.4	<i>Sceloporus undulatus</i>	
SMA-Sat100L	0.050	28	42.9	<i>Sceloporus undulatus</i>	Сигнал в перичентромерном районе хромосомы 1, рассеянный сигнал на остальных хромосомах
SMA-Sat122L	0.030	60	56.7	<i>Sceloporus undulatus</i>	Рассеянный сигнал на аутосомах, слабо выраженный блок в С-позитивном районе на Y-хромосоме
SMA-Sat128L	0.027	69	50.7	<i>Sceloporus undulatus</i>	Выраженный сигнал в С-позитивном районе Y-хромосомы, слабые рассеянные сигналы в перичентромерных районах большинства хромосом

SMA-Sat181L	0.011	65	53.9	<i>Sceloporus undulatus</i>	Сигнал в дистальном районе 2p, блок в С-позитивном районе Y-хромосомы
SMA-Sat186L	0.010	67	50.8	<i>Sceloporus undulatus</i>	Сигнал в С-позитивном районе Y-хромосомы

*не менее 70% покрытия и 70% гомологии

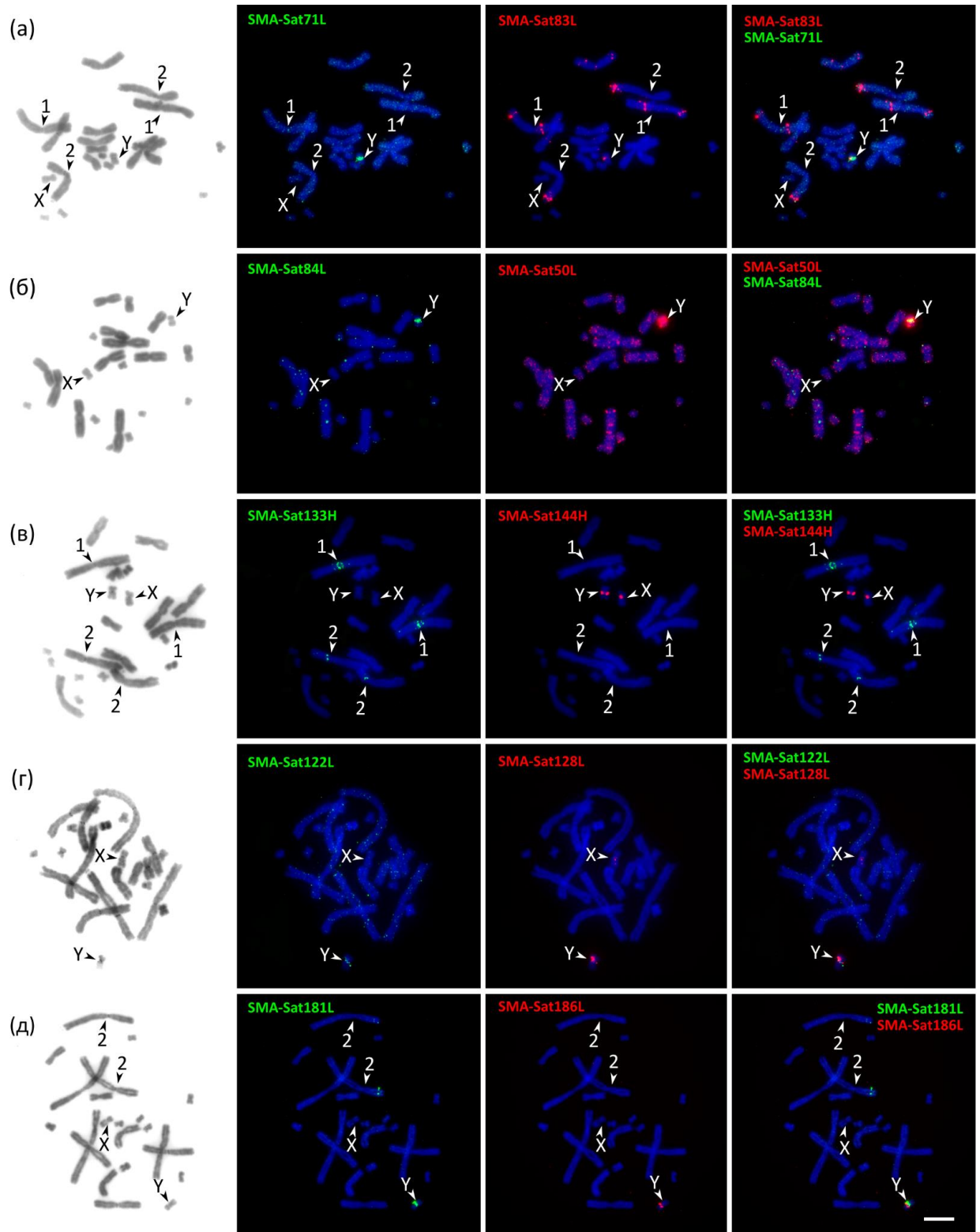


Рисунок 5. Примеры результатов FISH с зондами к последовательностям сатДНК на метафазных хромосомах самца *S. malachiticus*. В каждой строке слева направо: инвертированная DAPI-окраска; локализация биотинилированного зонда; локализация зонда, меченного дигоксигенином; совмещение слоев. Стрелками указаны хромосомы, на которых локализуются сигналы. Масштаб: 10 мкм

Результаты гибридизации зондов к сатДНК на метафазных хромосомах показали, что 11 из 17 последовательностей сатДНК (SMA-Sat-14H, SMA-Sat-79H, SMA-Sat-144H, SMA-Sat-50L, SMA-Sat-71L, SMA-Sat-83L, SMA-Sat-84L, SMA-Sat-122L, SMA-Sat-128L, SMA-Sat-181L, SMA-Sat-186L) локализуются на половых хромосомах *S. malachiticus* (Рис. 6, Таблица 2).

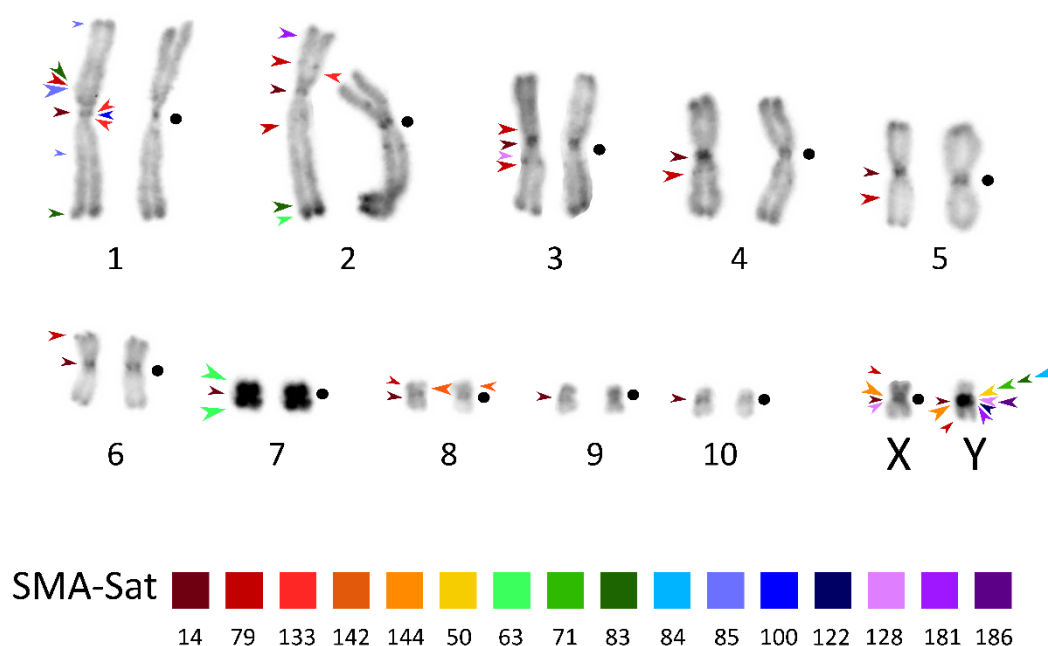


Рисунок 6. Локализация последовательностей сатДНК на метафазных хромосомах самца *S. malachiticus* после проведения С-предобработки и окрашивания флуоресцентными красителями (DAPI, хромомицин А3). Цветовая кодировка сателлитных последовательностей приведена под кариограммой. Стрелки указывают на расположение кластеров сатДНК; размер стрелок соответствует интенсивности сигнала. Черные точки указывают положение центромеры.

Последовательности SMA-Sat144H и SMA-Sat186L были выявлены только на половых хромосомах, при этом зонд SMA-Sat144H показал сигналы одинаковой интенсивности на обоих гомологах, а SMA-Sat186L локализовалась только на Y-хромосоме. СатДНК SMA-Sat50L, SMA-Sat71L, SMA-Sat84L, SMA-Sat122L, SMA-Sat128L формировали выраженные сигналы преимущественно в С-позитивном районе Y-хромосомы и давали рассеянный сигнал на аутосомах. Зонды с

последовательностями SMA-Sat83L и SMA-Sat181L, помимо основного сигнала на Y-хромосоме, выявляют дополнительные блоки на макрохромосомах. Последовательность SMA-Sat-79H была локализована во множестве интерстициальных блоков на макрохромосомах (Таблица 2), при этом на половых хромосомах она локализовалась на дистальных концах р-плеча X-хромосомы и q-плеча Y-хромосомы (Приложение 3, Рис.1: а). Зонд, содержащий последовательность SMA-Sat14H гибридизовался в перицентромерных районах всех хромосом (Приложение 3, Рис.2: а)

Поскольку большинство найденных последовательностей сатДНК имели участки гомологии с геномами других видов из рода *Sceloporus*, мы попытались локализовать полученные зонды на метафазных хромосомах самца родственного вида, *Sceloporus variabilis* (розовобрюхая заборная игуана), культура клеток которого была взята в «Криобанке культур клеток» ИМКБ СО РАН. Только один зонд, SMA-Sat100H, гибридизовался с участком дистальной части короткого плеча хромосомы 1 *S. variabilis* (Приложение 3, Рис. 2: г).

3.2. Поиск предполагаемых половых хромосом йеменского хамелеона (*Chamaeleo calyptratus*, СА) и анализ их генетического состава

3.2.1. Идентификация предполагаемых половых хромосом *C. calyptratus*

Кариотип йеменского хамелеона *Chamaeleo calyptratus* ($2n = 24$) содержал 6 пар макрохромосом и 6 пар микрохромосом, что соответствует литературным данным (Rovatsos et al. 2017b). Проточный кариотип *C. calyptratus* содержит 11 пиков (Рис. 7).

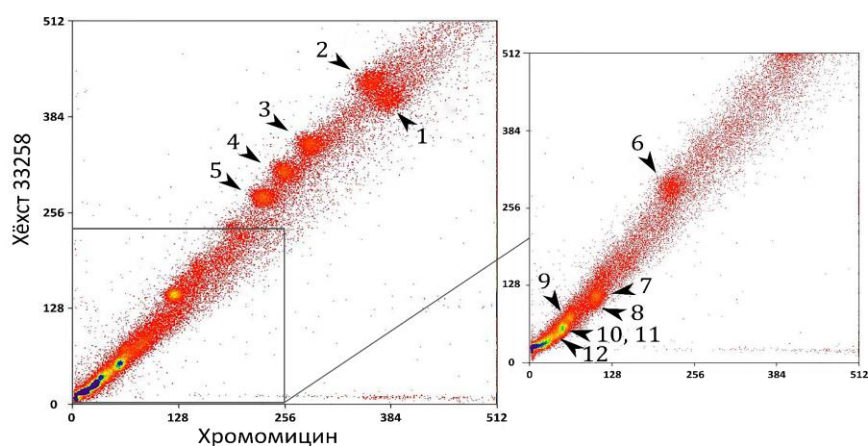


Рисунок 7. Проточный кариотип *C. calyptratus*. Обозначения пиков (указаны стрелками) соответствуют номерам хромосом. Оси X и Y: интенсивность флуоресценции для каждого флуорохрома.

FISH с мечеными зондами на метафазных хромосомах самца *C. calyptratus* выявила соответствие большинства пиков одной паре хромосом. Только один зонд окрашивал две пары хромосом (хромосомы 10 и 11) (**Приложение 3, Рисунок 3**).

Для определения половых хромосом *C. calyptratus* мы использовали ПЦР-ассоциированное картирование ранее описанных Y-специфичных RAD-seq маркеров (M2, M3, M11, M12, M13) с использованием в качестве матрицы ДНК-библиотек, специфичных для отдельных хромосом (Nielsen et al. 2018). Среди пяти маркеров только маркер M2 показал достоверный ПЦР-продукт, соответствующий хромосоме 5. Полученный результат указывает на то, что хромосома 5 может быть предполагаемой парой половых хромосом у *C. calyptratus* (Рис. 8).

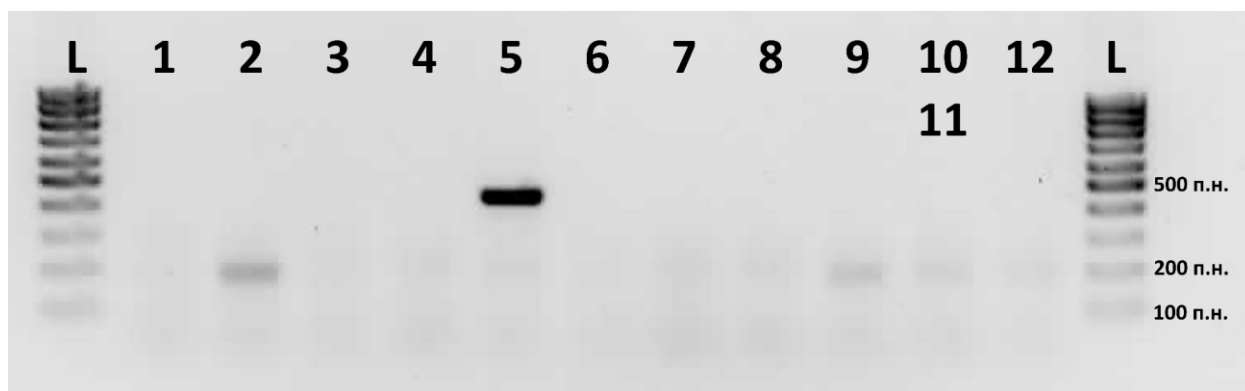


Рисунок 8. Электрофореграмма результатов картирования RAD-seq маркера M2 в хромосомоспецифичных ДНК-библиотеках самца *C. calyptratus*. Цифры соответствуют хромосомным номерам ДНК-библиотек *C. calyptratus*, полученных с помощью проточного сортирования. L – ДНК-маркер.

3.2.2. Сравнительный анализ данных секвенирования ДНК-библиотек *C. calyptratus*

Все хромосомоспецифичные ДНК-библиотеки *C. calyptratus* были секвенированы с низким покрытием на платформе MiSeq Illumina. Количество полученных прочтений варьировало в пределах 0,24-0,35 млн на ДНК-библиотеку.

Мы сравнили прочтения с опубликованными ранее геномами североамериканского красногорлого анолиса (*Anolis carolinensis*, ACA, AnoCar2.0) и жабовидной плоскорогой ящерицы (*Phrynosoma platyrhinos*, PPL, MUOH_PhPlat_1.1) с помощью конвейера DOPseq_analyzer (Makunin et al. 2016). Сравнение последовательностей хромосом *C. calypttratus* с референсными геномами выявило два слияния микрохромосом и четыре слияния макрохромосом с микрохромосомами в геноме йеменского хамелеона (Таблица 3).

Таблица 3. Сходство хромосом *C. calypttratus* с хромосомами референсных видов.

<i>C. calypttratus</i> , хромосомо- специфичные ДНК-библиотеки	<i>Anolis carolinensis</i>	<i>Phrynosoma platyrhinos</i>
Chr1	2 15 16	ma2* mi6 (фраг.) ** mi8
Chr2	1	ma1
Chr3	3 18 6 (фраг.)	ma3 mi11
Chr4	4	ma4
Chr5	5 X	ma5 mi9 (X)
Chr6	6	ma6
Chr7	7 14	mi1 mi6 (фраг.)

Chr8	9 17	mi4 mi10
Chr9	8	mi2
Chr10,11	10 11	mi3 mi5
Chr12	12	mi7

* «ma» соответствует макрохромосомам *P. platyrhinos*, «mi» соответствует микрохромосомам *P. platyrhinos*.

** «фраг.» соответствует участку хромосомы референсного генома, апострофы отмечают разные участки одних и тех же хромосом

3.2.3. Идентификация и локализация последовательностей сатДНК в геноме *C. calyptratus*

В результате секвенирования геномной ДНК самца *C. calyptratus* на платформе MGI мы получили около 13 млн прочтений. Только 6 млн прочтений использовались для поиска и анализа повторяющихся последовательностей с помощью программы RepeatExplorer2 и инструмента TAREAN (Novák et al. 2013, 2017), что позволило выделить 5 последовательностей сатДНК (Таблица 4).

Таблица 4. Основные характеристики последовательностей сатДНК *C. calyptratus*.

Название повторяющегося элемента	Содержание в исследованных прочтениях (%)	Длина в п. н.	GC-содержание (%)	Гомология с последовательностями геномов чешуйчатых, опубликованных в базе данных NCBI BLAST*
CCA_s1	0.077	466	35,4	-
CCA_s2	0.045	196	38,8	<i>Thamnophis elegans</i>

CCA_s3	0.024	1228	39,1	-
CCA_s4	0.13	51	54,9	<i>Varanus komodoensis</i> <i>Pogona vitticeps</i>
CCA_s5	0.021	880	49	-

*покрытие не менее 30%, сходство не менее 30%

Мы сравнили последовательности сатДНК *C. calypratus* с последовательностями из открытых баз данных и обнаружили гомологию с геномами чешуйчатых для последовательностей CCA_s2 и CCA_s4 (Таблица 4). Поиск гомологичных последовательностей в базе данных RepBase не дал результатов. Локализация полученных последовательностей сатДНК на метафазных хромосомах показала их принадлежность аутосомам (Рис. 9).

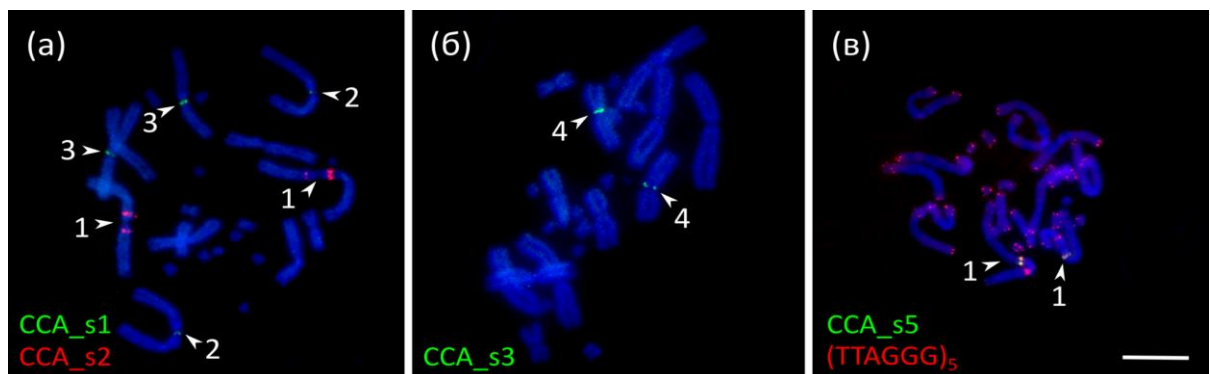


Рисунок 9. Результаты FISH с пробами к последовательностям сатДНК на метафазных хромосомах самца *C. calypratus*. Стрелками указаны хромосомы, на которых выявлены сигналы. Масштаб: 10 мкм.

Повторы CCA_s2 и CCA_s5 ко-локализовались с интерстициальными теломерными последовательностями на хромосоме 1, при этом кластер CCA_s2 давал сигналы на обоих плечах, а кластер CCA_s5 локализовался только в q-плече хромосомы 1. Последовательность CCA_s1 локализовалась в перицентромерной области хромосом 2 и 3, а повтор CCA_s3 маркировал аналогичную область на хромосоме 4. Последовательность CCA_s4 не образовывала цитогенетически

идентифицируемых кластеров и равномерно распределена по всем хромосомам (Рис. 10).

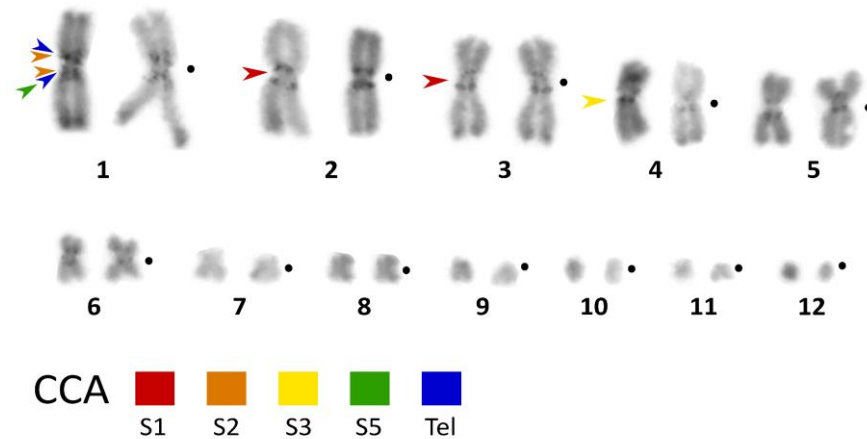


Рисунок 10. Локализация последовательностей сатДНК на метафазных хромосомах самца *C. calyptratus*, после проведения С-предобработки и окрашивания флуоресцентными красителями (DAPI, Хромомицин А3). Цветовая кодировка сателлитных последовательностей приведена после кариограммы. Стрелки указывают на расположение кластеров сатДНК; размер стрелок соответствует интенсивности сигнала. Черные точки указывают положение центромеры.

3.3. Генетический состав половых хромосом юкатанского полосатого геккона (*Coleonyx elegans*, CEL) и центральноамериканского геккона (*Coleonyx mitratus*, CMI)

3.3.1. Цитогенетическое сравнение половых хромосом *C. elegans* и *C. mitratus*

Кариотип исследованного в работе самца *C. mitratus* был полностью идентичен ранее описанному кариотипу самца *C. elegans* (Pokorná et al. 2010) и состоял из 14 пар акроцентрических аутосом и множественных половых хромосом системы $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$. При этом Y-хромосома – самая крупная метацентрическая хромосома в кариотипе, а X_1 и X_2 являются акроцентриками средних размеров. Как и у *C. elegans*, X_1 -хромосома *C. mitratus* несла ядрышковый организатор, расположенный на дистальном конце длинного плеча (Рис.11: а).

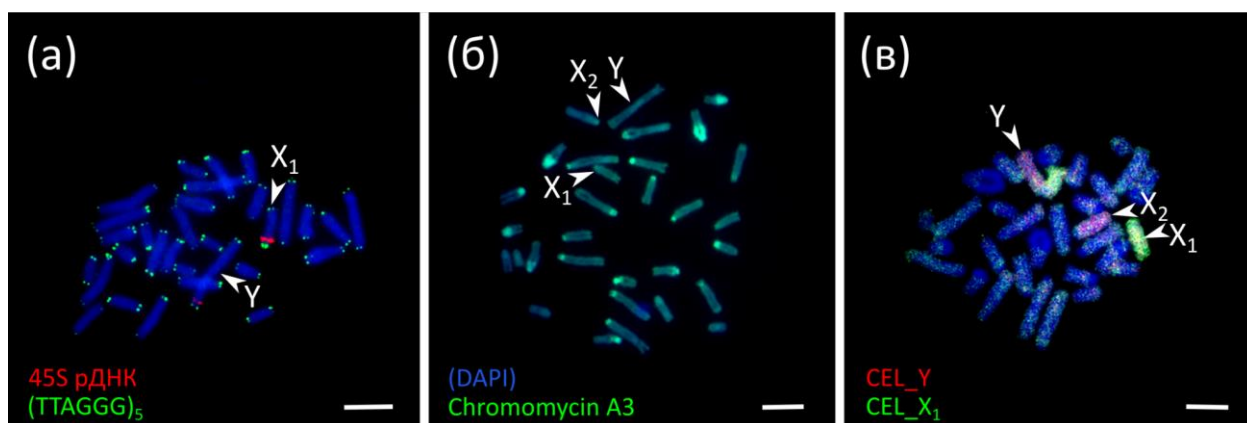


Рисунок 11. (а) Результаты FISH с зондами к 45S рДНК и теломерной ДНК на метафазных хромосомах *C. mitratus*. Стрелками обозначены половые хромосомы. (б) – С-окрашивание метафазных хромосом самца *C. mitratus*. Синий псевдоцвет – DAPI, зеленый – хромомицин А3. (в) FISH с сортированными хромосомоспецифичными ДНК-зондами самца *C. elegans* на метафазных хромосомах самца *C. mitratus*. Зеленый псевдоцвет – зонд, содержащий X_1 -хромосому, красный – зонд, содержащий Y -хромосому. Масштаб: 10 мкм.

С-окрашивание метафазных хромосом самца *C. mitratus* с использованием флуоресцентных красителей DAPI и хромомицина А3 выявило множество блоков конститутивного гетерохроматина на аутосомах (Рис. 11: б).

Проточный кариотип самца *C. elegans* был опубликован ранее Касаи с соавторами (Kasai et al. 2019). Мы локализовали зонды, содержащие ДНК половых хромосом *C. elegans*, на метафазных хромосомах самца *C. mitratus* методом FISH. Зонд, содержащий ДНК Y -хромосомы, гибридизовался с метацентрической хромосомой (Y) и две акроцентрические хромосомы, на одной из которых были локализованы кластеры рибосомной ДНК (X_1) (Рис. 11, в). Мы определили зонды, соответствующие X_1 - и X_2 -хромосомам, путем совместной гибридизации зонда к Y -хромосоме с другими зондами из набора сортированных ДНК-библиотек. Зонд, содержащий X_1 -хромосому, ко-локализовался с зондом, содержащим Y -хромосому, при этом сигнал распределялся по одному из плеч Y -хромосомы и одной акроцентрической хромосомы, несущей кластеры рибосомной ДНК (Рис. 11: в). Зонд, содержащий X_2 , оказался контаминированный одной из аутосом, поскольку помимо одного из плеч Y -хромосомы она гибридизовалась еще с тремя акроцентрическими хромосомами схожих размеров.

3.3.2. Сравнительный анализ данных секвенирования ДНК-библиотек, специфичных половым хромосомам *C. elegans*

Поскольку большинство аутосомных ДНК-библиотек *C. elegans* оказались смешанными и при проведении FISH на метафазных хромосомах самки *C. elegans* окрашивали по 2-3 пары хромосом, только ДНК-библиотеки, содержащие последовательности X₁-, X₂- и Y-хромосом были секвенированы с низким покрытием на платформе MiSeq Illumina. Количество полученных последовательностей варьировало в пределах 0,16-0,32 млн прочтений на ДНК-библиотеку. Мы сравнили полученные последовательности с опубликованными ранее геномами североамериканского красногорлого анолиса (*Anolis carolinensis*, ACA, AnoCar2.0, улучшенная DNAZoo Consortium) и пятнистого эubleфары (*Eublepharis macularis*, EMA, Emac_v1.0.1) с помощью конвейера DOPseq_analyzer (Makunin et al. 2016) (Таблица 5).

Таблица 5. Сходство половых хромосом *C. elegans* с хромосомами референсных видов.

<i>C. elegans</i> , хромосомо- специфичные ДНК-библиотеки	<i>Anolis carolinensis</i> (ACA)	<i>Eublepharis macularis</i> (EMA)
CEL_X ₁	ACA6q ACA12	EMA12
	ACA8	EMA16 (фрагмент)
CEL_X ₂	ACA3p	EMA6 (фрагмент)
	ACA4q	EMA5
CEL_Y	ACA6q ACA12	EMA12
	ACA8	EMA16 (фрагмент)
	ACA3p	EMA6 (фрагмент)

Среди последовательностей, соответствующих ДНК-библиотеке X₂-хромосомы, были обнаружены последовательности, сходные с синтенными группами, не обнаруженными в составе Y-хромосомы. Мы предположили, что они относятся к аутосомной паре, которая контаминирует ДНК-библиотеку, и в дальнейшем обсуждении их не учитывали.

3.3.3. Идентификация и локализация последовательностей сатДНК, специфичных для половых хромосом *C. mitratus*

Геномную ДНК самца *C. mitratus* мы секвенировали на платформе Illumina MiSeq и получили приблизительно 4 млн прочтений, из них 0.9 млн прочтений было проанализировано в программе RepeatExplorer с интегрированным в нее инструментом TAREAN (Novák et al. 2013, 2017). Анализ данных секвенирования геномной ДНК позволил выделить 14 последовательностей сатДНК. Найденным последовательностям сатДНК присваивались названия с использованием 3-буквенного идентификатора вида (CMI), за которым следует приставка “Sat”, номер кластера и обозначение степени достоверности (H – для последовательностей с высокой степенью достоверности; L – для последовательностей с низкой степенью достоверности). Основные характеристики наиболее представленных сатДНК приведены в Таблице 6.

Таблица 6. Основные характеристики последовательностей сатДНК *C. mitratus*.

Название повторяющегося элемента	Содержание в исследованных прочтениях (%)	Длина в п. н.	GC-содержание (%)	Гомология с последовательностям и геномов чешуйчатых, опубликованных в базе данных NCBI BLAST*	Локализация последовательностей сатДНК на метафазных хромосомах самца <i>C. mitratus</i> .
CMI-Sat11H	0.170	114	50	-	Сигналы в перичентромерных районах 10 пар аутосом и X ₂ -хромосомы
CMI-Sat30H	0.130	85	57.7	<i>Eublepharis macularius</i>	Выраженный сигнал в С-позитивном районе хромосомы 6 и слабые в перичентромерных районах у 6-8 пар хромосом.

CMI-Sat31H	0.200	144	55.6	<i>Eublepharis macularius</i> <i>Podarcis muralis</i> <i>Gekko japonicus</i>	Сигналы в перичентромерных районах хромосомы 4 и Y-хромосомы, блоки в C-позитивных районах хромосом 10 и 13
CMI-Sat39H	0.31	188	53.2	<i>Eublepharis macularius</i> <i>Gekko japonicus</i>	Сигналы в перичентромерных районах хромосом 1, 7 и Y-хромосомы, в C-позитивных районах хромосом 10 и 13
CMI-Sat69H	0.069	58	39.7	-	Сигналы в перичентромерных районах 11 пар аутосом и X ₁ -, X ₂ -хромосом
CMI-Sat75H	0.039	171	43.9	-	Сигналы в C-позитивном перичентромерном районе хромосомы 7
CMI-Sat92H	0.027	112	53.6	<i>Eublepharis macularius</i>	Интерстициальный сигнал на q-плече хромосомы 10
CMI-Sat106H	0.023	1448	49.2	<i>Eublepharis macularius</i>	Сигналы в теломерных областях большинства хромосом

CMI-Sat119H	0.018	823	44.2	-	Интерстициальный сигнал на q-плече хромосомы 11
CMI-Sat126H	0.017	383	41.8	<i>Eublepharis macularius</i>	Сигналы в перичентромерной области X ₁ -хромосомы и Y-хромосомы
CMI-Sat6L	0.2	38	57.9	-	Сигналы в C-позитивном районе хромосомы 6
CMI-Sat24L	0.270	9846	44.9	-	Сигналы в C-позитивном районе хромосом 10 и 13, рассеянный сигнал в перичентромерном районе Y-хромосомы
CMI-Sat33L	0.230	2380	50.3	<i>Sphaerodactylus townsendi</i>	Рассеянный сигнал на всех хромосомах
CMI-Sat85L	0.042	294	45.6	<i>Sceloporus undulatus</i> , <i>Anolis carolinensis</i>	Сигнал в перичентромерном районе Y-хромосомы, рассеянные сигналы в перичентромерном районе хромосомы 10

*не менее 30% покрытия и 30 % гомологии

Мы сравнили последовательности сатДНК *C. mitratus* с последовательностями из общедоступных баз данных и обнаружили гомологию с геномами чешуйчатых для восьми последовательностей (CMI-Sat11H, CMI-Sat24L, CMI-Sat31H, CMI-Sat39H, CMI-Sat69H, CMI-Sat85L, CMI-Sat85Lб CMI-Sat106H) (Таблица 6). Поиск гомологичных последовательностей в базе данных RepBase показал гомологию последовательности сатДНК CMI-Sat33L последовательности ретротранспозона класса NonLTR/CR1 расписной черепахи, *Chrysemys picta* (покрытие 30%, сходство 68%). Ко всем последовательностям сатДНК мы смогли подобрать праймеры и сделать зонды, которые локализовали на метафазных хромосомах *C. mitratus* с помощью FISH (Рис.12).

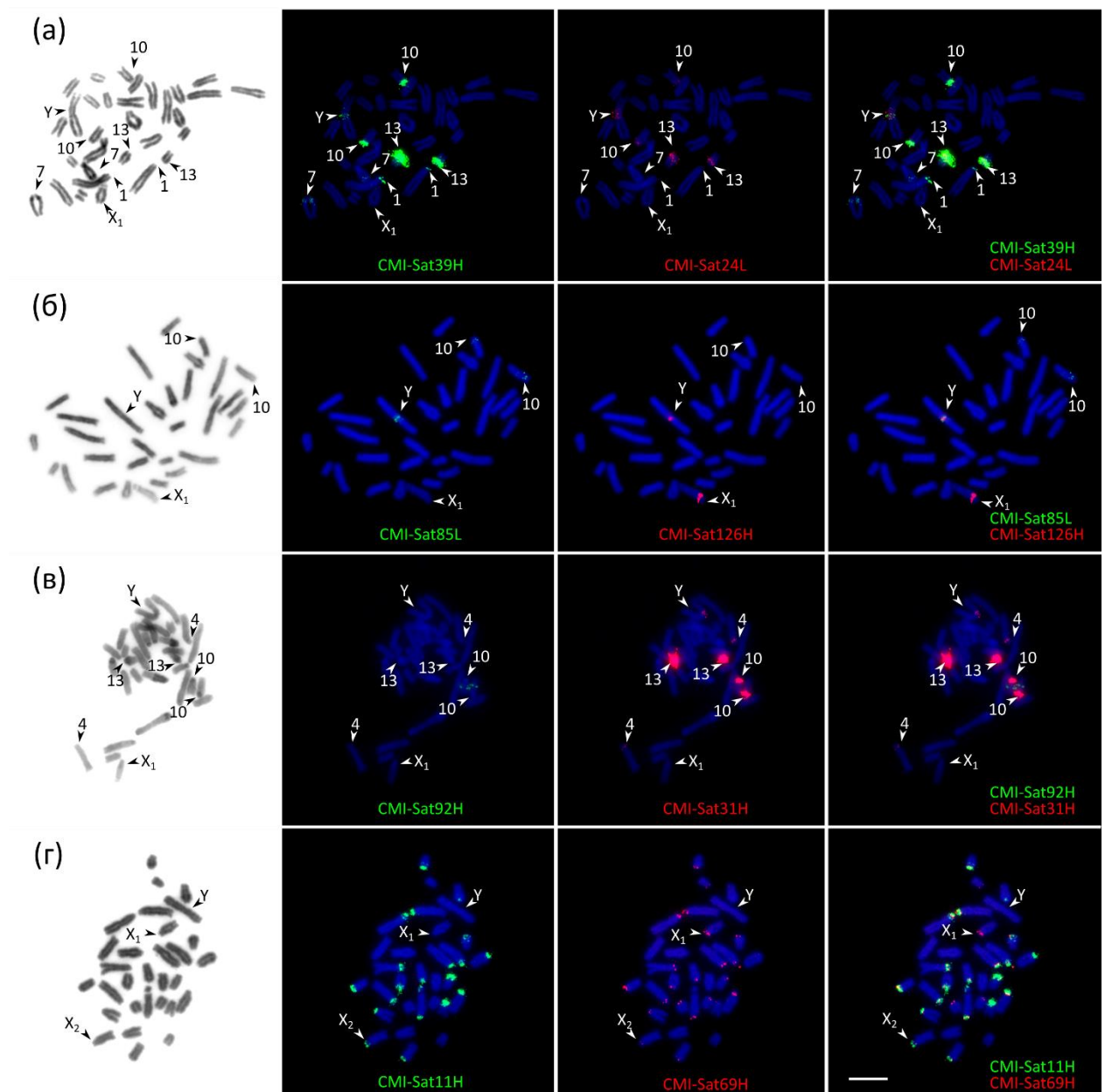


Рисунок 12. Примеры результатов FISH с зондами к сатДНК на метафазных хромосомах самца *C. mitratus*. Стрелками указаны хромосомы, на которых локализуются сигналы. Масштаб: 10 мкм.

Мы обнаружили, что семь последовательностей сатДНК (CMI-Sat11H, CMI-Sat-24L, CMI-Sat-31H, CMI-Sat-39H, CMI-Sat-69H, CMI-Sat-85L, CMI-Sat-106H) гибридизовались как с половыми хромосомами, так и на аутосомах, только один кластер (CMI-Sat126H) оказался специфичным для X₁- и Y-хромосом. Остальные последовательности сатДНК выявлены только на аутосомах. Локализация большинства кластеров совпадала с локализацией С-позитивных блоков (Рис. 13).

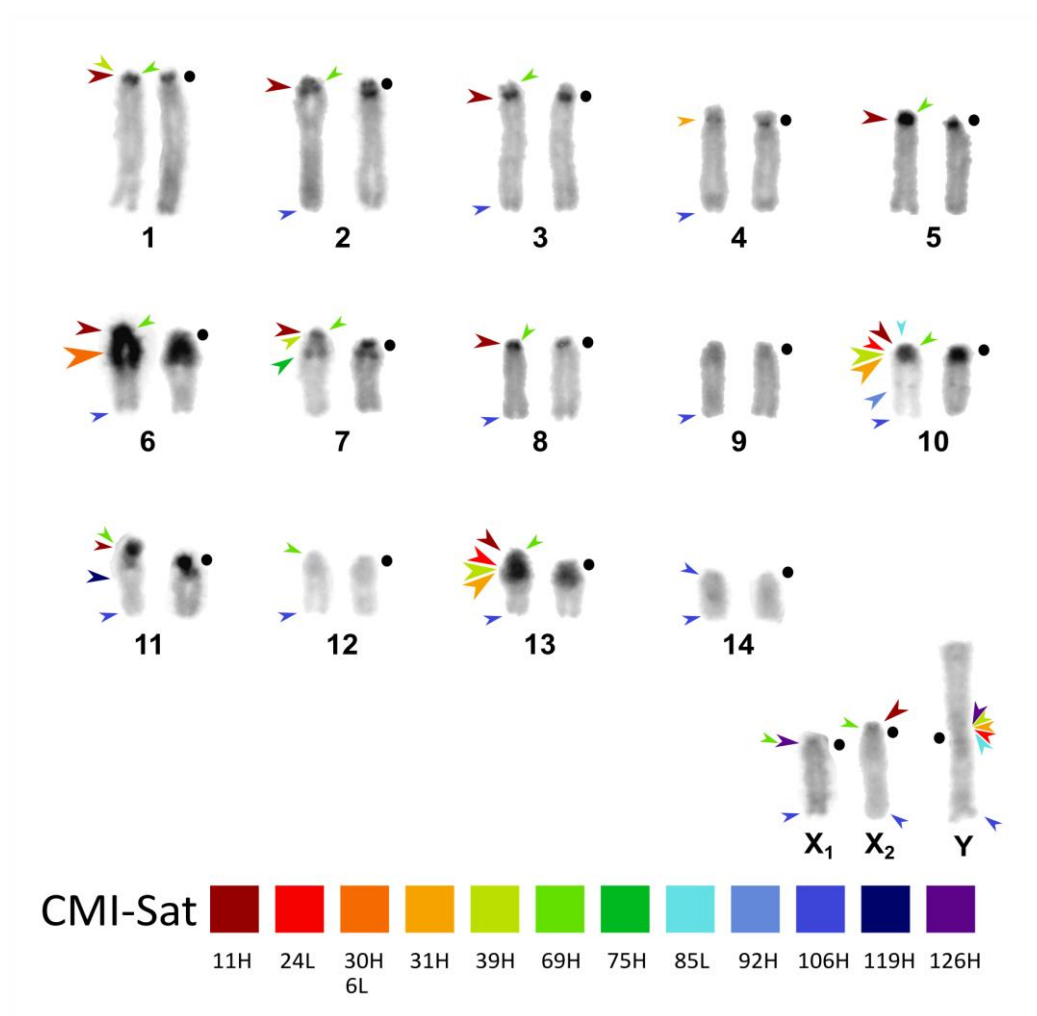


Рисунок 13. Локализация последовательностей сатДНК на метафазных хромосомах *C. mitratus*, после С-предобработки и окрашивания флуоресцентными красителями (DAPI, хромомицин А3). Цветовая кодировка сателлитных последовательностей приведена после кариограммы. Стрелки указывают на

расположение кластеров сатДНК; размер стрелок соответствует интенсивности сигнала. Черные точки указывают положение центромеры.

Мы также попытались локализовать найденные последовательности сатДНК на метафазных хромосомах самки *C. elegans*, однако не обнаружили выраженных сигналов.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Половые хромосомы представителей инфраотряда игуанообразные (Iguania)

4.1.1. Заборная малахитовая игуана (*Sceloporus malachiticus*)

Для многих представителей игуан клады Pleurodonta описаны нео-половые хромосомы, которые сформировались в результате слияний предковой половой хромосомы (соответствует X-хромосоме североамериканского красногорлого анолиса, ACAX) с различными аутосомами (Rovatsos et al. 2014, Altmanová et al. 2018). В рамках данной работы мы обнаружили, что нео-половые хромосомы *S. malachiticus* сформировались в результате слияний ACAX с четырьмя парами микрохромосом (ACA11, ACA16, ACA17, ACA18).

Для представителей рода *Sceloporus* описана тесная связь между хромосомными перестройками и формированием филогенетических групп, поэтому виды, принадлежащие одной филогенетической группе, характеризуются одинаковым числом хромосом (Leaché and Sites 2010). Следовательно, вероятный возраст нео-половых хромосом *S. malachiticus* должен совпадать со временем формирования группы видов, у которых $2n = 22$, что составляет порядка 30 млн. лет (Leaché et al. 2016, Tonini et al. 2016).

Синтенные группы генов, описанные для половых хромосом *S. malachiticus*, встречаются в составе половых хромосом у многих видов рептилий как по отдельности, так и в сочетании друг с другом. Например, слияние ACAX+ACA11 обнаружено в составе половых хромосом игуан рода *Ctenonotus* (Giovannotti et al. 2017, Lisachov et al. 2019) и Z-хромосомы у gekkonov рода *Paroedura* (Rovatsos et al. 2019a). Слияние ACAX+ACA18 встречается у игуан рода *Norops*, а ACA16+ACA11 входят в состав Z-хромосомы представителей семейства настоящие ящерицы (Lacertidae) (Srikulnath et al. 2014, Giovannotti et al. 2017). Кроме того, ACAX описана в составе половых хромосом трёхкоготных черепах (Testudines: Trionychidae) (Kawagoshi et al. 2009, Rovatsos et al. 2017a), а синтенные группы ACA16 и ACA11 встречаются в составе половых хромосом у игуан клады Acrodonta.

Особого внимания заслуживают синтенные группы, соответствующие АСА11 и АСА18, поскольку АСА11 входит в состав половых хромосом плацентарных млекопитающих и содержит ген *sox3*, а синтенная группа АСА18 содержит ген *amh* и описана в составе половых хромосом у однопроходных (Cortez et al. 2014), варанов (Lind et al. 2019), некоторых амфибий (Miura 2018) и рыб (Li et al. 2015).

С-позитивный блок в составе Y-хромосомы вероятнее всего соответствует некогда выродившимся последовательностям АСАХ. Результаты нашего исследования показали, что процесс деградации сопровождался накоплением сателлитной ДНК: в С-позитивном блоке на Y-хромосоме локализовались как минимум девять последовательностей сатДНК (Рис. 5, Рис. 6). Области конститутивного гетерохроматина на вырождающихся гомологах часто характеризуются накоплением сателлитной ДНК, сходный феномен описан для некоторых рыб (Crepaldi and Parise-Maltempo 2020, Crepaldi et al. 2021, Kretschmer et al. 2022), амфибий (Gatto et al. 2018, Da Silva et al. 2020), чешуйчатых (Singh et al. 1980, Lisachov et al. 2023), птиц (Kretschmer et al. 2024) и млекопитающих (Beklemisheva et al. 2023).

Только кластеры SMA-Sat144H и SMA-Sat186L являлись специфичными для половых хромосом. При этом кластер SMA-Sat144H показал сигналы, одинаковые по интенсивности, но разные по локализации (Xp и Yq, соответственно). Кластер SMA-Sat79H, который формировал интерстициальные и субтеломерные блоки на аутосомах, также локализовался на разных плечах у гомологов (дистальные концы Xp и Yq). По всей видимости, наличие С-позитивного блока искажало восприятие морфологии половых хромосом (Рис. 6), и генетический материал q-плеча Y-хромосомы должен соответствовать таковому на p-плече X-хромосомы.

Большинство найденных последовательностей сатДНК (кроме SMA-Sat142H) сходны с последовательностями опубликованного генома родственного вида *S. undulatus*. Кариотип данного вида идентичен кариотипу *S. malachiticus*, при этом время дивергенции для этих видов составляет порядка 17 млн лет (Pyrone and Burbrink 2014, Hedges et al. 2015, Zheng and Wiens 2016). В то же время при попытке локализовать сателлитные последовательности *S. malachiticus* на метафазных хромосомах другого родственного вида, *S. variabilis*, только зонд SMA-Sat100L

давал детектируемые сигналы (**Приложение 3, Рис. 2: г**). Примечательно, что у *S. malachiticus* зонд гибридизовался с перицентромерной областью хромосомы 1, а у *S. variabilis* этот кластер маркировал дистальный конец хромосомы 1p. Возможно, разная локализация пробы является маркером перестройки хромосомы 1 у этих двух видов, например, инверсии. Более углубленное исследование позволит определить, является ли обнаруженная особенность локализации кластера SMA-Sat100L на метафазных хромосомах самцов *S. malachiticus* и *S. variabilis* особенностью конкретных исследуемых особей или же перестройка хромосомы 1 является видоспецифическим маркером для одного из видов.

Поскольку вид *S. variabilis* относится к другой группе видов рода *Sceloporus* с диплоидным числом $2n=34$ и отделился от видов с $2n=22$ приблизительно 43 млн лет назад (Pyron et al. 2013, Hedges et al. 2015, Zheng and Wiens 2016), мы можем предположить, что накопление сатДНК на Y-хромосоме *S. malachiticus* произошло уже после формирования группы видов с $2n=22$. Исследование повторяющихся элементов в составе половых хромосом у других представителей рода *Sceloporus* позволит определить, насколько широко распространены в данном роде последовательности сатДНК, выявленные в геноме *S. malachiticus*.

4.1.2. Йеменский хамелеон (*Chamaeleon calyptratus*)

Несмотря на то, что хамелеоны не раз являлись объектами цитогенетических исследований, механизмы определения пола у представителей этого таксона остаются малоизученными (Rovatsos et al. 2017b). Исследования, сообщающие о средовом определении пола у некоторых видов, не получили подтверждений. Генетическое определение пола описано для представителей всего двух родов, при этом род *Furcifer* характеризуется гетероморфными половыми хромосомами системы ZZ/ZW и нео-половыми хромосомами $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1Z_2W$, а для двух видов рода *Chamaeleo* описаны гомоморфные половые хромосомы системы XX/XY (Rovatsos et al. 2017b, Nielsen et al. 2018, Sidhom et al. 2020). Предполагается, что в течение последних 45 млн лет в семействе Chamaeleonidae произошла либо смена одной системы определения пола на другую, либо формирование двух независимых систем половых хромосом (Rovatsos et al. 2024). При этом точный возраст предполагаемых половых хромосом йеменского хамелеона остается неизвестным. Мы не обнаружили накоплений tandemных повторов или других

цитогенетических различий между гомологами. Опубликованные ранее исследования не показали ни разницы в распределении блоков конститутивного гетерохроматина на предполагаемых половых хромосомах при С-окрашивании метафазных хромосом *C. calyptratus* (Rovatsos et al. 2017b), ни потери генов (Nielsen et al. 2018). Поскольку для многих систем половых хромосом описана разница по количеству копий генов между гомологами, вероятно, эта система половых хромосом сформировалась относительно недавно.

Ранее последовательности Y-специфичных маркеров *C. calyptratus* были локализованы с помощью FISH на метафазных хромосомах самца родственного вида, обыкновенного хамелеона (*Chamaeleo chamaeleon*) и вторая пара макрохромосом была определена как предполагаемые половые хромосомы (Sidhom et al. 2020). Кариотипы *C. calyptratus* и *C. chamaeleon* идентичны, а время дивергенции между видами сравнительно невелико (10-13 млн лет) (Zheng and Wiens 2016), поэтому можно предположить, что генетический состав половых хромосом должен быть схожим. Более углубленный анализ половых хромосом у представителей рода *Chamaeleo*, основанный на биоинформатическом сравнении последовательностей геномной ДНК разных полов, позволит оценить примерный возраст XX/XY *C. calyptratus* и определить, имеют ли эти виды гомологичные половые хромосомы или же локус, определяющий пол и несущий Y-специфичные маркеры, переместился на другую пару хромосом у одного из видов.

Сравнительный анализ последовательностей хромосомоспецифичных ДНК-библиотек с референсными геномами показал, что уменьшение числа хромосом в кариотипе *C. calyptratus* ($2n=24$) по сравнению с предковым кариотипом семейства Chamaeleonidae ($2n=36$) произошло за счет слияний как микрохромосом между собой, так и микрохромосом с макрохромосомами. Половые хромосомы *C. calyptratus* также сформировались в результате слияния макрохромосомы АСА5 с микрохромосомой АСАХ. Такие слияния являются нетипичными для геномов чешуйчатых. Чаще всего сокращение числа хромосом в кариотипах происходит за счет слияний между хромосомами одного типа, поскольку макро- и микрохромосомы различаются по GC-составу, содержанию генов и физическому положению в ядре (Waters et al. 2021).

Синтенные группы, обнаруженные в составе половых хромосом йеменского хамелеона, описаны в составе половых хромосом у многих видов рептилий. Как уже упоминалось, АСАХ (соответствует хромосоме 15 курицы) является предковой половой хромосомой для игуан клады *Pleurodonta*, за исключением семейства *Corytophanidae* (Rovatsos et al. 2014, Altmanová et al. 2018), а также присутствует в составе половых хромосом у семейства трёхкоготные черепахи (*Testudines: Trionychidae*) (Kawagoshi et al. 2009, Rovatsos et al. 2017a) и гекконов рода *Paroedura* (Rovatsos et al. 2019a).

Помимо широко распространенной синтенной группы АСАХ, в состав половых хромосом йеменского хамелеона входит АСА5 (соответствует хромосомам 1 и 4q курицы). Участок, ортологичный 4q курицы, описан в составе половых хромосом пигоподидных гекконов (Rovatsos et al. 2021) и муррайской речной черепахи (*Emydura macquarii*) (Zhu et al. 2022), а фрагмент хромосомы 1 курицы может быть ортологичен XX/XY сцинков (Kostmann et al. 2021).

Синтенная группа АСА5 содержит по крайней мере три гена (*pitx2*, *sox5* и *sox10*), которые участвуют в эмбриональном развитии гонад позвоночных и могут быть кандидатами на роль основного определяющего пол гена (Polanco et al. 2010, Nandi et al. 2011, Scharl et al. 2018).

Несмотря на то, что синтенные группы, сформировавшие половые хромосомы *C. calypttratus*, вовлечены в формирование половых хромосом как минимум у четырех крупных групп рептилий (игуан клады *Pleurodonta*, некоторых гекконов, сцинков и черепах), у других представителей клады *Acrodonta* с описанными половыми хромосомами эти синтенные группы не встречаются. Например, генетический состав ZZ/ZW хромосом бородатой агамы (*Pogona vitticeps*) соответствует хромосоме 16 и частично хромосоме 9 североамериканского анолиса (хромосомы 17 и 23 курицы, соответственно) (Deakin et al. 2016), при этом ZZ/ZW хромосомы хамелеонов рода *Furcifer* гомологичны хромосоме 11 анолиса (хромосома 4p курицы) (Kratovich et al. 2021b, Rovatsos et al. 2024).

Обнаружение предковой половой хромосомы игуан клады *Pleurodonta* (АСАХ) у представителя игуан клады *Acrodonta* позволяет предположить, что эта синтенная группа являлась предковой половой хромосомой у общего предка всех игуан. Однако среди представителей клады *Acrodonta* встречаются виды как с

температурозависимым и смешанным типом определения пола, так и виды с описанными половыми хромосомами (Quinn et al. 2007, Hansson and Olsson 2018). Поскольку эволюция систем определения пола у амниот направлена на переход от средового определения пола к генетическому, и обратные переходы чрезвычайно редки (Pennell et al. 2018), мы все же склонны предполагать, что общий предок клады Acrodonta имел температурозависимое определение пола. Позже некоторые таксоны перешли к генетическому определению пола с формированием системы половых хромосом XX/XY либо ZZ/ZW. Поэтому наличие синтенной группы ACAX как в составе предковой половой хромосомы игуан клады Pleurodonta, так и в составе половых хромосом *C. calypttratus*, вероятнее всего является конвергентным признаком. Дальнейшее изучение генетического состава половых хромосом у представителей клады Acrodonta добавит информации об эволюции систем определения пола для данного таксона и для инфраотряда игуанообразные в целом.

Таким образом, половые хромосомы заборной малахитовой игуаны являются примером эволюционно старой системы половых хромосом, которая претерпела множество транслокаций с аутосомами, в то время как предполагаемые половые хромосомы йеменского хамелеона являются примером эволюционно “молодых” половых хромосом, еще не накопивших выраженных различий между гомологами. У обоих исследованных видов в формировании половых хромосом принимают участие синтенные группы, содержащиеся в половых хромосомах у многих видов чешуйчатых. Присутствие ACAX в составе половых хромосом и заборной малахитовой игуаны, и йеменского хамелеона, вероятнее всего обусловлено конвергентной эволюцией гоносом у представителей разных клад игуанообразных.

4.2. Половые хромосомы представителей инфраотряда gekkonoобразные (Gekkota)

При исследовании половых хромосом у представителей рода *Coleonyx* было выдвинуто предположение, что гоносомы *C. elegans* (CEL) и *C. mitratus* (CMI) ортологичны и возникли около 34 млн лет назад (Pensabene et al. 2020). Авторы работы смогли определить, гены, находящиеся в гемизиготном состоянии, располагаются на хромосомах 1, 6 и 11 курицы, однако генетический состав PAR не был определен.

С помощью цитогенетических методов мы показали, что самцы *C. mitratus* обладают половыми хромосомами системы $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, которые можно идентифицировать зондами, содержащих ДНК половых хромосом *C. elegans*. Число и морфология аутосом у этих видов также оказались идентичными. Результаты сравнительного биоинформатического анализа с использованием генома североамериканского красногорлого анолиса (АСА) в качестве референса показали, что описанная ранее синтенная группа, соответствующая хромосоме 8 анолиса (хромосома 11 курицы), располагается на X_1 -хромосоме, в то время как группа АСА3р (соответствует фрагментам хромосом 1 и 6 курицы) ортологична X_2 -хромосоме. Также мы смогли выявить не описанные ранее районы ортологии X_1 -хромосомы с хромосомами 12 и 6q анолиса (хромосомы 27 и 14 курицы). Хромосома X_2 , по-видимому, полностью ортологична р-плечу хромосомы 3 анолиса (соответствует фрагментам куриных хромосом 6 и 9). Обнаруженные нами новые синтенные группы генов, вероятно, вовлечены в формирование PAR.

В отличие от исследованных в данной работе игуанообразных, синтенные группы генов, формирующие половые хромосомы *C. elegans* и *C. mitratus*, описаны в составе половых хромосом у относительно малого количества видов позвоночных. Фрагмент синтенной группы АСА6q, который мы обнаружили в составе X_1 -хромосомы, гомологичен фрагменту Z-хромосомы змей клады Caenophidia (Rovatsos et al. 2015) и X-хромосомы темного тигрового питона (*Python bivittatus*) (Gamble et al. 2017). Синтенная группа АСА12 (гомологична хромосоме 14 курицы) выявлена в составе ZZ/ZW половых хромосом мраморного геккона (*Christinus marmoratus*) и псевдоаутосомной части XX/XY половых хромосом коричневого анолиса (*Anolis sagrei*) (Kichigin et al. 2016, Zhu et al. 2022). Среди ранее описанных синтенных групп в составе половых хромосом *C. mitratus* и *C. elegans* только АСА8 (хромосома 11 курицы) имеет участки ортологии с X_1 - и X_2 -хромосомами утконоса, которые являются PAR (Cortez et al. 2014, Pensabene et al. 2020).

Отдельного внимания заслуживает синтенная группа АСА3р (соответствует CELX₂), содержащая гены *emx2* и *foxl2*. Эти гены являются участниками генетического каскада определения пола и могут быть потенциальными кандидатами на роль гена, определяющего пол у данных видов (Pellegrini et al. 1997, Baron et al. 2005). Также стоит отметить, что ген *pdgfa* (располагается на АСА12),

который считается перспективным кандидатом на роль определяющего пол локуса у мраморного геккона (Zhu et al. 2022), возможно, способствует вовлечению ACA12 в формирование половых хромосом.

С-окрашивание метафазных хромосом самца *C. mitratus* выявило обширные С-позитивные блоки на аутосомах, с которыми колокализуются большинство найденных последовательностей сатДНК (Рис. 13). Несмотря на то, что половые хромосомы самца *C. mitratus* не имеют выраженных С-позитивных блоков, их перицентромерные районы также характеризуются наличием семи последовательностей сатДНК. Примечательно, что последовательности CMI-Sat24L, CMI-Sat31H, CMI-Sat39H, CMI-Sat85L, метившие перицентромерный участок Y-хромосомы, и последовательность CMI-Sat11H, локализуемая на X₂-хромосоме, дают выраженные сигналы в крупных С-позитивных областях некоторых аутосом, но в то же время не обнаружены на X₁-хромосоме (Рис. 12-13, Таблица 5). Кроме того, последовательность CMI-Sat69H, локализуемая в перицентромерных областях на большинстве аутосом и в хромосомах X₁ и X₂ не обнаружена на Y-хромосоме (Рис. 12: г). Вероятнее всего, вышеперечисленные последовательности сатДНК имеют аутосомное происхождение. Накопление повторяющихся элементов именно в перицентромерных районах половых хромосом может быть следствием снижения уровня рекомбинации в центромерных и перицентромерных районах (Talbert and Henikoff 2010). Только одна последовательность сатДНК (CMI-Sat-126H) оказалась специфичной для половых хромосом и формирует блоки в перицентромерных областях Y-хромосомы и X₁-хромосомы (Рис. 12: б). При этом на X₁-хромосоме наблюдается более яркий сигнал, чем на Y-хромосоме. Поскольку считается, что у двух исследуемых видов гекконов метацентрическая Y-хромосома сформировалась в результате робертсоновского слияния двух акроцентрических хромосом (Pokorná et al. 2010), можно было бы предположить, что уменьшение копийности последовательности CMI-Sat126H и практически полное исчезновение кластеров CMI-Sat11H (представленного на X₂-хромосоме) и CMI-Sat69H (представленного на X₁- и X₂-хромосомах) из состава Y-хромосомы могло произойти в ходе формирования нео-половых хромосом. Однако зонды к CMI-Sat126H, CMI-Sat11H и CMI-Sat69H не гибридизуются на метафазные хромосомы самки *C. elegans*, поэтому также можно предположить, что накопление

этих сателлитов на половых хромосомах *C. mitratus* могло произойти и после формирования нео-половых хромосом и расхождения этих двух видов. Вероятнее всего, обнаруженное явление связано с неравномерным накоплением этих последовательностей сатДНК на половых хромосомах *C. mitratus*. Обычно избыточное накопление повторяющихся элементов характерно только для Y- и W-хромосом, в то время как X- и Z-хромосомы остаются стабильными. Однако иногда повторяющиеся последовательности с Y- и W-хромосом могут перемещаться и накапливаться на X- и Z-хромосомах, как это произошло у некоторых полевок рода *Microtus* (Rovatsos et al. 2017c).

Поскольку гибридизация всех повторяющихся последовательностей, выделенных из геномной ДНК самца *C. mitratus*, с метафазными хромосомами самки *C. elegans* не показала детектируемых сигналов ни на аутосомах, ни на X₁- и X₂-хромосомах, мы предполагаем, что район вырождения на Y-хромосоме *C. elegans* может характеризоваться накоплением других последовательностей повторяющейся ДНК. Дальнейшие исследования, направленные на идентификацию повторяющейся элементов из геномной ДНК самца *C. elegans* и их локализацию на метафазных хромосомах, позволят более подробно описать процесс дегенерации Y-хромосомы у этого вида.

Таким образом, половые хромосомы двух исследованных видов gekkonov являются примером системы множественных половых хромосом, в составе которых задействованы синтенные группы, встречающиеся в составе половых хромосом как минимум у представителей трех крупных групп чешуйчатых (змей, gekkonov и игуан) и у утконоса, а районы гетерохроматина Y-хромосом, вероятнее всего, существенно отличаются по составу и представленности сатДНК.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сочетание цитогенетических и биоинформатических подходов позволяет проводить комплексный анализ генетического состава половых хромосом и дополнять современные представления об их эволюции. Сравнение результатов секвенирования хромосомоспецифичных ДНК библиотек с геномами референсных видов показало, что синтенные группы генов, вовлеченные в формирование половых хромосом у четырех исследованных видов (*Sceloporus malachiticus*, *Chamaeleo calyptratus*, *Coleonyx elegans*, *Coleonyx mitratus*), часто встречаются в составе половых хромосом у многих видов чешуйчатых. Этот результат предполагает, что в ходе эволюции половых хромосом у представителей данного таксона происходит конвергентное использование одних и тех же групп сцепления. Последовательности ДНК, полученные в результате секвенирования отдельных хромосомоспецифичных ДНК-библиотек, могут быть полезными для уточнения геномных сборок хромосомного уровня у исследуемых видов.

Биоинформатический поиск и физическое картирование последовательностей сатДНК с помощью FISH на хромосомах *S. malachiticus*, *C. calyptratus* и *C. mitratus* показали распределение наиболее представленных в геноме повторяющихся сателлитных последовательностей в кариотипах исследуемых видов. Большинство последовательностей сатДНК показали тенденцию к кластеризации в определенных хромосомных районах. Для гетерохроматиновых районов вырождающихся половых хромосом заборной игуаны и центральноамериканского геккона характерна сложная организация сателлитной ДНК, при этом большинство обнаруженных последовательностей сатДНК не являются специфичными для половых хромосом и могут входить в состав аутосом. В то же время, предполагаемые половые хромосомы йеменского хамелеона характеризуются отсутствием видимого накопления сатДНК, что подтверждает предположение об их низкой степени гетерохроматинизации. Некоторые обнаруженные последовательности сатДНК могут использоваться как маркеры отдельных хромосом благодаря их специфичности.

ВЫВОДЫ

1. Половые хромосомы заборной малахитовой игуаны (*Sceloporus malachiticus*) сформировались в результате слияния предковой половой хромосомы игуан клады Pleurodonta с четырьмя парами аутосом. Обнаруженные синтенные группы генов описаны в составе половых хромосом у многих видов чешуйчатых, что предполагает конвергентное использование этих групп в качестве генетического материала для формирования половых хромосом.
2. Процесс формирования блока конститутивного гетерохроматина на Y-хромосоме заборной малахитовой игуаны (*S. malachiticus*) сопровождался накоплением как минимум девяти последовательностей сателлитной ДНК.
3. Предполагаемой парой половых хромосом в кариотипе йеменского хамелеона (*Chamaeleo calyptratus*) является пара макрохромосом пять. В составе предполагаемых половых хромосом йеменского хамелеона не накапливаются последовательности сателлитной ДНК, что указывает на низкую степень вырожденности гомологов и свидетельствует об их относительно молодом эволюционном возрасте.
4. Последовательности предковой X-хромосомы игуан клады Pleurodonta входят в состав половых хромосом йеменского хамелеона (клада Acrodonta), что предполагает параллелизм в эволюции половых хромосом двух клад игуанообразных.
5. Половые хромосомы системы $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ юкатанского полосатого геккона (*Coleonyx elegans*) и центральноамериканского геккона (*Coleonyx mitratus*) являются ортологами. Синтенные группы, формирующие псевдоаутосомный район, частично ортологичны половым хромосомам змей, мраморного геккона и коричневого анолиса.
6. Несмотря на отсутствие выраженных блоков конститутивного гетерохроматина на половых хромосомах *C. mitratus*, перицентромерный район Y-хромосомы характеризуется накоплением как минимум пяти последовательностей сателлитной ДНК, которые не являются Y-специфичными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alam SMI, Sarre SD, Gleeson D, Georges A, Ezaz T (2018) Did lizards follow unique pathways in sex chromosome evolution? *Genes* 9: 20–28. <https://doi.org/10.3390/genes9050239>
2. Alföldi J, Di Palma F, Grabherr M, Williams C, Kong L, Mauceli E, Russell P, Lowe CB, Glor RE, Jaffe JD, Ray DA, Boissinot S, Shedlock AM, Botka C, Castoe TA, Colbourne JK, Fujita MK, Moreno RG, Ten Hallers BF, Haussler D, Heger A, Heiman D, Janes DE, Johnson J, De Jong PJ, Koriabine MY, Lara M, Novick PA, Organ CL, Peach SE, Poe S, Pollock DD, De Queiroz K, Sanger T, Searle S, Smith JD, Smith Z, Swofford R, Turner-Maier J, Wade J, Young S, Zadissa A, Edwards S V, Glenn TC, Schneider CJ, Losos JB, Lander ES, Breen M, Ponting CP, Lindblad-Toh K (2011) The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals. *Nature* 477: 587–591. <https://doi.org/10.1038/nature10390>
3. Altmanová M, Rovatsos M, Johnson Pokorná M, Veselý M, Wagner F, Kratochvíl L (2018) All iguana families with the exception of basilisks share sex chromosomes. *Zoology* 126: 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2017.11.007> Bachtrog D (2006) A dynamic view of sex chromosome evolution. *Current Opinion in Genetics and Development* 16: 578–585. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.10.007>
4. Bachtrog D, Mank JE, Peichel CL, Kirkpatrick M, Otto SP, Ashman TL, Hahn MW, Kitano J, Mayrose I, Ming R, Perrin N, Ross L, Valenzuela N, Vamosi JC, Mank JE, Peichel CL, Ashman TL, Blackmon H, Goldberg EE, Hahn MW, Kirkpatrick M, Kitano J, Mayrose I, Ming R, Pennell MW, Perrin N, Valenzuela N, Vamosi JC (2014) Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biology* 12: 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001899>
5. Bachtrog D, Kirkpatrick M, Mank JE, McDaniel SF, Pires JC, Rice WR, Valenzuela N (2011) Are all sex chromosomes created equal? *Trends in Genetics* 27: 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.05.005>
6. Baron D, Batista F, Chaffaux S, Cocquet J, Cotinot C, Cribiu E, De Baeree E, Guiguen Y, Jaubert F, Pailhoux E, Pannetier M, Vaiman D, Vigier B, Veitia R, Fellous M (2005) *Foxl2* gene and the development of the ovary: A story about goat, mouse, fish and woman. *Reproduction Nutrition Development* 45: 377–382. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005028>
7. Beklemisheva VR, Lemskaya NA, Prokopov DY, Perelman PL, Romanenko SA, Proskuryakova AA, Serdyukova NA, Utkin YA, Nie W, Ferguson-Smith MA, Yang F, Graphodatsky AS (2023) Maps of Constitutive-Heterochromatin Distribution for Four Martes Species (Mustelidae, Carnivora, Mammalia) Show the Formative Role of Macrosatellite Repeats in Interspecific Variation of Chromosome Structure. *Genes* 14. <https://doi.org/10.3390/genes14020489>
8. Bellott DW, Skaletsky H, Cho T-J, Brown L, Locke D, Chen N, Galkina S, Pyntikova

- T, Koutseva N, Graves T, Kremitzki C, Warren WC, Clark AG, Gaginskaya E, Wilson RK, David & (2017) Avian W and mammalian Y chromosomes convergently retained dosage-sensitive regulators. *Nature Publishing Group* 49. <https://doi.org/10.1038/ng.3778>
9. Benson G (1999) Tandem repeats finder: A program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 27: 573–580. <https://doi.org/10.1093/nar/27.2.573>
 10. Bergero R, Charlesworth D (2009) The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.010>
 11. Bergero R, Qiu S, Charlesworth D (2015) Gene loss from a plant sex chromosome system. *Current Biology* 25: 1234–1240. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.015>
 12. Bernardi G (1993) The vertebrate genome: Isochores and evolution. In: *Molecular Biology and Evolution*, 186–204. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a039994>
 13. Biscotti MA, Olmo E, Heslop-Harrison JS (Pat. (2015) Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Research* 23: 415–420. <https://doi.org/10.1007/s10577-015-9499-z>
 14. Bull JJ (1983) Evolution of sex determining mechanisms. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
 15. Camacho JPM, Schmid M, Cabrero J (2011) B Chromosomes and Sex in Animals. *Sexual Development* 5: 155–166. <https://doi.org/10.1159/000324930>
 16. Capel B (2017) Vertebrate sex determination: Evolutionary plasticity of a fundamental switch. *Nature Reviews Genetics* 18: 675–689. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.60>
 17. Chalopin D, Volff JN, Galiana D, Anderson JL, Scharl M (2015) Transposable elements and early evolution of sex chromosomes in fish. *Chromosome Research* 23: 545–560. <https://doi.org/10.1007/s10577-015-9490-8>
 18. Charlesworth B (1991) The Evolution of Sex Chromosomes. *Science* 251: 1030–1033. Available from: <http://science.sciencemag.org/> (May 29, 2021).
 19. Charlesworth D (2017) Evolution of recombination rates between sex chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372: 20160456. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0456>
 20. Charlesworth D (2021) When and how do sex-linked regions become sex chromosomes? *Evolution* 75: 569–581. <https://doi.org/10.1111/EVO.14196>

21. Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G (2005) Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* 95: 118–128. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800697>
22. Charlesworth D, Bergero R, Graham C, Gardner J, Keegan K (2021) How did the guppy Y chromosome evolve? *PLoS Genetics* 17: e1009704. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009704>
23. Chiari Y, Cahais V, Galtier N, Delsuc F (2012) Phylogenomic analyses support the position of turtles as the sister group of birds and crocodiles (Archosauria). *BMC Biology* 10: 1–15. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-65>
24. Ciofi C, Swingland IR (1997) Environmental sex determination in reptiles. *Applied Animal Behaviour Science* 51: 251–265. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(96\)01108-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(96)01108-2)
25. Clark FE, Kocher TD (2019) Changing sex for selfish gain: B chromosomes of Lake Malawi cichlid fish. *Scientific Reports* 9: 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55774-8>
26. Cortez D, Marin R, Toledo-Flores D, Froidevaux L, Liechti A, Waters PD, Grützner F, Kaessmann H (2014) Origins and functional evolution of y chromosomes across mammals. *Nature* 508: 488–493. <https://doi.org/10.1038/nature13151>
27. Costantini M, Cammarano R, Bernardi G (2009) The evolution of isochore patterns in vertebrate genomes. *BMC Genomics* 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-146>
28. Crepaldi C, Parise-Maltempi PP (2020) Heteromorphic Sex Chromosomes and Their DNA Content in Fish: An Insight through Satellite DNA Accumulation in *Megaleporinus elongatus*. *Cytogenetic and Genome Research* 160: 38–46. <https://doi.org/10.1159/000506265>
29. Crepaldi C, Martí E, Gonçalves ÉM, Martí DA, Parise-Maltempi PP (2021) Genomic Differences Between the Sexes in a Fish Species Seen Through Satellite DNAs. *Frontiers in Genetics* 12: 728670. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.728670>
30. Crow JF (1994) Advantages of sexual reproduction. *Developmental Genetics* 15: 205–213. <https://doi.org/10.1002/dvg.1020150303>
31. Cui Z, Liu Y, Wang W, Wang Q, Zhang N, Lin F, Wang N, Shao C, Dong Z, Li Y, Yang Y, Hu M, Li H, Gao F, Wei Z, Meng L, Liu Y, Wei M, Zhu Y, Guo H, Cheng CHK, Scharl M, Chen S (2017) Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Scientific Reports* 7: 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep42213>
32. Deakin JE, Edwards MJ, Patel H, O’meally D, Lian J, Stenhouse R, Ryan S, Livernois

- AM, Azad B, Holleley CE, Li Q, Georges A (2016) Anchoring genome sequence to chromosomes of the central bearded dragon (*Pogona vitticeps*) enables reconstruction of ancestral squamate macrochromosomes and identifies sequence content of the Z chromosome. *BMC Genomics* 17: 447. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2774-3>
33. Deakin JE, Potter S, O'Neill R, Ruiz-Herrera A, Cioffi MB, Eldridge MDB, Fukui K, Marshall Graves JA, Griffin D, Grutzner F, Kratochvíl L, Miura I, Rovatsos M, Srikulnath K, Wapstra E, Ezaz T (2019) Chromosomics: Bridging the Gap between Genomes and Chromosomes. *Genes* 10: 627. <https://doi.org/10.3390/genes10080627>
 34. Eyre-Walker A, Hurst LD (2001) The evolution of isochores. *Nature Reviews Genetics* 2: 549–555. <https://doi.org/10.1038/35080577>
 35. Ezaz T, Deakin JE (2014) Repetitive Sequence and Sex Chromosome Evolution in Vertebrates. *Advances in Evolutionary Biology* 2014: 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/104683>
 36. Ezaz T, Srikulnath K, Graves JAM (2017) Origin of amniote sex chromosomes: An ancestral super-sex chromosome, or common requirements? *Journal of Heredity* 108: 94–105. <https://doi.org/10.1093/jhered/esw053>
 37. Ezaz T, Stiglec R, Veyrunes F, Marshall Graves JA (2006) Relationships between Vertebrate ZW and XY Sex Chromosome Systems. *Current Biology* 16: R736–R743. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.021>
 38. Ezaz T, Quinn AE, Miura I, Sarre SD, Georges A, Graves JAM (2005) The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes. *Chromosome Research* 13: 763–776. <https://doi.org/10.1007/s10577-005-1010-9>
 39. Figuet E, Ballenghien M, Romiguier J, Galtier N (2015) Biased gene conversion and GC-content evolution in the coding sequences of reptiles and vertebrates. *Genome Biology and Evolution* 7: 240–250. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu277>
 40. Flynn JM, Hubley R, Goubert C, Rosen J, Clark AG, Feschotte C, Smit AF (2020) RepeatModeler2 for automated genomic discovery of transposable element families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117: 9451–9457. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921046117>
 41. Fujita MK, Edwards S V, Ponting CP (2011) The *Anolis* lizard genome: an amniote genome without isochores. *Genome Biology* 3: 974–84. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr072>
 42. Furman BLS, Metzger DCH, Darolti I, Wright AE, Sandkam BA, Almeida P, Shu JJ, Mank JE, Fraser B (2020) Sex Chromosome Evolution: So Many Exceptions to the Rules. *Genome Biology and Evolution* 12: 750–763. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa081>

43. Gamble T (2010) A review of sex determining mechanisms in geckos (Gekkota: Squamata). *Sexual Development* 4: 88–103. <https://doi.org/10.1159/000289578>
44. Gamble T, Greenbaum E, Jackman TR, Bauer AM (2015a) Into the light: diurnality has evolved multiple times in geckos. *Biological Journal of the Linnean Society* 115: 896–910. <https://doi.org/10.1111/bij.12536>
45. Gamble T, Coryell J, Ezaz T, Lynch J, Scantlebury DP, Zarkower D (2015b) Restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq) reveals an extraordinary number of transitions among gecko sex-determining systems. *Molecular Biology and Evolution* 32: 1296–1309. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv023>
46. Gamble T, Castoe TA, Nielsen S V., Banks JL, Card DC, Schield DR, Schuett GW, Booth W (2017) The Discovery of XY Sex Chromosomes in a Boa and Python. *Current Biology* 27: 2148–2153.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.010>
47. Gatto KP, Mattos J V., Seger KR, Lourenço LB (2018) Sex chromosome differentiation in the frog genus *Pseudis* involves satellite DNA and chromosome rearrangements. *Frontiers in Genetics* 9: 371621. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00301>
48. Ge C, Ye J, Weber C, Sun W, Zhang H, Zhou Y, Cai C, Qian G, Capel B (2018) The histone demethylase KDM6B regulates temperature-dependent sex determination in a turtle species. *Science* 360: 645–648. <https://doi.org/10.1126/science.aap8328>
49. Giovannotti M, Trifonov VA, Paoletti & A, Kichigin IG, O'brien PCM, Kasai F, Giovagnoli & G, Ng BL, Ruggeri & P, Cerioni & PN, Splendiani & A, Pereira JC, Olmo E, Rens & W, Caputo Barucchi V, Ferguson-Smith MA (2017) New insights into sex chromosome evolution in anole lizards (Reptilia, Dactyloidae). *Chromosoma* 126: 245–260. <https://doi.org/10.1007/s00412-016-0585-6>
50. Gorman G (1973) The chromosomes of the Reptilia: a cytotoxic interpretation. In: Chiarelli B, Cappana E (Eds), *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*. Academic Press, London, 349–424.
51. Graves JAM (2016) Evolution of vertebrate sex chromosomes and dosage compensation. *Nature Reviews Genetics* 17: 33–46. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.2>
52. Green DM, Zeyl CW, Sharbel TF (1993) The evolution of hypervariable sex and supernumerary (B) chromosomes in the relict New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. *Journal of Evolutionary Biology* 6: 417–441. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1993.6030417.x>
53. Gu L, Walters JR (2017) Evolution of sex chromosome dosage compensation in

- animals: A beautiful theory, undermined by facts and bedeviled by details. *Genome Biology and Evolution* 9: 2461–2476. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx154>
54. Hall WP (2009) Chromosome variation, genomics, speciation and evolution in *Sceloporus* lizards. *Cytogenetic and Genome Research* 127: 143–165. <https://doi.org/10.1159/000304050>
 55. Hansson A, Olsson M (2018) Incubation temperature and parental identity determine sex in the Australian agamid lizard *Ctenophorus pictus*. *Ecology and Evolution* 8: 9827–9833. <https://doi.org/10.1002/ece3.4466>
 56. Hattori RS, Murai Y, Oura M, Masuda S, Majhi SK, Sakamoto T, Fernandino JI, Somoza GM, Yokota M, Strüssmann CA (2012) A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 2955–2959. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018392109>
 57. Hedges SB, Marin J, Suleski M, Paymer M, Kumar S (2015) Tree of life reveals clock-like speciation and diversification. *Molecular Biology and Evolution* 32: 835–845. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv037>
 58. Herpin A, Braasch I, Kraeussling M, Schmidt C, Thoma EC, Nakamura S, Tanaka M, Scharl M (2010) Transcriptional Rewiring of the Sex Determining *dmrt1* Gene Duplicate by Transposable Elements. *PLOS Genetics* 6: e1000844. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1000844>
 59. Iannucci A, Makunin AI, Lisachov AP, Ciofi C, Stanyon R, Svartman M, Trifonov VA (2021) Bridging the gap between vertebrate cytogenetics and genomics with single-chromosome sequencing (Chromseq). *Genes* 12: 1–13. <https://doi.org/10.3390/genes12010124>
 60. Ieda R, Hosoya S, Tajima S, Atsumi K, Kamiya T, Nozawa A, Aoki Y, Tasumi S, Koyama T, Nakamura O, Suzuki Y, Kikuchi K (2018) Identification of the sex-determining locus in grass puffer (*Takifugu niphobles*) provides evidence for sex-chromosome turnover in a subset of *Takifugu* species. *PLoS ONE* 13: e0190635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190635>
 61. Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Research* 19: 4780. <https://doi.org/10.1093/nar/19.17.4780>
 62. Imarazene B, Du K, Beille S, Jouanno E, Feron R, Pan Q, Torres-Paz J, Lopez-Roques C, Castinel A, Gil L, Kuchly C, Donnadieu C, Parrinello H, Journot L, Cabau C, Zahm M, Klopp C, Pavlica T, Al-Rikabi A, Liehr T, Simanovsky SA, Bohlen J, Sember A, Perez J, Veyrunes F, Mueller TD, Postlethwait JH, Scharl M, Herpin A, Rétaux S, Guiguen Y (2021) A supernumerary “B-sex” chromosome drives male sex determination in the Pachón cavefish, *Astyanax mexicanus*. *Current Biology* 31: 4800–

4809.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.08.030>

63. Jesionek W, BodlÁková M, Kubát Z, Čegan R, Vyskot B, Vrána J, Safar J, Puterova J, Hobza R (2021) Fundamentally different repetitive element composition of sex chromosomes in *Rumex acetosa*. *Annals of Botany* 127: 33–47. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa160>
64. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL (2008) NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic acids research* 36: 5–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>
65. Kamiya T, Kai W, Tasumi S, Oka A, Matsunaga T, Mizuno N, Fujita M, Suetake H, Suzuki S, Hosoya S, Tohari S, Brenner S, Miyadai T, Venkatesh B, Suzuki Y, Kikuchi K (2012) A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). *PLoS Genetics* 8: e1002798. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002798>
66. Kasai F, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA (2019) Squamate chromosome size and GC content assessed by flow karyotyping. *Cytogenetic and Genome Research* 157: 46–52. <https://doi.org/10.1159/000497265>
67. Kawagoshi T, Uno Y, Matsubara K, Matsuda Y, Nishida C (2009) 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* 125: 125–131. <https://doi.org/10.1159/000227837>
68. Keating SE, Greenbaum E, Johnson JD, Gamble T (2022) Identification of a cis-sex chromosome transition in banded geckos (*Coleonyx*, Eublepharidae, Gekkota). *Journal of Evolutionary Biology* 35: 1675–1682. <https://doi.org/10.1111/jeb.14022>
69. Kichigin IG, Giovannotti M, Makunin AI, Ng BL, Kabilov MR, Tupikin AE, Caputo Barucchi V, Splendiani A, Ruggeri P, Rens W, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, Graphodatsky AS, Trifonov VA (2016) Evolutionary dynamics of *Anolis* sex chromosomes revealed by sequencing of flow sorting-derived microchromosome-specific DNA. *Molecular Genetics and Genomics* 291: 1955–1966. <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1230-z>
70. Kiefer JC, Muhr J, Kelsh R (2007) Back to Basics: Sox Genes. *Developmental Dynamics* 236: 2356–2366. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21218>
71. Kohany O, Gentles AJ, Hankus L, Jurka J (2006) Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. *BMC Bioinformatics* 7: 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-474>
72. Kostmann A, Kratochvíl L, Rovatsos M (2021) Poorly differentiated XX/XY sex chromosomes are widely shared across skink radiation. *Proceedings of the Royal*

Society B: Biological Sciences 288: 20202139.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2020.2139>

73. Kratochvíl L, Stöck M, Rovatsos M, Bullejos M, Herpin A, Jeffries DL, Peichel CL, Perrin N, Valenzuela N, Pokorná M (2021a) Expanding the classical paradigm: what we have learnt from vertebrates about sex chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 376: 20200097. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0097>
74. Kratochvíl L, Gamble T, Rovatsos M (2021b) Sex chromosome evolution among amniotes: Is the origin of sex chromosomes non-random? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 376: 20200108. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0108>
75. Kretschmer R, Toma GA, Deon GA, dos Santos N, dos Santos RZ, Utsunomia R, Porto-Foresti F, Gunski RJ, Garnero ADV, Liehr T, de Oliveira EHC, de Freitas TRO, Cioffi M de B (2024) Satellitome Analysis in the Southern Lapwing (*Vanellus chilensis*) Genome: Implications for SatDNA Evolution in Charadriiform Birds. *Genes* 15: 1–12. <https://doi.org/10.3390/genes15020258>
76. Kretschmer R, Goes CAG, Bertollo LAC, Ezaz T, Porto-Foresti F, Toma GA, Utsunomia R, de Bello Cioffi M (2022) Satellitome analysis illuminates the evolution of ZW sex chromosomes of Triportheidae fishes (Teleostei: Characiformes). *Chromosoma* 131: 29–45. <https://doi.org/10.1007/s00412-022-00768-1>
77. Kuhl H, Guiguen Y, Höhne C, Kreuz E, Du K, Klopp C, Lopez-Roques C, Yebra-Pimentel ES, Ciorpac M, Gessner J, Holostenco D, Kleiner W, Kohlmann K, Lamatsch DK, Prokopov D, Bestin A, Bonpunt E, Debeuf B, Haffray P, Morvezen R, Patrice P, Suciu R, Dirks R, Wuertz S, Kloas W, Scharl M, Stöck M (2021) A 180 Myr-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 376: 20200089. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0089>
78. Lang JW, Andrews H V (1994) Temperature-dependent sex determination in crocodilians. *Journal of Experimental Zoology* 270: 28–44. <https://doi.org/10.1002/jez.1402700105>
79. Leaché AD, Sites JW (2010) Chromosome evolution and diversification in north american spiny lizards (Genus *Sceloporus*). *Cytogenetic and Genome Research* 127: 166–181. <https://doi.org/10.1159/000293285>
80. Leaché AD, Banbury BL, Linkem CW, De Oca ANM (2016) Phylogenomics of a rapid radiation: Is chromosomal evolution linked to increased diversification in north american spiny lizards (Genus *Sceloporus*)? *BMC Evolutionary Biology* 16: 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0628-x>

81. Lee MSY (2013) Turtle origins: Insights from phylogenetic retrofitting and molecular scaffolds. *Journal of Evolutionary Biology* 26: 2729–2738. <https://doi.org/10.1111/jeb.12268>
82. Li M, Shi H, Kocher T (2015) A Tandem Duplicate of Anti-Müllerian Hormone with a Missense SNP on the Y Chromosome Is Essential for Male Sex Determination in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *PLOS Genetics* 11: e1005678. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005678>
83. Li SF, Zhang GJ, Yuan JH, Deng CL, Gao WJ (2016) Repetitive sequences and epigenetic modification: inseparable partners play important roles in the evolution of plant sex chromosomes. *Planta* 243: 1083–1095. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2485-7>
84. Li XY, Gui JF (2018) Diverse and variable sex determination mechanisms in vertebrates. *Science China Life Sciences* 61: 1503–1514. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9415-7>
85. Liehr T, Kreskowski K, Ziegler M, Piaszinski K, Rittscher K (2016) The Standard FISH Procedure. In: *Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH)*. Berlin, 109–118. https://doi.org/10.1007/978-3-662-52959-1_9
86. Liew WC, Bartfai R, Lim Z, Sreenivasan R, Siegfried KR, Orban L (2012) Polygenic sex determination system in zebrafish. *PLoS ONE* 7: e34397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034397>
87. Lind AL, Lai YYY, Mostovoy Y, Holloway AK, Iannucci A, Mak ACY, Fondi M, Orlandini V, Eckalbar WL, Milan M, Rovatsos M, Kichigin IG, Makunin AI, Johnson Pokorná M, Altmanová M, Trifonov VA, Schijlen E, Kratochvíl L, Fani R, Velenský P, Rehák I, Patarnello T, Jessop TS, Hicks JW, Ryder OA, Mendelson JR, Ciofi C, Kwok PY, Pollard KS, Bruneau BG (2019) Genome of the Komodo dragon reveals adaptations in the cardiovascular and chemosensory systems of monitor lizards. *Nature Ecology and Evolution* 3: 1241–1252. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0945-8>
88. Lisachov A, Rumyantsev A, Prokopov D, Ferguson-Smith M, Trifonov V (2023) Conservation of Major Satellite DNAs in Snake Heterochromatin. *Animals* 13: 334. <https://doi.org/10.3390/ANI13030334/S1>
89. Lisachov AP, Makunin AI, Giovannotti M, Pereira JC, Druzhkova AS, Caputo Barucchi V, Ferguson-Smith MA, Trifonov VA (2019) Genetic Content of the Neo-Sex Chromosomes in *Ctenonotus* and *Norops* (Squamata, Dactyloidae) and Degeneration of the Y Chromosome as Revealed by High-Throughput Sequencing of Individual Chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 157: 115–122. <https://doi.org/10.1159/000497091>
90. Maden BEH, Dent CL, Farrell TE, Garde J, McCallum FS, Wakeman JA (1987)

Clones of human ribosomal DNA containing the complete 18 S-rRNA and 28 S-rRNA genes. Characterization, a detailed map of the human ribosomal transcription unit and diversity among clones. *Biochemical Journal* 246: 519–527. <https://doi.org/10.1042/bj2460519>

91. Makunin AI, Kichigin IG, Larkin DM, O'brien PCM, Ferguson-Smith MA, Yang F, Proskuryakova AA, Vorobieva N V, Chernyaeva EN, O'brien SJ, Graphodatsky AS, Trifonov VA (2016) Contrasting origin of B chromosomes in two cervids (Siberian roe deer and grey brocket deer) unravelled by chromosome-specific DNA sequencing. *BMC Genomics* 17: 618. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2933-6>
92. Marin R, Cortez D, Lamanna F, Pradeepa MM, Leushkin E, Julien P, Liechti A, Halbert J, Brüning T, Mössinger K, Trefzer T, Conrad C, Kerver HN, Wade J, Tschopp P, Kaessmann H (2017) Convergent origination of a *Drosophila*-like dosage compensation mechanism in a reptile lineage. *Genome Research* 27: 1974–1987. <https://doi.org/10.1101/gr.223727.117>
93. Marshall Graves JA, Shetty S (2000) Comparative Genomics of Vertebrates and the Evolution of Sex Chromosomes. In: Clark M (Ed.), *Comparative Genomics*. Springer US, London: Kluwer, 153–205. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4657-3_7
94. Matson CK, Zarkower D (2012) Sex and the singular DM domain: Insights into sexual regulation, evolution and plasticity. *Nature Reviews Genetics* 13: 163–174. <https://doi.org/10.1038/nrg3161>
95. Matsubara K, Tarui H, Toriba M, Yamada K, Nishida-Umehara C, Agata K, Matsuda Y (2006) 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 of the United States of America* 103: 18190–18195. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605274103>
96. Matsuda M, Nagama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M (2002) DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417: 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature751>
97. Mazzoleni S, Augstenová B, Clemente L, Auer M, Fritz U, Praschag P, Protiva T, Velenský P, Kratochvíl L, Rovatsos M (2020) Sex is determined by XX/XY sex chromosomes in Australasian side-necked turtles (Testudines: Chelidae). *Scientific Reports* 10: 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61116-w>
98. Merchant-Larios H, Diaz-Hernandez V (2013) Environmental Sex Determination Mechanisms in Reptiles Regulation. *Sexual Development* 7: 95–103. <https://doi.org/10.1159/000341936>
99. Miura I (2018) Sex determination and sex chromosomes in Amphibia. *Sexual*

Development 11: 298–306. <https://doi.org/10.1159/000485270>

100. Miura I, Ohtani H, Ogata M (2012) Independent degeneration of W and y sex chromosomes in frog *Rana rugosa*. *Chromosome Research* 20: 47–55. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9258-8>
101. Modesto SP, Anderson JS (2004) The phylogenetic definition of reptilia. *Systematic Biology* 53: 815–821. <https://doi.org/10.1080/10635150490503026>
102. Moore EC, Roberts RB (2013) Polygenic sex determination. *Current Biology* 23: R510–R512. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.004>
103. Morescalchi A (1977) Phylogenetic Aspects of Karyological Evidence. In: *Major Patterns in Vertebrate Evolution*. Springer US, 149–167. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8851-7_7
104. Myosho T, Otake H, Masuyama H, Matsuda M, Kuroki Y, Fujiyama A, Naruse K, Hamaguchi S, Sakaizumi M (2012) Tracing the Emergence of a Novel Sex-Determining Gene in Medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics* 191: 163–170. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.137497>
105. Nanda I, Zend-Ajus E, Shan Z, Grützner F, Scharl M, Burt DW, Koehler M, Fowler VM, Goodwill G, Schneider WJ, Mizuno S, Dechant G, Haaf T, Schmid M (2000) Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene DMRT1: A comparative (re)view on avian sex determination. *Cytogenetics and Cell Genetics* 89: 67–78. <https://doi.org/10.1159/000015567>
106. Nandi SS, Ghosh P, Roy SS (2011) Expression of PITX2 homeodomain transcription factor during rat gonadal development in a sexually dimorphic manner. *Cellular Physiology and Biochemistry* 27: 159–170. <https://doi.org/10.1159/000325218>
107. Natri HM, Shikano T, Merilä J (2013) Progressive recombination suppression and differentiation in recently evolved neo-sex chromosomes. *Molecular Biology and Evolution* 30: 1131–1144. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst035>
108. Negri I, Pellicchia M, Mazzoglio PJ, Patetta A, Alma A (2006) Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/XO sex-determination system. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273: 2409–2416. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3592>
109. Nielsen S V., Banks JL, Diaz RE, Trainor PA, Gamble T (2018) Dynamic sex chromosomes in Old World chameleons (Squamata: Chamaeleonidae). *Journal of Evolutionary Biology* 31: 484–490. <https://doi.org/10.1111/jeb.13242>

110. Nielsen S V., Guzmán-Méndez IA, Gamble T, Blumer M, Pinto BJ, Kratochvíl L, Rovatsos M (2019) Escaping the evolutionary trap? Sex chromosome turnover in basilisks and related lizards (Corytophanidae: Squamata). *Biology Letters* 15. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0498>
111. Novák P, Neumann P, Pech J, Steinhaisl J, MacAs J (2013) RepeatExplorer: A Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics* 29: 792–793. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt054>
112. Novák P, Robledillo LÁ, Koblížková A, Vrbová I, Neumann P, Macas J (2017) TAREAN: A computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. *Nucleic Acids Research* 45: 111. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx257>
113. O'Meally D, Ezaz T, Georges A, Sarre SD, Graves JAM (2012) Are some chromosomes particularly good at sex? Insights from amniotes. *Chromosome Research* 20: 7–19. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9266-8>
114. Olmo E (1986) *Animal Cytogenetics: Chordata. Reptilia*. John (Ed.). Gebrueder Borntraeger, Berlin-Stuttgart, 1–100 pp.
115. Olmo E (2008) Trends in the evolution of reptilian chromosomes. *Integrative and Comparative Biology* 48: 486–493. <https://doi.org/10.1093/icb/icn049>
116. Otto SP, Pannell JR, Peichel CL, Ashman TL, Charlesworth D, Chippindale AK, Delph LF, Guerrero RF, Scarpino S V., McAllister BF (2011) About PAR: The distinct evolutionary dynamics of the pseudoautosomal region. *Trends in Genetics* 27: 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.05.001>
117. Pan Q, Kay T, Depincé A, Adolphi M, Scharl M, Guiguen Y, Herpin A (2021) Evolution of master sex determiners: TGF- β signalling pathways at regulatory crossroads. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 376: 20200091. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0091>
118. Papadopoulos AST, Chester M, Ridout K, Filatov DA (2015) Rapid y degeneration and dosage compensation in plant sex chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 13021–13026. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508454112>
119. Payer B, Lee JT (2008) X chromosome dosage compensation: How mammals keep the balance. *Annual Review of Genetics* 42: 733–772. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091711>
120. Pellegrini M, Pantano S, Lucchini F, Fumi M, Forabosco A (1997) *Emx2* developmental expression in the primordia of the reproductive and excretory systems.

Anatomy and embryology 196: 427–433.

121. Pennell MW, Mank JE, Peichel CL (2018) Transitions in sex determination and sex chromosomes across vertebrate species. *Molecular Ecology* 27: 3950–3963. <https://doi.org/10.1111/mec.14540>
122. Pensabene E, Kratochvíl L, Rovatsos M (2020) Independent evolution of sex chromosomes in eublepharid geckos, a lineage with environmental and genotypic sex determination. *Life* 10: 1–11. <https://doi.org/10.3390/life10120342>
123. Pinto BJ, Gamble T, Smith CH, Wilson MA (2023) A lizard is never late: Squamate genomics as a recent catalyst for understanding sex chromosome and microchromosome evolution. *Journal of Heredity* 114: 445–458. <https://doi.org/10.1093/jhered/esad023>
124. Pokorná M, Rábová M, Ráb P, Ferguson-Smith MA, Rens W, Kratochvíl L (2010) Differentiation of sex chromosomes and karyotypic evolution in the eye-lid geckos (Squamata: Gekkota: Eublepharidae), a group with different modes of sex determination. *Chromosome Research* 18: 809–820. <https://doi.org/10.1007/s10577-010-9154-7>
125. Pokorná MJ, Kratochvíl L (2009) Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: Are sex chromosomes an evolutionary trap? *Zoological Journal of the Linnean Society* 156: 168–183. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2008.00481.x>
126. Pokorná MJ, Kratochvil L (2016) What was the ancestral sex-determining mechanism in amniote vertebrates? *Biological Reviews* 91: 1–12. <https://doi.org/10.1111/brv.12156>
127. Pokorná MJ, Trifonov VA, Rens W, Ferguson-Smith MA, Kratochvíl L (2015) Low rate of interchromosomal rearrangements during old radiation of gekkotan lizards (Squamata: Gekkota). *Chromosome Research* 23: 299–309. <https://doi.org/10.1007/s10577-015-9468-6>
128. Polanco JC, Wilhelm D, Davidson TL, Knight D, Koopman P (2010) Sox10 gain-of-function causes XX sex reversal in mice: implications for human 22q-linked disorders of sex development. *Human Molecular Genetics* 19: 506–516. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDP520>
129. Ponnikas S, Sigeman H, Abbott JK, Hansson B (2018) Why Do Sex Chromosomes Stop Recombining? *Trends in Genetics* 34: 492–503. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.04.001>
130. Proskuryakova AA, Kulemzina AI, Perelman PL, Makunin AI, Larkin DM, Farré M, Kukekova A V., Lynn Johnson J, Lemskaya NA, Beklemisheva VR, Roelke-Parker ME, Bellizzi J, Ryder OA, O'Brien SJ, Graphodatsky AS (2017) X chromosome

evolution in cetartiodactyla. *Genes* 8: 216. <https://doi.org/10.3390/genes8090216>

131. Pyron R, Burbrink FT, Wiens JJ (2013) A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology* 13: 93. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-93>
132. Pyron RA, Burbrink FT (2014) Early origin of viviparity and multiple reversions to oviparity in squamate reptiles. *Ecology Letters* 17: 13–21. <https://doi.org/10.1111/ele.12168>
133. Quinn AE, Georges A, Sarre SD, Guarino F, Ezaz T, Graves JAM (2007) Temperature sex reversal implies sex gene dosage in a reptile. *Science* 316: 411. <https://doi.org/10.1126/science.1135925>
134. Radder RS, Quinn AE, Georges A, Sarre SD, Shine R (2008) Genetic evidence for co-occurrence of chromosomal and thermal sex-determining systems in a lizard. *Biology Letters* 4: 176–178. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0583>
135. Reichwald K, Petzold A, Koch P, Downie BR, Hartmann N, Pietsch S, Baumgart M, Chalopin D, Felder M, Bens M, Sahm A, Szafranski K, Taudien S, Groth M, Arisi I, Weise A, Bhatt SS, Sharma V, Kraus JM, Schmid F, Priebe S, Liehr T, Görlach M, Than ME, Hiller M, Kestler HA, Volff JN, Scharl M, Cellerino A, Englert C, Platzer M (2015) Insights into Sex Chromosome Evolution and Aging from the Genome of a Short-Lived Fish. *Cell* 163: 1527–1538. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.071>
136. Romanenko SA, Biltueva LS, Serdyukova NA, Kulemzina AI, Beklemisheva VR, Gladkikh OL, Lemskaya NA, Interesova EA, Korentovich MA, Vorobieva N V, Graphodatsky AS, Trifonov VA (2015) Segmental paleotetraploidy revealed in sterlet (*Acipenser ruthenus*) genome by chromosome painting. *Molecular cytogenetics* 8: 90. <https://doi.org/10.1186/s13039-015-0194-8>
137. Rovatsos M, Altmanová M, Pokorná M, Kratochvíl L (2014) Conserved sex chromosomes across adaptively radiated anolis lizards. *Evolution* 68: 2079–2085. <https://doi.org/10.1111/evo.12357>
138. Rovatsos M, Vukić J, Lymberakis P, Kratochvíl L (2015) Evolutionary stability of sex chromosomes in snakes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1992>
139. Rovatsos M, Praschag P, Fritz U, Kratochvíl L (2017a) Stable Cretaceous sex chromosomes enable molecular sexing in softshell turtles (Testudines: Trionychidae). *Scientific Reports* 7: 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep42150>
140. Rovatsos M, Farkačová K, Altmanová M, Johnson Pokorná M, Kratochvíl L (2019a) The rise and fall of differentiated sex chromosomes in geckos. *Molecular Ecology* 28: 3042–3052. <https://doi.org/10.1111/mec.15126>

141. Rovatsos M, Altmanová M, Pokorná MJ, Velenský P, Baca AS, Kratochvíl L (2017b) Evolution of karyotypes in chameleons. *Genes* 8: 1–16. <https://doi.org/10.3390/genes8120382>
142. Rovatsos M, Altmanová M, Augstenová B, Mazzoleni S, Velenský P, Kratochvíl L (2019b) ZZ/ZW sex determination with multiple neo-sex chromosomes is common in madagascan chameleons of the genus *Furcifer* (Reptilia: Chamaeleonidae). *Genes* 10: 1–14. <https://doi.org/10.3390/genes10121020>
143. Rovatsos M, Gamble T, Nielsen S, Georges A, Ezaz T, Kratochvíl L (2021) Do male and female heterogamety really differ in expression regulation? Lack of global dosage balance in pygopodid geckos. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 376: 20200102. <https://doi.org/10.1101/2020.06.03.132241>
144. Rovatsos M, Mazzoleni S, Augstenová B, Altmanová M, Velenský P, Glaw F, Sanchez A, Kratochvíl L (2024) Heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes sharing gene content with mammalian XX/XY are conserved in Madagascan chameleons of the genus *Furcifer*. *Scientific Reports* 14: 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55431-9>
145. Rovatsos MT, Marchal JA, Romero-Fernández I, Arroyo M, Athanasopoulou EB, Sánchez A (2017c) Extensive Sex Chromosome Polymorphism of *Microtus thomasi*/*Microtus atticus* Species Complex Associated with Cryptic Chromosomal Rearrangements and Independent Accumulation of Heterochromatin. *Cytogenetic and Genome Research* 151: 198–207. <https://doi.org/10.1159/000477114>
146. Sambrook J, Russell DW (2006) Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols* 2006: pdb.prot4455. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4455>
147. Scharl M, Schories S, Wakamatsu Y, Nagao Y, Hashimoto H, Bertin C, Mourot B, Schmidt C, Wilhelm D, Centanin L, Guiguen Y, Herpin A (2018) Sox5 is involved in germ-cell regulation and sex determination in medaka following co-option of nested transposable elements. *BMC Biology* 16: 1–17. <https://doi.org/10.1186/S12915-018-0485-8/FIGURES/8>
148. Scharl M, Schmid M, Nanda I (2016) Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. *Chromosoma* 125: 553–571. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0569-y>
149. Schmid M, Feichfinger W, Wanda I, Schakowski R, Garcia RV, Puppo JM, Badillo AF (1994) An extraordinarily low diploid chromosome number in the reptile *Gonatodes taniae* (Squamata, Gekkonidae). *Journal of Heredity* 85: 255–260.
150. Ser JR, Roberts RB, Kocher TD (2010) Multiple interacting loci control sex

- determination in Lake Malawi cichlid fish. *Evolution* 64: 486–501. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00871.x>
151. Shan Z, Nanda I, Wang Y, Schmid M, Vortkamp A, Haaf T (2000) Sex-specific expression of an evolutionarily conserved male regulatory gene, DMRT1, in birds. *Cytogenetics and Cell Genetics* 89: 252–257. <https://doi.org/10.1159/000015626>
 152. Sheeley SL, Mcallister BF (2009) Mobile male-killer: similar Wolbachia strains kill males of divergent *Drosophila* hosts. *Heredity* 102: 286–292. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.126>
 153. Sidhom M, Said K, Chatti N, Guarino FM, Odierna G, Petraccioli A, Picariello O, Mezzasalma M (2020) Karyological characterization of the common chameleon (*Chamaeleo chamaeleon*) provides insights on the evolution and diversification of sex chromosomes in Chamaeleonidae. *Zoology* 141: 125738. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2019.125738>
 154. Da Silva MJ, Fogarin Destro R, Gazoni T, Narimatsu H, Pereira Dos Santos PS, Haddad CFB, Parise-Maltempi PP (2020) Great Abundance of Satellite DNA in Proceratophrys (Anura, Odontophrynidae) Revealed by Genome Sequencing. *Cytogenetic and Genome Research* 160: 141–147. <https://doi.org/10.1159/000506531>
 155. Singh L, Purdom IF, Jones KW (1980) Sex chromosome associated satellite DNA: Evolution and conservation. *Chromosoma* 79: 137–157. <https://doi.org/10.1007/BF01175181>
 156. de Smet W. H. O. (1981) *Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia* (Belgium) Description of the orcein stained karyotypes of 27 lizards species (Lacertilia, Reptilia) belonging to the families Iguanidae, Agamidae, Chameleontidae and Gekkonidae (Ascalabota).
 157. Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, Cummins DM, Farlie PG, Doran TJ, Sinclair AH (2009) The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461: 261–271. <https://doi.org/10.1038/nature08298>
 158. Srikulnath K, Uno Y, Nishida C, Matsuda Y (2013) Karyotype evolution in monitor lizards: Cross-species chromosome mapping of cDNA reveals highly conserved synteny and gene order in the Toxicofera clade. *Chromosome Research* 21: 805–819. <https://doi.org/10.1007/s10577-013-9398-0>
 159. Srikulnath K, Uno Y, Nishida C, Ota H, Matsuda Y (2015) Karyotype reorganization in the Hokou Gecko (*Gekko hokouensis*, Gekkonidae): The process of microchromosome disappearance in Gekkota. *PLoS ONE* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134829>
 160. Srikulnath K, Matsubara K, Uno Y, Nishida C, Olsson M, Matsuda Y (2014)

- 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* 123: 563–575. <https://doi.org/10.1007/s00412-014-0467-8>
161. Standora EA, Spotila JR (1985) Temperature Dependent Sex Determination in Sea Turtles. *Copeia* 1985: 711. <https://doi.org/10.2307/1444765>
 162. Stanyon R, Galleni L (1991) A rapid fibroblast culture technique for high resolution karyotypes A rapid fibroblast culture technique for high resolution karyotypes. *Italian Journal of Zoology* 58: 81–83. <https://doi.org/10.1080/11250009109355732>
 163. Straub T, Becker PB (2007) Dosage compensation: The beginning and end of generalization. *Nature Reviews Genetics* 8: 47–57. <https://doi.org/10.1038/nrg2013>
 164. Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304–306. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90558-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90558-7)
 165. Sutton E, Hughes J, White S, Sekido R, Tan J, Arboleda V, Rogers N, Knowler K, Rowley L, Eyre H, Rizzoti K, Mcaninch D, Goncalves J, Slee J, Turbitt E, Bruno D, Bengtsson H, Harley V, Vilain E, Sinclair A, Lovell-Badge R, Thomas P (2011) Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *The Journal of Clinical Investigation* 121: 328–341. <https://doi.org/10.1172/JCI42580>
 166. Takehana Y, Myosho T, Kawakami K (2014) Co-option of Sox3 as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*. *Nature Communications* 5: 4157. <https://doi.org/10.1038/ncomms5157>
 167. Talbert PB, Henikoff S (2010) Centromeres Convert but Don't Cross. *PLoS Biology* 8: e1000326. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000326>
 168. Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BAJ, Tunnacliffe A (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13: 718–725. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90147-K](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90147-K)
 169. Thakur J, Packiaraj J, Henikoff S (2021) Sequence, Chromatin and Evolution of Satellite DNA. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 4309.
 170. Todd E V., Ortega-Recalde O, Liu H, Lamm MS, Rutherford KM, Cross H, Black MA, Kardailsky O, Marshall Graves JA, Hore TA, Godwin JR, Gemmell NJ (2019) Stress, novel sex genes, and epigenetic reprogramming orchestrate socially controlled sex change. *Science Advances* 5: 1–15. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw7006>
 171. Tonini JFR, Beard KH, Ferreira RB, Jetz W, Pyron RA (2016) Fully-sampled phylogenies of squamates reveal evolutionary patterns in threat status. *Biological*

Conservation 204: 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.03.039>

172. Townsend TM, Mulcahy DG, Noonan BP, Sites JW, Kuczynski CA, Wiens JJ, Reeder TW (2011) Phylogeny of iguanian lizards inferred from 29 nuclear loci, and a comparison of concatenated and species-tree approaches for an ancient, rapid radiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 363–380. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.07.008>
173. Toyota K, Akashi H, Ishikawa M, Yamaguchi K, Shigenobu S, Sato T, Lange A, Tyler CR, Iguchi T, Miyagawa S (2023) Comparative analysis of gonadal transcriptomes between turtle and alligator identifies common molecular cues activated during the temperature-sensitive period for sex determination. *Gene* 888: 147763. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147763>
174. Trifonov VA, Giovannotti M, O'Brien PCM, Wallduck M, Lovell F, Rens W, Parise-Maltempi PP, Caputo V, Ferguson-Smith MA (2011) Chromosomal evolution in Gekkonidae. I. Chromosome painting between Gekko and Hemidactylus species reveals phylogenetic relationships within the group. *Chromosome Research* 19: 843–855. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9241-4>
175. Uno Y, Nishida C, Tarui H, Ishishita S, Takagi C (2012) Inference of the Protokaryotypes of Amniotes and Tetrapods and the Evolutionary Processes of Microchromosomes from Comparative Gene Mapping. *PLoS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053027>
176. Vicoso B (2019) Molecular and evolutionary dynamics of animal sex-chromosome turnover. *Nature Ecology and Evolution* 3: 1632–1641. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1050-8>
177. Vicoso B, Bachtrog D (2009) Progress and prospects toward our understanding of the evolution of dosage compensation. *Chromosome Research* 17: 585–602. <https://doi.org/10.1007/s10577-009-9053-y>
178. Vicoso B, Emerson JJ, Zektser Y, Mahajan S, Bachtrog D (2013) Comparative Sex Chromosome Genomics in Snakes: Differentiation, Evolutionary Strata, and Lack of Global Dosage Compensation. *PLoS Biology* 11: 1001643. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001643>
179. Vidal VPI, Chaboissier MC, De Rooij DG, Schedl A (2001) Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nature Genetics* 28: 216–217. <https://doi.org/10.1038/90046>
180. Volff JN, Schartl M (2001) Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. *Genetica* 111: 101–110. <https://doi.org/10.1023/A:1013795415808>
181. Waters PD, Patel HR, Ruiz-Herrera A, Álvarez-González L, Lister NC, Simakov

- O, Ezaz T, Kaur P, Frere C, Grützner F, Georges A, Graves JAM (2021) Microchromosomes are building blocks of bird, reptile, and mammal chromosomes. PNAS 118: e2112494118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2112494118>
182. Yang F, Carter NP, Shiu L, Ferguson-Smith MA (1995) A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. *Chromosoma* 103: 642–652. <https://doi.org/10.1007/BF00357691>
 183. Yano A, Guyomard R, Nicol B, Jouanno E, Quillet E, Klopp C, Cabau C, Bouchez O, Fostier A, Guiguen Y (2012) An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology* 22: 1423–1428. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.045>
 184. Yano A, Nicol B, Jouanno E, Quillet E, Fostier A, Guyomard R, Guiguen Y (2013) The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary Applications* 6: 486–496. <https://doi.org/10.1111/eva.12032>
 185. Yazdi HP, Ellegren H (2014) Old but Not (So) degenerated-slow evolution of largely homomorphic sex chromosomes in ratites. *Molecular Biology and Evolution* 31: 1444–1453. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu101>
 186. Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M (2008) A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. PNAS 105: 2469–2474.
 187. Zhang X, Wagner S, Holleley CE, Deakin JE, Matsubara K, Deveson IW, O’Meally D, Patel HR, Ezaz T, Li Z, Wang C, Edwards M, Marshall Graves JA, Georges A (2022) Sex-specific splicing of Z- and W-borne nr5a1 alleles suggests sex determination is controlled by chromosome conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119: e2116475119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2116475119>
 188. Zheng Y, Wiens JJ (2016) Combining phylogenomic and supermatrix approaches, and a time-calibrated phylogeny for squamate reptiles (lizards and snakes) based on 52 genes and 4162 species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 94: 537–547. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.10.009>
 189. Zhou Y, Shearwin-Whyatt L, Li J, Song Z, Hayakawa T, Stevens D, Fenelon JC, Peel E, Cheng Y, Pajpach F, Bradley N, Suzuki H, Nikaido M, Damas J, Daish T, Perry T, Zhu Z, Geng Y, Rhie A, Sims Y, Wood J, Haase B, Mountcastle J, Fedrigo O, Li Q, Yang H, Wang J, Johnston SD, Phillippy AM, Howe K, Jarvis ED, Ryder OA, Kaessmann H, Donnelly P, Korlach J, Lewin HA, Graves J, Belov K, Renfree MB, Grutzner F, Zhou Q, Zhang G (2021) Platypus and echidna genomes reveal mammalian biology and evolution. *Nature* 592: 756–762. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03039-0>

190. Zhu ZX, Matsubara K, Shams F, Dobry J, Wapstra E, Gamble T, Sarre SD, Georges A, Graves JAM, Zhou Q, Ezaz T (2022) Diversity of reptile sex chromosome evolution revealed by cytogenetic and linked-read sequencing. *Zoological Research* 43: 719–733. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2022.127>

ПРИЛОЖЕНИЕ 1**Реактивы**

DMSO «Sigma»

Triton X100 «Sigma»

SDS «BioChemica»

Агароза «Lachema»

Биотин-11- dUTP «Boehringer»

Бромистый этидий «Sigma»

Гидроксид бария «СОЮЗХИМПРОМ»

Гимза «MERCK»

Декстран-сульфат натриевая соль «Sigma»

Дигоксигенин-11- dUTP «Boehringer»

Коллемеид «Gibco»

Ксилол (ч) «Реахим»

Ледяная уксусная кислота (ч) «Реахим»

Метанол «Реахим»

Набор трифосфатов (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) «Sigma»

Маркер молекулярного веса ДНК M100 (100 п.н.) «СибЭнзим»

Соляная кислота «Реахим»

Среда для иммунофлуоресценции с красителем DAPI «Vector Laboratories»

Среда для иммунофлуоресценции с красителем DAPI «EverBrite»

Формальдегид «Acros Organics»

Формаид «Sigma», «AppliChem»

Хромомицин А3 «Abcam»

ЭДТА «Sigma»

Этанол «С-ФАРМ»

Рабочие растворы

20×SSC буфер (3 М NaCl, 0.3М цитрат натрия)

4×SSCT буфер (4×SSC, 0.05% Triton X100)

50×ТАЕ буфер (2 М Tris-base, 0.05 М ЭДТА, 1.56 М CH₃COOH pH 7.5)

DPBS буфер «Gibco»

Блокирующий раствор (5% сухое обезжиренное молоко, 4×SSC, 0.05% Triton X100)

Гипотонический раствор (0.075 М KCl, 2% FBS)

Раствор для снятия клеток (трипсин – 2 мкг/мл, ЭДТА – 0.01M)

Фиксатор (метанол : ЛУК 3:1)

Конъюгаты

Avidin-FITC «VectorLabs»

Biotinylated-anti-avidin «VectorLabs»

Anti-digoxigenin-Cy3 «Jackson immunoresearch»

Антибиотики и антимикотики

Ампициллин «Красфарма»

Амфотерицин β «Синтез»

Стрептомицин «Биохимик»

Культуральные среды

Альфа-МЕМ «Gibco»

Сыворотка эмбрионов крупного рогатого скота «HyClone»

AmnioMAX-II complete «Gibco»

Ферменты

Taq полимераза «Медиген»

Гиалуронидаза «Sigma»

Коллагеназа «Worthington»

Пепсин «ICN»

Трипсин «ICN»

Коммерческие наборы

TruSeq Nano DNA Low Throughput Library Prep «Illumina» – набор для приготовления ДНК-библиотек для секвенирования на платформе Illumina MiSeq (США)

ReagentKit v2, 600-cycles «Illumina» – набор для проведения секвенирования на платформе Illumina MiSeq (США)

MGIEasy Universal DNA Library Prep Set «MGI» набор для приготовления ДНК-библиотек для секвенирования на платформе MGI (Китай)

DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Set (FCL PE100) «MGI» – набор для проведения секвенирования на платформе MGI (Китай)

GeneJET Genomic DNA Purification Kit «Thermo Scientific» – набор для выделения ДНК из клеточных культур (США)

Набор для выделения ДНК и РНК из реакционных смесей DR-250 «Биолабмикс» – набор для очистки ПЦР-продуктов (Россия)

Набор реагентов для ферментативной фрагментации ДНК FTP Display «ДНК-Дисплей» (Россия).

Таблица 1. Праймеры к мономерам последовательностей сатДНК, использованные в работе для *S. malachiticus*

Название	Последовательность (5'3')	Температура отжига, °C	Длина продукта, п. н.
SMA-Sat14H_F	CCATGCAGTAATACATAGAATC	49	61
SMA-Sat14H_R	TGCATGGCATAAGATTC	46	
SMA-Sat79H_F	CTCCTCATGCTATTTTCCCAC	55	79
SMA-Sat79H-R	TAGCATGAGGAGGAGCCAG	55	
SMA-Sat133H_F	CTTGTAGCACCTTCTAAGAGG	50	133
SMA-Sat133H_R	CCAGGTACGTCTTATCCTAAG	50	
SMA-Sat142H_F	GGAACACAAAATGGAC	41	122
SMA-Sat142H_R	TGTGTTCCAACGTCC	42	
SMA-Sat144H_F	AGGTCTGTTTCATAATAGTTTGC	50	44
SMA-Sat144H_R	AAACTCAGGATCTTTCCAAG	50	
SMA-Sat50L_F	AGATGACAGTTAAGGAGGGAGG	56	63
SMA-Sat50L_R	GCAGACCCAGCAACATCAG	56	
SMA-Sat63L_F	TATGGCTTCTCTCCTG	41	50
SMA-Sat63L_R	AAGTCAAACCTAGTGACAC	42	
SMA-Sat71L_F	AGGCAAGTCCAGTTCCATCAGG	62	49
SMA-Sat71L_R	GGGAGGAGCCTCTTTCTTCAGG	62	
SMA-Sat83L_F	CATACCGATTGGATGGCAG	56	39
SMA-Sat83L_R	CGATGAGGGTCGATGTCAG	56	
SMA-Sat84L_F	TGCCTCTCTCTCCCTCAAG	54	33
SMA-Sat84L_R	CTTCCGACCACCATCTTG	54	
SMA-Sat85L_F	GCTCAGAGAGAAGTCCAGGCAG	60	58

SMA-Sat85L_R	ATGTGCCATCTGAGTCCATTCC	60	
SMA-Sat86L_F	GGCATCCAGGCTCAGAGAGAAG	61	64
SMA-Sat86L_R	TGCCATCTGAGTCCATTCCTTG	61	
SMA-Sat100L_F	GCAAGTATTCTCCAATG	41	140
SMA-Sat100L_R	CCATAGGGAATCATTG	41	
SMA-Sat122L_F	CTCAGAGGCAAGGATGGAG	54	38
SMA-Sat122L_R	CTTCCCACAAGGCATCTG	54	
SMA-Sat128L_F	TTGGACTATAGGGCCTTTAG	50	59
SMA-Sat128L_R	ATGCAGGAATACGTAGGATC	50	
SMA-Sat181L_F	AGGTCCTTTCCCTTGAGG	53	58
SMA-Sat181L_R	CTACATCCATCTGAGGAGTGAC	53	
SMA-Sat186L_F	CAACAGGAAAGGTCTTACAGG	53	60
SMA-Sat186L_R	AATTCTCCACAGGAAGCAAG	53	

Таблица 2. Праймеры к последовательностям *sat* ДНК *C. calypttratus*, использованные в работе

Название	Последовательность (5' → 3')	Температура отжига, °C	Длина продукта, п. н.
CCA_s1_F	CAAACCACATATGAGGCAATAC	60	462
CCA_s1_R	ACCCTCACAAACTACACTATG	60	
CCA_s2_F	GACAGCCCTGTTCATTCT	60	105
CCA_s2_R	GGCTGTCAAGAATCCCTTAT	60	
CCA_s3_F	TGCTTCACTGAATGGGATAG	60	459
CCA_s3_R	GTGGGAGTGTCTTGTAATAG	60	
CCA_s4_F	CCAGCTTCTTCCACCAC	60	38
CCA_s4_R	GAAGCAAGCATGGGAGAA	60	
CCA_s5_F	CCAACTCTGGGTCCATTT	60	429
CCA_s5_R	CCCTAACCCTAACCATAACC	60	

Таблица 3. Праймеры к последовательностям сатДНК *S. mitratus*, использованные в работе

Название	Последовательность (5' → 3')	Температура отжига, °C	Длина продукта, п. н.
CMI-Sat11H_F	TTTGAGGAGGGAGGCAGTACC	59	84
CMI-Sat11H_R	TGTATCATGAGCATGGACACCC	59	
CMI-Sat30H_F	TGAGCATTCGGACCCCTTC	59	77
CMI-Sat30H_R	CTTAGAATGCTCCCAGGAGGG	59	
CMI-Sat31H_F	CAGGAGGATCCGTCCATTC	56	131
CMI-Sat31H_R	ATCCCTCCAAATCCTCCATAC	56	
CMI-Sat39H_F	CTTTCTTCTGGGTGGCAGAGAG	59	118
CMI-Sat39H_R	TTGATCCAAACACCGGTTCAG	59	
CMI-Sat69H_F	TAATGAATGTAAAGGAGGCAAG	53	54
CMI-Sat69H_R	AACATTGCCTCCTTTACACAG	53	
CMI-Sat75H_F	AAAGCTGCCAGTTAATTCAGGG	59	121
CMI-Sat75H_R	AATCTCCTGCTGGCTTTAGGG	59	
CMI-Sat92H_F	GTAAATCTGCTGGAGGTGTAGG	55	91
CMI-Sat92H_R	ACTGGCAGCTCACAACCTCG	55	
CMI-Sat106H_F	AAGATCCCTGTTTGTGTGCAG	56	900
CMI-Sat106H_R	GGTCAGGAGGGAGTCTCTTTG	56	
CMI-Sat119H_F	GACCCAGAGAAGGAGTTTGG	55	599
CMI-Sat119H_R	CCCATGCAAGATACTGAGAGTC	55	
CMI-Sat126H_F	ATGTGGACGGAGGTAAGACC	55	359
CMI-Sat126H_R	GCCGTGCACATAATCTTACTG	55	
CMI-Sat6L_F	AAGAAGCTCCAGGTCTG	46	114
CMI-Sat6L_R	TTCCCTGTCTGCCATG	48	
CMI-Sat24L_F	CTGGTGGTGGAGAAAGCACTG	59	497
CMI-Sat24L_R	GATGGGTGGAGGAGATTCGAC	59	
CMI-Sat33L_F	TCCATCTCTTTGGTGATTTC	59	1099

CMI-Sat33L_F	GCCAATGTCTGTGGAGACACAG	59	272
CMI-Sat85L_F	CACAAGGCCAAATGCAAAC	56	
CMI-Sat85L_F	AAGGCTTCTGCTGACTCCTG	56	

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Таблица 1. Последовательности *sat*-ДНК *S. malachiticus*.

Название	Последовательность (5' → 3')
SMA-Sat14H	TCTTATGCCATGCAGTAATACATAGAA
SMA-Sat79H	GTCTGGCTCCTCCTCATGCTATTTTCCCACGGTCCCCGGCAC CCGCGGGAAAGCAGGGAGGGG
SMA-Sat133H	AGCATCAGCATGGAGAGATCTCTTGTAGCACCTTCTAAGAG GGAAGAAGGAACGGTAATGCATTAATATGAGGAGTCAAAC AAGGGCTACCCTTAACTATTCTTTTGCCCAGTCTTAGGATA AGACGTACCTGGTGTAGCCTGG
SMA-Sat142H	TGGACGTTGGAACACAAAA
SMA-Sat144H	GAGAAGGTCTGTTTCATAATAGTTTGCAACTTGGAAGATCC TGAGTTTGCAAGACCT
SMA-Sat50L	GAGGCCAAGATGACAGTTAAGGAGGGAGGGGCCTCTTCCTT CAGGCAGTCCCTGATGTTGCTGGGTCTGCCTGATCGCTCCCT CT
SMA-Sat63L	TGTATGGCTTCTCTCCTGTGTGGACTCTCTGATGTGTCACTA GGTTTGACTTCTAAGAAAAACATTTCCCACAATGCTG GCATT
SMA-Sat71L	ACTGTCATCTGCCGGCCTGAGAGGGAGTTCGCCAGGCAAGT CCAGTTCCATCAGGGCTAGCCTGAAGAAAGAGGCTCCTCCC TCCATA
SMA-Sat83L	TCCGGGGTCATACCGATTGGATGGCAGCCTGACATCGACCC TCATCGGTCCCTGACTC
SMA-Sat84L	GAGCTAGCCTGCCTCTCTCTCCCTCAAGATGGTGGTCGGAA GGAGGGCTTTTCTTCTTCCAGGCAGGCCTGGTG
SMA-Sat85L	AGGCAGTCCTTTGTGCCATTGCAAACCTACATTTCCCACTCCC ATGCATGCATAGCATTTGCAAGACCAC
SMA-Sat86L	GGGCATCCAGGCTCAGAGAGAAGTCCAGGCAGATCTGAAG TCTCAAGGAATGGACTCAGATGGCACATAATTTTAAGATGT GCAAATACACTCCTGGCAACTACTGAGTCAT
SMA-Sat100L	GCAAGTATTCTCCAATGATTCCCTATGG

SMA-Sat122L	CTCTCCCCCTCAGAGGCAAGGATGGAGTCAGATGCCTTGTG GGAAGGGTCCAGTTCCTTT
SMA-Sat128L	TTGGA CTATAGGGCCTTTAGTAGTCCCTTCTGACTCAAGGA TCCTACGTATTCCTGCATGGCAGGAGGG
SMA-Sat181L	AATGGGAGGTCCTTTCCCTTGAGGCGGGCCTAGTGGATGAA AGTCACTCCTCAGATGGATGTAGG
SMA-Sat186L	GAGCAACAGGAAAGGTCTTACAGGCAGAGGAGGTCTTTCTT GCCTTGCTTCCTGTGGAGAATTCTGG

Таблица 2. Последовательности сатДНК *C. mitratus*.

Название	Последовательность (5' → 3')
CMI-Sat11H	CCTGTGCTTTGAGGAGGGAGGCAGTACCTGAGCGCTGATT GTGAGGCTACTGTGACTTCAGCTGGGTGTCCATGCTCATGA TACAACTAGGGATTGAGTTTTTATTATCAGGCC
CMI-Sat30H	GTCTCCTGTGAGCATTCCGGACCCTTCCCTGGGAGTTCCA CAAGCATTCCATGACCATTCCGGGCCCTCCTGGGAGCATT CTAAG
CMI-Sat31H	AACCAGGAGGATCCGTCCATTCAAACTAGTTGTTGCCAC GTGGCAGTGCCACGAAGCGATGGGAGTCTGATTTTGGGGTC TCAGCCTGTGGCCAGGGACGTGATGGACCCCTGTATGGA GGATTTGGAGGGATCCCAGGCAAA
CMI-Sat39H	CTCAGGAGTGCAGTACTGTGTGCCTTGGGTTGATCCAAA CTTTCTTCTGGGTGGCAGAGAGCTGGCATCTGTTCCATTT CCTTATTCGCTGCAATACAGGCCTCTGGGGGACAGCCCTT ATAAGAGGCTCCAGCTCCTGAACCGGTGTTTGGATCAATA CCAGCACATGTCTGCTTGTAGGGGACCCC
CMI-Sat69H	TACCTAATGAATGTAAAGGAGGCAAGCTTTCCTATTCT GTGTAAAGGAGGCAATGTT
CMI-Sat75H	ATTTTGAGAAGTTAAAAGCCACAAGAAAAGACTCAGGA TGAGAAGATAGAAAGCTGCCAGTTAATTCAGGGACAAG TTGAGAAGTTCCGAAGCCCCCAGAAGATTTTGGACAAG AAATTCAAAGCCACCAGCACACTGAGGGTGAGAATCCC TAAAGCCAGCAGGAGATTC
CMI-Sat92H	AGGATAGTAAATCTGCTGGAGGTGTAGGGGGATCTTCCA GTTTGTGAGCTCCCCTAAGGTTGGTAAAAAGGCTGGAGG CGAGTTGTGAGCTGCCAGTGGGTGAGCTCCCCAA

CMI-Sat106H	ATCACTATTTAACAATGGATTACTTCTAAAGGTAAATTAAT TTCTTTTTTAAAAACGTTTACTCTTTTATGCCTATTTAAAA CATTTCTAACTTACTTGTAATGTATTTTAAAAATGGTTAG GCGCCTTTCTTCCTGACGGAAGATCCCTGTTTGTGTGCAG CTGACCTGCGTTTGAGGCTGACTGCCACAGCACACCGC CGCCCCACCACAAGAAGCAAGGGCCGCAGAAATAAATCT CTGAAGGAGAGGAAGCTTTCCACGACTTGCCCAGCTGC AGACATTTCCAACTGTGGCTGTGAACAGGAGCAAAGG CCATCCCCGCATGACCCACACAGACTACGCTACAATCCT CTTCCTTTCACCACAAGGAAGTCTTCTCTGGCGTGAAGC CACCCGAAGACCTCCACATGTTTGCTAGCTAATCAATGT TGATCTGGCATGAAGCCAGCGGAAGTATCCCACCTTCCTG AATCTGGGCGATATCTCTTTAAGGTAAAGCCAGCCCCT GTCTCCGGTTTCTTCTCTATGCCACGGAATCTTCTCGTGT CACCATTTCCAGTTCTTCTCTAAAATAATCCAGACAAACA ACCTCTGCTTCGTCAGCCTTACTGAGTTAGCGAGTTCTAT GACAAGGTACAAGCATATTGGTGTTGCATAGCCATAGAC ACGAGCTTACCTTCTTCAGGCGTTCCATGAAGCGGTCCC TTTGCAGCCTCCAACCGCCCCTCACAGCTGCCCCTAAACC TCACCGATGCAGCAGGAGTCCAGTCTCTATTCGGAGCGA AACACGGGAAAAAAGAAGAAGGCTTAGAAATACAGACA ATTTGGAATGTTCCCTTCGAAGCAAAGTGCCTCTCTGTGGA ACACGGACTGAAGAGCAGCTTACCCTACTGGTACCAAGT TCTTCCGGATGGGAATCCCTCTGAGCCGAGTCCCGAGGC TGACTGAAGGTCATGCAGAGGGGTCCTCCTGACGTCTTG CCCCTCTGGGGGGACAGCTGGCCAGGCTTTAGCCCCAA AGAGACTCCCTCCTGACCTATATTTCATTAAGTCACGTGA GGCTTTATGGGTTCGCTGCTCTCACATTTAAGAAAAA GAGATCAGGCACCAAAGACGTCTTTCTAGCTTTCCATCGA AGCAAAACCTGGCAGGCTTCTGGCACCCGGCGGGCACCT GCTTCTTTCTAGGGTCAACAACCTGTCGCTTAGCTGTTAA GTGTTGCTCTCCAGTGGGTCAGCCTGATGGACGTTTCCC CTGCCTGTGTCACGATTTGGAAACAGCTGGTGCTAGGGCT GAGGTGGGAATGCCTCCTACCCCCAGATGCGGTGGCTTG GGCAGCGCAGCCACAAAATGTGCTTGCCTGGCATTCTGG GCATGTTCTAGAACAAATCGTGATTTCTCAAGGGCATTAAAT TAATTATTACAAGTTATTAAGGGGGGGTT
-------------	---

CMI-Sat119H	GGCTTCAATATATATTCCCGACCCAGAGAAGGAGTTTGGATATCTTCCTCGAATTAAAAGTATCTACTTTGTCCTACCCTGTGAGGAAGTCCTTTGTGCAGTCAAGATAGATGCAAGGGATCAGAAAAGCATGTAGAAGGAGTTAAAGCCTTTCTATTGCTTCTCCACACGTTACATAGCTTTCCCATGATGGAGGAAGCCATAATACAGTCAAATTGGAGGCAAGGGAACGGAACACCATCCGGGAGTAGGTAAGGCCCTTCCTTCCTTGTACAGAGGTTCCACAGGTGTCCCATGTTGGAGAGTAGCGCTCGGATCTGTCCCAATGGAGGCAAGGTCCAGAAAAAACAAGCGGCAGCCAGTATCTTGGAATAACCTTCACAATTCAGACTTTCTGCAGCTATCCAACAATGAGGAGAATCCCTTTTTTACTTCAACAAAGGAGGAAGGGACCAAAACACCATGGAGAAATCGGTAAGCAAACATAGCTACAATTAATTTGAAAAGTAGTACCATGTTGAGTGAAGGTCTCCGTCCACTCACCATGCCTGCTTTCTAATTTCCACAGGGTTCCCCTCTCAGAGGAAGACTTCGGACTCTCAGTATCTTGCATGGGCTTTAACAACAGCCTCGAAGAGAAAAAAACTTTGAAGAACATCTGCTAAGGATTTTCAGTCTCTTTAACATGTTGAAGAGAACTTTAGGTTGTTTCAAGATAGAGCCAAGGGATCAGAACACCATGGAGACTGAGATAAGAGTTTAGGGAACTTCTCCGGGAATCCCATATAGGAGAGAAGGCCATTTCCATTTGCACAT
CMI-Sat126H	CAACAGGGCTGCAAAAGAGGAAAAAACCATGTGGACGGAGGTAAGACCTGAGCATAACCTCTACCAATAAGACTTTAAGTAGCATTTACTAACTTCTTTGAATTCAGACTTTCCACAGGGCCCCATCCTGGGAAGACATCCTCAGTCCGATTAACGTGGAACTGGGATTCTGAATACCGTGCAGAAGGAGATAAGACTTTAGAATGAATTCGACTATTCAGATTTAGAGCTCCATTTGGATGAATTCTTCCATGGAGAACACCACGTGGAAGGTGGTAAGAAGTTTGATAAATTCTACATTTTAGATATTAAGCAGCATTTGGATAACGTCGTTTCAGTAAGATTATGTGCACGGCTCCATCCTCATCCTCAGTTCTGT
CMI-Sat6L	GAAGCTCCAGGTCGGGTTGGCATGGCAGACAGGGAAAA

CMI-Sat24L	AACCAAGTGAATCCGGTTCCTGTTGTTTCGTGGTTCGTGCGAGGT ACTTTTACCGGGGGTCTGTTGTTTCGTGGTTCGTGCGAGGT GGCCTTCGGGGGAGAAACGGAGGAAAAATCCACGCTCCCGA ACTCCTGGCTCGGCTCGCCAAATGAAACCGGAAAGGAGGC CAGGGGAACGGAGTCTGTTCTTCCAGAGGACCTTTATTGGT TATGTGCACATAACCCTTTTGTGCGCAGTGGTGTTCAGATA GCCAAACTGCGCAAAGGTGTTCCATTGTACAAGCATTTTTA TAGTCTTTTACAAAGACACATCCTTCCATCAGAGAATCACAC CCCTTCAGCATCACCTGGTGCTGACGTTTTCCAGGTAACCAG ACCCTCAGACTTCATTAACCTTTAGAACCCCTTTGAAGCTCCT TCTCTATTAATTGATAACTTTGGAAATGTATAGGTGCTTTGT TTCAAACCCCTGTAGACATCCTGTCTCTGTGTATCTAGGTTC TGATGTTTACCTGAAAACAATGCTTAATTATTTTCGGGGCTT GCTTACTTCCAAAGTGCACATTCAGGCTGACAACCTTAAGT CAGCAAAATTCAATCTGCCTGCTTGCAACTATGTTTCAAGA TGGAGTCAGACTGGTTCCTTTTGTCTTAGGGAATCATGGAGG AATCTTTCTATAGCCCTTCACCGGCAAGGGGATGAGGGTGG GCAAGGGGGAGTGCTGCCAATGGGGCCATTCCCATGGTCCA TATGGGCCCAATTCTGGCCCACTCGGAGCACGGAAGCATTC CCTTGCCTGGTGTGATGACATAGTTATTTTATATGATATGTT TTCATTTCTTTCTATCATTTAACCTTTTCCAGTTTAAAATTAA AAAATAACAAAAAAATACTCCTTCTGAAGAGTCAACCCCCA CTTGACCTTGTGCAGGTCAAGTGGTGTGTTTGTGTTGCATGTGCA TTCTTCGCGGCTTCCACAATGATGTCACCTTCCTGAAGTGATG TCATTGCTCCCCTTGGGAGTGTGTGCACTTCACATGTTCCA GGGTTCCCTGCTGCTGGTGAGTGACCTCCAGGGAGCTTCCCAC CTCCCACCGATTACTGTTCTTTTCAGCGCTCAAAGTGCTACTT CAGATGCAGTGCATGCTTGCCATCCTGTCTGCACATCCTCAC CCTGACCCGCTCGAGTTAGCTCGGGGTACATTCTTTTGTGTT TACACTGCTGCAGGGCAGAAGCCACCAGACCTCTTGCGCAC CTGCACAAAACCTCCCCTCCTACCCCAAACATGGAAATTCA CGCAATCATGAACACTCCTTGAAGCACTTGTATGAGCAAAC TTCGATGTCCTCGGTGATTGGCCAGGAGTTTCTAATTCACCC ATATTATGCATCTTGATTGGTCATCCTCCTTTTCAAATTTTAG TTAAATATAAGGATTGTGCGCGGAGTCAACTTTGTGGGAGTT GTTGGAGTAAGAGGATGGAGGGTTTTGGTGCTTATCGCTGGT CAGTTGCTGCTGCATATCATGCAGAGCTCCTTGACCTTGCTG GGCCAAGAGCCCCAGAAGAGAAAAATAGGAACCTTGGGTAGCA TGCACACTGGGTAGTAGAGCATCAAATGTTCAACCTCTCCCT TGGCTTTCCCATGCATGAGCATTGGGGTGGGGGGCTTCTCCC TGACAACGGTTCTCCCCGGGAAACTGGTTCAGAGCTGGCCTG GGGACACATTGAAAGCATCACGTTCGGCAAATATCCCCACTG CTCTTTTCATTTTACTCTCACGTCTTTTACGGCCACGCATAAG GTGGAAGCCACTACATGGAGTCAGATCATGATTGGTATTGAC TGATGCTTGATCTGAGGAAAAAATTCAAGGCTTGTACACAC GTCCTGACACATCCAGAGACACAGTTACTGCCTCACCTGAA CTCATGTCTGCAGTTGCTCATAATCTCTTCCACTATTGGGAG
------------	--

AAAGGATGTTACTGAGTATTCAGCAGGGGGCAGGGTTGGGGA
 ATATACTGACCTTCCTGTCTGTCATGGATTGCTGGGGGAACA
 TTCTCTATTTTCAGCCCCATGTCCATCCGCAGATAAGCAGGCT
 TCTCTCTCCACTGAAACTGAAATTCAGAGACTTCTTAAGCCT
 TGCCAGAAATGGTAAGATAGCAGAACCAAAAGTTCTGAATC
 TTCGGGAGCCCCGGGATAGACAATCACAGGCCTTCCTTAACA
 TTTTTCACACGTCGAACCCCTTGCATGAACAGCTTGCCATAA
 CTGGCAGTGTTATGCTCACATTTATCTGTGAACAGTTAAAGT
 CCCTGTTGTGCCCCGTCTATGTTAGATGGCAATGCGTGCCATG
 CACCCACTCACCTTACCTCTGTCTCACAAAAACAATGTCTG
 TCCTTGTTTTTTTGCTTGACCGAAGGAATCCAAAACGGTCCAG
 ACCACCGTCGACAACCGGCTGTTAATGCCCTCTGTGAAATGG
 CTTTCTGATGAGAGTTTTACGCACATGATTGTCAGATGCAAG
 ATGTCGAGCGTCTCTATTGCCACCCCTTTGGAACATTGCTCAT
 CTGAACTGAACAGGCCATCGATTGTCGCATCTAAGTCATCGC
 ATCCCCTTCTGGATCAGCGTCTGGAAGTGGAAGACCTGTTG
 GGGGGATTGAATAGACAGTTCTTGTCATTGTCCCACAAGTAT
 CAAGGACACAGGGTCGTCTCACAGTATTGATGATCTTTAGAG
 TGACCGTGAGAATGGCGACCATCCTATGGACCGAACACTCCC
 CATACTTGTTTTTCCCTGGAAAATACAAGTGTTGTCCAGAAG
 GGCCTTAAAAAATAGCCTGACCCAGTATTTCCCTCTTTTGCAC
 ACAGGAAGGCCAATACCTAAAGGATGCCAGGCATTCCCTCA
 TCATCCATCTCAAAGCACTCTGTGCCGCGGATATCTATACCG
 AGATAACAGCTACAGATTCAAGGAGATGCCTCATGCCAATC
 AAACGTTCTCCCCTGTGCTGCCTCCGTCATGAAAAGGAGAAA
 AAGGGGTTGGGGGGAAATGGACAAATGGTGGCCCGATTTGT
 CTCTGGAGGAAGGACATGTGAATCTGTCTGAGGGGAAAAGC
 AAAATAAGGGGATTAATTGTAGATGCAGGAGAAGAAGGG
 GATTATAGATCGGGTATGGCAACTAGATGAGAATTCTGAGA
 GGAAGACATGATTATGAATGTTTAATTGACAATCTGAAACA
 GAAGAATATTTTCAGTCAGATGGTACAAATTAGAAGCTGGTT
 GAACAGAAGAATATTCCATTTAGATGGGACATTTTATTTTAA
 AAATTAAAATTTTAAAATTAATTTTATTTAAAAGAAAAGAGT
 ATAAAGATAAGAGAAAAGTAGATAGAACTTATACATAATAT
 AGTAAATTTGTTTTAGTTTGGGAAGGGGGAGGCTTGATGTCA
 GTTCGAGAAAATAGATTAAGAAATAGAAATAGGCAGGGTTA
 GATGTTTTTGCATATTATTGTGAAATTTTGATTTGAGATTAAT
 GCCTAATGGGTCAATGGGAGAATATGTGGATTAAAGATTTT
 AAATTTAATTTGTGTGCCATTCTAAAAGAGAAAGTTTATAAA
 ATGGTGTATTGGTATATGTTTCTTGTAACAAACAGTAAACGA
 CTAATGGGATTATAAATTAATGCTGGGATGGTGAATAGCAT
 GCAGGAATACTATATTATATTTGGGGATCTTTGTTATAAAA
 TGGAAGAAATTTTGCTTATAAAATGTATGTTATGTAGCTTA
 AGCTATAGTAAAAATTAGAATCTTACTTGCTGAGAATGATA
 GATAGAGAATTTGGAAGTATGGTAATGTGGTTCCACGTGG
 AAATGGCAGTCTATTTAAAATATACAAAGGAAGTGGAAA
 GAGAATGCACACATTTTTTATATGCTTGGCAAATTGGACAA

CCTTTATTGAATTTTCAGCAAGAACCTAAGAAAAATGAATAA
 AATTGTGGATTTTATTTCTAGAAGTATGGCTTTGGGAATTTA
 GGAAAAAGACACAGAGAAAGAATTACTTATTAGACACAAT
 GGCATAGCTAGGGCTGGCTGCCCTGCATGGCACAGTTGGGG
 AGGTGGCAGGAGGAGTTGCCTCCGGGGGCCGCATCATTGCA
 GGCACAGCGTTGCCCCCTCGCCTGCTCTTTCTACTGGCTGCT
 TCTCCTCATCGGCTAAGTGAGGTGAGGCTGCCAGTGTTACCA
 GAATGAAGCCAGGGAATTCGGATTCTGTTCTTCCAGAGGAC
 TTTTATTGGTTATATGCATATAACACTTGGCCACAGTGGTGA
 TCAGGATAGCCAAAACCTGTGCAAAGATTCTCTGTTGTGCACA
 TACATTTATACATTTTTCACAAAGACACATCCTACATTAAAGA
 ATCACACCCCTTTTAGCATCACCTGACACTGACGTGGTTGGG
 GTCACCAGACCCTCAAACCTTCGTCTACCTCATCAGTTCCTTTG
 ATGCTTCGATCCTTGTTAATTAGAAACTTCGATTTGTATAGAT
 ACATTGTTTCAGGCTCCTACAGACATCCTTGTCTGTGATCTCC
 TAAATCACTTTTCCGGTGTCTGCTAATAGTACACAACAGTTA
 GTCAAACCTGAATTTCCACACACTCCTCCTTCACTTGCGAGC
 AAATAGTCAAGTGCTAACCTGTTCTGGTAGATACCTGTTAGC
 AATTTAGTATTTTGTCTTGCCAGTACACTCAAATCTGCGGTTG
 TTTCAATTTGTAACAATTTATAAAACAGCCTGCAAACGTATTA
 TTCTGTTGAGCATATACACAGGAGTTCTATAACCCCAACTTC
 CATCTTCAACCCATGTAGCTGGACCATAGCATTGAACTATGC
 GGGCTGGAGGCCAAACATTGTCTTTCCATTTAGTTTGAGTTG
 GGAGAATTGAAATGTCCCTTTTCTGGCGTAAAGCATCAGTGT
 ACAGAGGATAACCTAACAGTTCTCCTTGCTGCACAGGCAATA
 GGAAAAAGGCTGGCTTCACAGTTCCTAGGAAACATGTTCCAT
 GCCAGTTGAAGGGTAATTCTTCATATGCTCTAAGTCCACAAA
 TATAAAAATACCCTTGAGGTGCTTTCCAAGGGATCTTTATA
 TCTCTCTGGGTTTAGACCATGATGGATTCAAATTTCCCCAG
 CGCCAAAACAGGAATTGTCTGCTGCCCACCAGTAAGTTTGG
 TCAGTTTCCACAATTGACATGCCCACACAAGGAGTTTCTCC
 CACTAAATGTGTAAATACTGGGGTAGGAGACCTTCGTCCCA
 TTATTTGCGTTTTTAAGACCCACTCAAATGGTTTTGTGTTTT
 GCTATAAGTAAGATTACTTGCTGTATAATTCAGGTTGTCCCA
 ATCTTCCTGAAATATTTCTTTTGTTCACAGGGCCATTGTTCA
 CCCATATTCGTTCTCCTCCGCATACAAAACAGTTGGAGATCTCC
 AGAGTGCTTGCTACTTTGGCTAAAGATGAAATGGGTCTCTCT
 TTTTCAATTTGCTCAGCCTTTTCAATCTCATCATAAACATCTT
 GGAAAGTTAGTACCTGGGTTTTGTAAACTCGTGGGGGTTTAG
 GGTTTTTAGTTTGAATGATGGTAAAGTAAGAAATAGGATCCT
 GTCCTGTACCATCAATGCCTATAGCATAAGTTTCGGTTCCACG
 GTTTGTCTGAACTCTTAAGTGGCCAAATAAGAACTACTCTGT
 TTCCATTTCTGATGGTTAAGCGTCCCACATCAGAACAGCCCT
 TTTTCCCATCGCTTGCTAAAGTGGAATCACAAACGTGTCTGA
 ATTGGGCTTGCTATAATACTCATAGCATGGTCTCCATTTCAG
 ATAAAGGAGCCATGAAATGTCCAGGTACAATGGAAGTGGGT
 TTTGTACACATGTACTTGGGTCTGCTCTCATAATCTCTTCCAA

CTGTCACTCCCCTGCTTTTCAGATGCTGAGTGTAACACTGC
 ACAAATCAAACACAAAGCCCCTGACAGTTTGAAATTACTT
 TTGGCAGAACTTTTGTGGAATTGATGAGGACTAGAAGCCC
 ATCCCCATCTACTTTTGTGGCATTATAGGGCTTTGGGAACCC
 AATGTAAAGTGAAACGTGATAGACATCTGGATCAGCGGGA
 GAGTGGCATACTATTTTGCCTTTTGAATCTTTGCATTGTTTTA
 GGACTTGTCTTCCCTTTGGGGTGACAACGTCACAGCTTCCCA
 AAGGTTTACAATTATCTGGGGGCAGACTCATGTAAACAAGG
 GTTACAGTTCTATTCCGAGTCCAGCAGTGCGGTGCATTGTTT
 CTGATTGGCATTCTCACATTCAAAGTTTTGTGAAGGAGCTG
 CTCTAGCGCTTCGGGGTTTTGTCAATTTCAAACGTGTAACAA
 CCTTTCCCCCAAACCAAGCTTTCTTGCACACACTCCCCTGGA
 GGGCTTTGATTACTGATTCACAGACATGTGCCTCCCCTACTG
 ATTTGCATTTCAGTTCTAATCATTTGAAAGTAAGGGTGTGTAT
 TAAAGGCACATACCTCCTTGTTCCATTTCATAAGTTAAAAATT
 CAGCTTCATGCAAACCCCAAATGAAATGACAGGCTCTCTCTC
 CTATCCAAGTGTAACGTTTTTGGATAGCTTGAGAATCTGGCA
 TGCCTTGGGATCTCCAAGGACCTTCATTTTGCACACACATTA
 CTTTTGGGAAGAGCATAGGAGATGCTCCTCCGGGTCTACCAC
 TTCTCCACAACCTTTAATTCTCCCGCTTTCACACAAGTAAAC
 GGCTTAAACAGTGCATGAATAGCAGCAAAGAACAAGCGGC
 AGGAATCCCGATTCTTCTCCCTCTCAGCGAATCGCGGCGGA
 CTGGAATCAACAGCTTCCACATCTGGATCGCCTTTGAAGTC
 ATCATGGCTCGGAACCTTGCTTCTCCGTTCTGTCTGATCTGTCT
 CTGGCTCAGCCGCAGCACGTCTGCGAAGGATTAACCTTCAGC
 CCGTCCGATCTGGTCACCTCCCACGGGGGCTGGACTTGCTTC
 ACTCTCGACCAGTGAATCCACACCGGAGAATCTGAAACTTT
 ACAAGCGGTCGGGGTAGTTAGAAGCACTATAACTGGACCT
 CTCCACTTAGGCTGTAAGGCTTGGGAAGTATCCCATTCTTT
 TACCCACACCCAGTCTCCTGGTTTTAAATCCGTGCACTGGGG
 TAATTAATTGCAAAGGGTTGAATTTTCAGACAATGTCTCTAC
 AAGTCCCCTCAAGTATTCATCCTGAACCGTATGTCCCTGTA
 AGTCTAATGCTTCTCCGCCAAGGGGCAACGGCGGTGGTCTC
 CCAAACATTAGCTCATAGGGTGTAAGTCCCGACTTTCGAGG
 AGTGCATCTGATGCGAAGCAAAGCTAATGGCAAGGCATCA
 GTCCGTTTAATTTTAGCTTCCTGGCATAACTTTGCTATGTGG
 GTTTTAAGGCTTCTGTTAGCTCTCTCCACCGCTCCACTGCTC
 TCGGGGTTCCAGGCATAGTGGTGCTTCCATTGGATTCCTAAT
 TTCTTGGCTAAATCTTGCAACACCTCTGCAACAAAGGCTGGG
 CCGTTGTCAGAATTCAATTGTCTCGGAATTCCAAAAATTGG
 TAATAAATGATGCAAAAGAGCACGGCTAACTTCACGGCTGG
 TCTCCGTGCGAGTAGGAAACGCTTCCACCCATCCAGTGAAA
 GTACAAACGAATACTAGCATCGCCTTGTAACCTTTGCAAGG
 CGGCATGTGGGTAAAATCTACTTGGCAGACTTGAAAAGGCA
 TAGTCCCTTTATAAAATTTTCTGGAATTTAAACGTGCTGACA
 GATTACCCATCCTTTTACTATCAGCTTAGCCAGTCCATTGAT
 TCGGTCTATATACAGCTGTTTGCCAGCTAAAACAGCTACAT

TCTCTGCTCCCAAATGTGTCTGCCGATGAATTTCTTTTCATCA
 CTCGTCCTGCCAGATGTTCTGGTACCCACACTCTTTTCATCTG
 GAAGAACCCACCAGCCTTTATGCTGCGTGAAATTGTTTTCA
 GTTGCCCAAGGCAGTTTCATCTGCTGAATAACAAGGGGCTTC
 TGTTGTTGGAATCACTACCGGTAAAAGAATCTCGCCTGCTT
 TATATTCATGTTTGAAAGTTTCAAAGTCCAATCTGCAAGCT
 CTTTTCGCGGCTATATCTGCCTTCGCGTTTCCTTTTGAAACG
 ATGTCCTGAGTTCCCTTATGCGCTTTACAATGGATCACAGCT
 ACTTTTTTCAGGGAGATGAACTGCAGACATCAGTGCCTGAAT
 CTCTTGATAGTTGGCTATTGGTTTTCTGAGGCTGTGACAAA
 TCCTCTCTCATGTACAAAATTCCATGCACTTGAACCGTGAGG
 AAGGCATATTTAGAGTCTGTATAGATGTTGAGCGTTCTGCC
 TTTTCCCCATTTCAAGGCTTCTATTAAAGCAATAAAGCTTGC
 TGTGCTGACATTCCCTGGAGGCAAAGGTCCCGCAATGAGGAC
 TTCTTTAGTAGTCACTACTGCAAATCCTGCACATCTGCGACC
 ATCTATAACTTGACTCAATCACTTGTTCTGGTTTTTCATCATA
 ACTGGGGCCGTGCAATTTCCAATTTAAAAGGTCAGAAGTGTT
 GAAGGGAACATAAGTGTAGACTTGAGTTGGAATTGGCTGCT
 GCTGCACTCCCTGCACTGGAGGCCACCGGCACCAAAGTAGTA
 ATCTCTCTTACAGGCAGAATTAAAGTCGGAGGAACACGTTT
 TCTAAGCTGCATGTTGTGGACGCTGGGAGCGGCATCGGATG
 TAGAGGTTCCCGATGCCATCTCAGGAGAACCTGGACTCTCC
 TCTGCACTTTCAGGCTCAGTCCCGGAACTTCCCACATCTAGG
 GCACTCTCGGCTGATTCAACACTTCTCCCCCTCTCTTTCTC
 TCTCAGGATCTCTACGCACTGATCTGGCTCGTCCGCTGGGCG
 TAGCGGCTTGAGCTGATGCTGACAGCAAGACTTGCGGTGCT
 GGCAAACTTGGGCTAACGGTGGGGCAGAGGGTGCTGGTGG
 TGGAGAAAGCACTGGAGGTGGTGGTGGCGGAGGAAGCGTA
 GGATATATCGAAACGTAGGGCGGAGCAAACTTCTTCCATC
 ACTTCTTTCACATCTAACATGGGGAGACTTCTTCTCTTCCC
 TTCTCTGGCTCCGTCTCGAATCGCGCTGTCTGGAGCTCGTCA
 CAATCAAGGCTAAGGCTTCTTTTTTGACTAACTACTTTGTCC
 ACGGAGGAGGATTGCTGGCTACTTTCGCCCATCCTTCTGCGT
 AGGGGACATCTTCGGGGCTTCCCGATGGTCCTTTTCTACATA
 GCACATCAATTAGTTCTTCTCAAAGAGGTTTGGA AAAA ACTTC
 CGTGCGTGGGCCACTTCAAAA ACTTTTTCAAATTGCGGGGCC
 AGTCACTGTGGCACTAAAAAATCATCTTCTTTTTTAAGGCAT
 AACGAAATGACAAAAACATCTTCAAAACGAGTGGCCATAAG
 AGCCAAAGGGGTCTGAATCTCCTCCACCCATCCTAAACTTCTA
 TGTGTATTCTGAGGCAAGGCAATCAGAAACAGCCTACTGG
 CTATGGCAGACCTAGTGGTCAACAGATTACTCCTAGCACCAG
 GCTCTGGGCGTCTTGACTGAGACCTCCTGTGTTTGTCTCGAT
 TTCTACCACCCACGTGTCCTCCCGTGCGCCTATTAGCTGT
 TTTTCGGACTCTCTCTCGGGCCTACCGAACAGCTGTCCCCAA
 CTGGGGTTAAGGGGTGATCAATCCCTTCTTCGATTCAAACGG
 AATCGGCACTAACACTTCAATTAAACATTCTAACCATTATT
 AATACTCGCCTGATCTGATGCTCTGACCCACGTAGTGCTCCC

	CGAGGTCGTCTGGAGACAGAATCACCGTAATCTTCCCCTCTG GAGGTCCTTCCACCGCGCGTCCAC
--	--

CMI-Sat33L	TTCTATCTCCTCTATGTCCTTTTTGAGATGTGGTGACCAGTAC TGAAGACACCACTCCAAGTGTAGTCTCACCAGTCTTTGTAT ACGGGCACGACAATGGTTTTCCATCTCTTTGGTGATTTCCCC CAGCATAGAGTTTGCCTTCTTCACTGCTGCTGCACATGGAGT TGACACGCCCCATGGAGCTATCAACAAAGATCCCCAAATCCC TTCCTTGATCTGTGACCGTTACTTCCAATCCCATCGATTGATA TTGGAAGTTTGGATGTGTTTTCCCCCAACGTGCATCACTTTGC ACTTGGCCACACTGAATGGCATTGCCCCTTCACTGCCCAAT CGCCTGATCTGGAGTGGTCCTGTGGGAGTTCTTCACAGTTCC TGGTGCTTCTCACCAACTTGTCTAATTTGGTGTCACCTGCAA ACTTGGCCACCATACTCCCCAACCTAGATCCAAGTCATTTA TGAAAAGATGAAAGAGCACTGGTCCCAAACTGATCCCTGA GGACACCCTGCTTGACCTTCCTCCCTTGCGAGACCTGACAAT TAATATCCACCCTTTGCTTCCTGTTTTTCAACCAGTTCTTCAT CCATTGCAGAACTTCTCCTTTGATGCCTTGACTGCTGAGTTTT CCCAGGAGCCGCTGGTGAGGGAGTTTGTCCAAAGCCTTTTGG AAACCCAAGTGGACAACGTCTACTTGCTCCGCTCCCCCTTGT CCACACGCCTGAGAACACCGTCAGAGAACTCTTCGAGGTGA GTAAAGCAGGATTTTGCTTTGCAGTATTCAAACTATGTTGG TGTGATTTGGGCTGTTCCCAATTCATGCCCCGAATGCAGCAGG AGAGGGAAAGAGAAACCCAAAGTGGGGTGAGGCCCCAAAGTT GTTTTGGGTTGCTGAACTGACACCTAAAAATGACCCCCGCTG AGGAGAGGGGCTCGTATGCCCGGCCTTTTACAACAGGGACC TCTGTGCGATTGTGACACAATCCTGCCAGCATTCCAAAGCTC CGGTTGCCACGGAGACCCTGAAAGCTCCAGTTGGTGCCAGTC CCAGGGGCACTATGACCACCAGGAGCCACACCGCTGGTTGT GCGGTTGCTGCCATGCCACTGGCACTTGTGCCTTGGGAAGG CACAGGCCCAAGGGTTGAGTTCTCAGACATGCCTTTAAGTCC CCTGCTTCTGTGTCTCCACAGACATTGGCAAGCTTGCCATTCC AGGAGAGGAGGGTTGATGCCGAGAGCAGGTCGATTCAGTGG ATGGCAGAAGATCAAGAAGGCAAGTTCTCTCGCGGAAGCGG GACGACTTGCAGCGTAAGCAGGGAGTGACTCGAATCTTGAT GTCCTTAGCTGACGGAAGCTAGCAGAAGTCAGTACGCGGAA GCGGGTGGATTTGCATGGATCCAAGCTGGGGAGTGTTTGC ATGGATGCATGGGAATAGGTGTGAATGTGAATGAGAACAGA GCGGCCGATCCTTTTTTCGGGACAGCTCACATCTTTACATCTTC AGATCTAGTGTGTTGATTATTGGAGCAAGCATAGTGTATCGG TCAGTAGAAAGTACATGGCTTAGAGTACAGTCTGTTTGTTC AATATGTTTCTCAGTGAGGCGCTGTGTTATTTGCACACAAAT GTGCTAATCCGAAGGGCCCTTTCCCTGCACTAAGCCCCACTG AATAAGACAGGCCTTCCTTCGGAGTGCTGCTGGTTAGGCTGT TGGAGGGGATGTCACTGCCAGCAAAGCTTCTTTAACTGTAC TTCTCCCCCACGCTCTATTTACATGACATCAAGAAAAGAC CGAACAGAGAAAGCCTTGGGCACACTAATGTGGTCAAAGTA AGGCAGGCACCCTGCTCTTGCTGTTAAGGGCATGGAGCCATT CCTTACCTCCATCAAAGAAACCATCAAGAACCGTGCAGTAA GATGTAAATCTCGCCCCAGAGGGTTCCATTGGCTGGAATATC
------------	---

	ACATTGGACTTCTCCAATGCAGTCCTTGACAGGACGGGTCTT GTCTTGCTGTTGACTGTGCCAATCCAGTTACCATGCCGTGGT GCAGCTGTGGGGTGGTCTACATACGTTTCGGTGGCTTGGTTG TGTGGCTTCGGATGCCTTTTAAAAATGCCCCTTCAAGGAAC ACAACCTCTGGTACCTCTTGAAGAAAAGGACAATTCCGAAA ATAGCAGACTGGGTGCTATTTCTCGGAAGGAATGAGAAAGC ACATCCGCTTGAACAAGATTGGGGCGGGGGTGCGGAGGAGA GGCCTTCTAGAAACCCAAGCATTCTCCGTTTCTAAGCTAAAA TGTCCCAAACGTTGCTCCTTCTCCTCCTGGGAGAGGTGCTCC AGGCTTGTAATCCATCTGGCTGTCCTTCTCTGCACTTT
--	--

CMI-Sat85L	ACACAAGGCCAAATGCAAACAAAACCCTTATCAAGCTAAGA CAAAGTCCCCTTTAGAAATGTAATTCAATCTAGTTATTCCTCCC AAATGCCCTCTTTACAAAAAGAAAACAGGAAAACAATTGAG GATTTCCCTCAAAGAACTCACAGTTTTGCTCACGTCTGTTT CCTCCCGCTGGGTCTCAGAGACTGGTCTCCAGAGACTTCAGC AGCAGCTTATATAGAGCTGCTGTCTGCTTGCTCCACCCACAG GCAGGAGTCAGCAGAAGCCTTGTCCCCTTAGGCAAAGGAAG C
------------	---

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

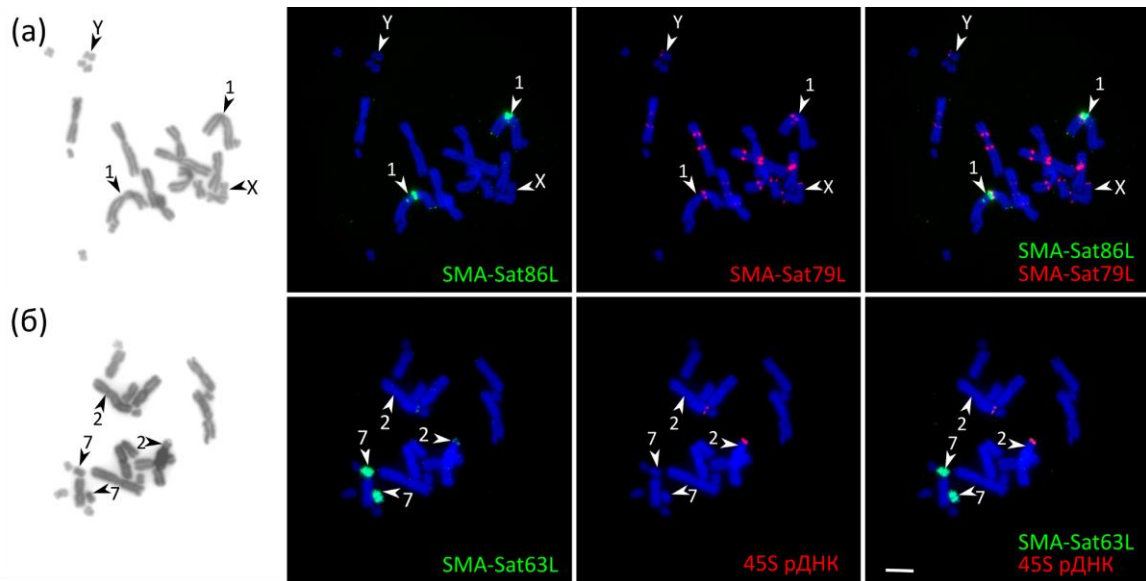


Рисунок 1. Примеры результатов FISH с зондами к последовательностям сатДНК на метафазных хромосомах самца *S. malachiticus*. Стрелками обозначены порядковые номера хромосом, на которых локализуются сигналы. Масштаб: 10 мкм

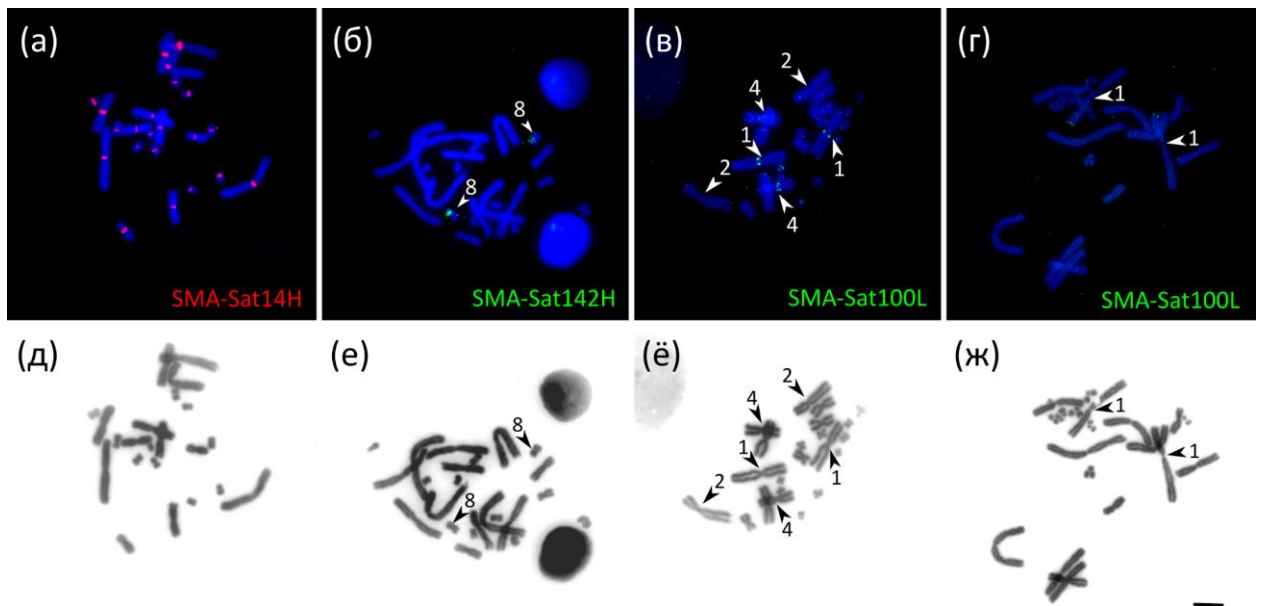


Рисунок 2. Примеры результатов FISH с зондами к последовательностям сатДНК на метафазных хромосомах самцов *S. malachiticus* (а-в, д-ё) и *S. variabilis* (г, ж). Стрелками обозначены порядковые номера хромосом, на которых локализуются сигналы. Масштаб: 10 мкм

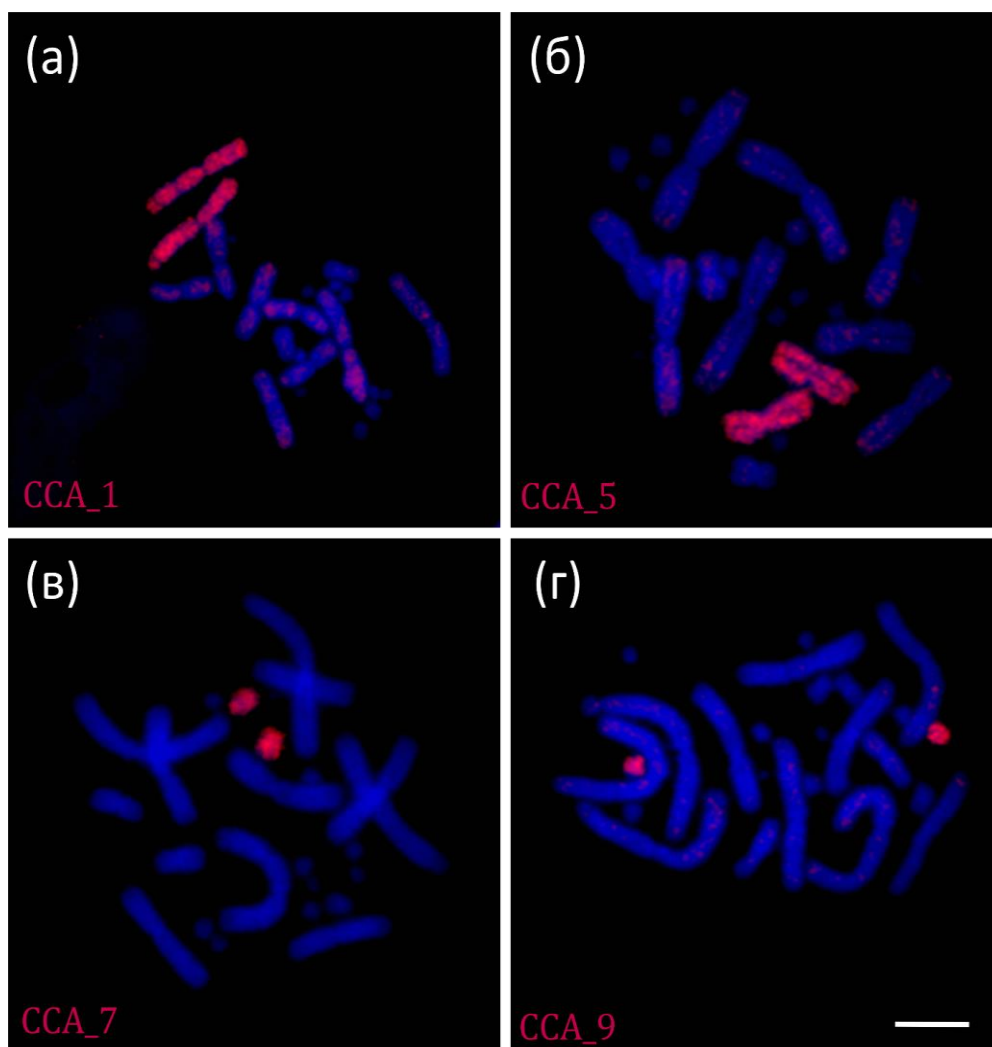


Рисунок 3. Примеры FISH с зондами, специфичными для отдельных хромосом йеменского хамелеона (*Chamaeleo calyptratus*). Масштаб: 10 мкм.