

На правах рукописи

**ТИШАКОВА КАТЕРИНА ВАЛЕРЬЕВНА**

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СОСТАВ ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМ  
ИГУАНООБРАЗНЫХ И ГЕККОНООБРАЗНЫХ**

1.5.7. – Генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2025

Работа выполнена в лаборатории сравнительной геномики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН и лаборатории структурно-функциональной организации генома ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный государственный университет» г. Новосибирск

Научный руководитель:

**Трифонов Владимир Александрович**

доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией сравнительной геномики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Официальные оппоненты:

**Баклушинская Ирина Юрьевна**

доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории эволюции генома и механизмов видообразования, ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва

**Павлова Светлана Владимировна**

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории популяционной экологии, ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, г. Москва

Ведущее учреждение:

ФГБОУВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г. на утреннем заседании Диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН» в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 10, т. (383)363-49-06, факс (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <http://www.icgbio.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Половое размножение описано у большинства эукариот. 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, в то же время пойкилотермные позвоночные – рептилии, амфибии и рыбы – демонстрируют удивительное разнообразие систем определения пола (Carel 2017), что делает их удобными объектами для изучения эволюции половых хромосом.

Одними из наиболее перспективных объектов для исследования процессов формирования и эволюции половых хромосом являются рептилии из отряда Чешуйчатые (Squamata), которые до сих пор остаются малоизученными как на геномном, так и на цитогенетическом уровнях (Pinto et al. 2023). Инфраотряды игуанообразные и гекконообразные являются одними из самых многочисленных таксонов среди чешуйчатых, которые характеризуются разнообразием систем определения пола. Среди них встречаются виды как со средовым определением пола, так и с генетическим, в том числе с половыми хромосомами систем XX/XY или ZZ/ZW, разной морфологии и степени вырожденности. Для данной работы в качестве модельных объектов были выбраны два вида игуанообразных (заборная малахитовая игуана, *Sceloporus malachiticus*, Iguanidae, и йеменский хамелеон, *Chamaeleo calytratus*, Chamaeleonidae) и два вида гекконообразных (юкатанский полосатый геккон, *Coleonyx elegans*, и центральноамериканский геккон, *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 тандемными повторами, мы секвенировали геномную ДНК исследуемых видов, выделили из полученных прочтений наиболее распространенные в геномах последовательности сателлитной ДНК и локализовали их на метафазных хромосомах.

**Цель 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 выдвинуты 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. calypttratus*) 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 calypttratus*), 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 работы.** 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.

#### **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 аутосомное происхождение.

**Апробация работы.** 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 3 публикациях в зарубежных рецензируемых журналах, входящих в международные базы цитирования (WoS, Scopus).

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

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клеточные культуры, суспензии метафазных хромосом и С-окрашивание.** В ходе работы были получены первичные культуры клеток самцов заборной малахитовой игуаны (*S. malachiticus*) и центральноамериканского геккона (*C. mitratus*) (Stanyon and Galleni 1991, Romanenko et al. 2015). Клеточные культуры самки юкатанского полосатого геккона (*C. elegans*) и самца йеменского хамелеона (*C. calypttratus*) были предоставлены Кембриджским ресурсным центром сравнительной геномики (Факультет ветеринарной медицины, Кембриджский университет, Великобритания). Для всех видов были получены суспензии метафазных хромосом. Для определения С-конститутивных районов проводилась С-предобработка препаратов метафазных хромосом по стандартной методике (Sumner 1972), с последующим использованием флуоресцентных красителей, таких как DAPI и хромомицин А3.

**Хромосомоспецифичные ДНК-библиотеки.** 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). Для *C. elegans* и *C. calypttratus* наборы сортированных хромосомных ДНК-библиотек предоставлены Лукасом Краточвилем (Карлов университет, Прага, Чехия) и Массимо Джованнотти (Политехнический университет Марке, Анкона, Италия), соответственно. Хромосомная специфичность ДНК-библиотек подтверждалась с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации.

**Выделение ДНК из клеточных культур и образцов тканей.** Геномную ДНК *C. mitratus* выделяли из тканей стандартным фенол-хлороформным методом (Sambrook and Russell 2006). Для *S. malachiticus* и *C. calypttratus* геномную ДНК выделяли из клеточных культур с помощью набора реагентов GeneJET Genomic DNA Purification Kit «Thermo Scientific».

**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 RAD-seq маркерам (M2, M3, M11, M12, M13). 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.

**Получение зондов, содержащих хромосомоспецифичные ДНК-библиотеки, сатДНК, рибосомные гены и теломерные повторы.** Нарработку и мечение зондов из хромосомоспецифичных ДНК-библиотек проводили с помощью DOP-ПЦР с использованием вырожденного праймера 6-MW (Telenius et al. 1992). Для локализации генов 45S рДНК использовалась плазмидная ДНК (pHr13) (Maden et al. 1987). Теломерная ДНК синтезирована с использованием безматричного синтеза с праймерами (TTAGGG)<sub>5</sub> и (CCCTAA)<sub>5</sub> (Ijdo et al. 1991). Мечение зондов проводили с использованием набора реагентов для ферментативной фрагментации ДНК «FTP-Display» (ДНК-Дисплей). Амплификацию и мечение зондов сатДНК проводили с помощью ПЦР. Для всех типов зондов при мечении использовались модифицированные основания, такие как биотин-11-dUTP и дигоксигенин-11-dUTP.

**Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) и анализ препаратов.** Для проверки специфичности хромосомных библиотек и локализации повторенных элементов проводили FISH полученных зондов на метафазных хромосомах соответствующих видов стандартному протоколу (Liehr et al. 2016). 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).

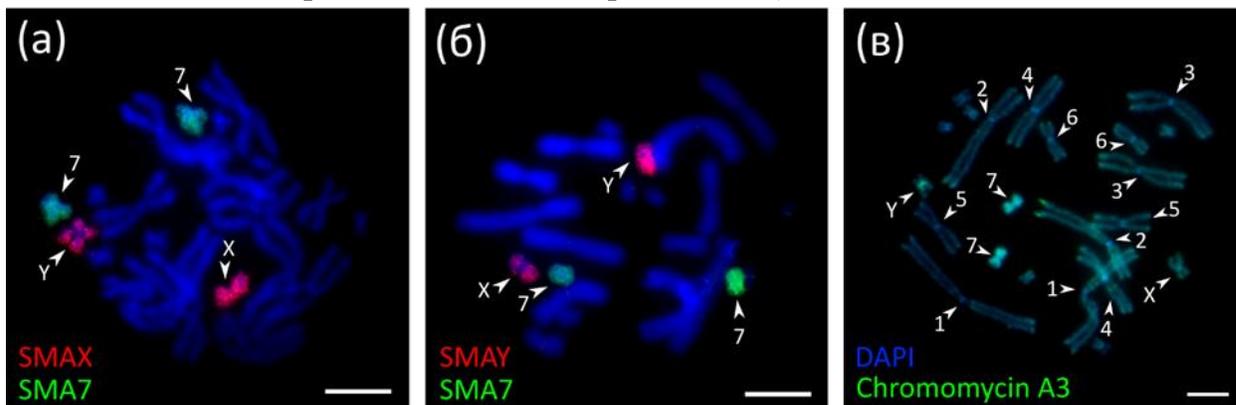
**Секвенирование и анализ данных.** Хромосомоспецифичные ДНК-библиотеки и геномную ДНК для всех видов секвенировали с низким покрытием на платформах Illumina MiSeq и MGI (BGI). Результаты секвенирования хромосомоспецифичных ДНК-библиотек обрабатывали с использованием конвейера «DOPseq\_analyzer» (Makunin и др., 2016). Обработанные прочтения были сопоставлены с геномами североамериканского красногорлого анолиса *Anolis carolinensis* (AnoCar2.0), жабовидной плоскоугой ящерицы (*Phrynosoma platyrhinos*, PPL, MUON\_PhPlat\_1.1) и пятнистого зублефара (*Eublepharis macularis*, EMA, Emac\_v1.0.1), загруженные из Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). 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).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

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

### 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). При проточной сортировке суспензии метафазных хромосом самца заборной игуаны был получен проточный кариотип, состоящий из 12 пиков. Локализация проб, созданных на основе сортировочных ДНК-библиотек *S. malachiticus*, на метафазных хромосомах того же вида показала, что большинство из них являются хромосомоспецифичными. Две ДНК-библиотеки окрашивали половые хромосомы (Рис. 1: а, б).



**Рисунок 1.** (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 DAPI-позитивные регионы в перицентромерных участках каждой пары хромосом, множественные интерстициальные и субтеломерные хромомицин-А3-позитивные блоки, полностью гетерохроматинизированную хромосому 7 и перицентромерные гетерохроматиновые блоки на половых хромосомах (Рис.1: в).

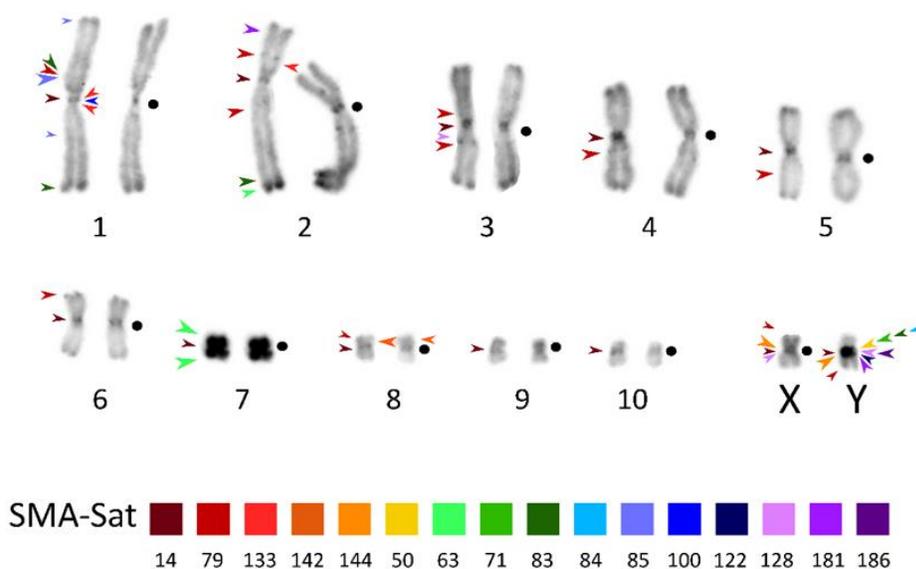
### 1.2. Сравнительный анализ данных секвенирования ДНК-библиотек *S. malachiticus*

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) и обнаружили, что большинство

макрохромосом заборной игуаны соответствуют таковым у анолиса, кроме двух исключений: небольшие участки SMA2 и SMA6 ортологичны фрагментами АСА1. Большинство микрохромосом заборной игуаны были образованы в результате слияния как минимум двух пар предковых микрохромосом. Наибольшее количество слияний демонстрируют половые хромосомы: в составе X-хромосомы обнаружены синтенные группы, которые соответствуют АСАХ, АСА11, АСА16, АСА17 и АСА18. Примечательно, что мы не обнаружили значимого сходства последовательностей Y-хромосомы с синтенной группой АСАХ, однако было выявлено сходство с хромосомами АСА11, АСА16, АСА17, АСА18.

### 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 повторенных последовательностей с помощью программы RepeatExplorer2 и инструмента TAREAN. Результаты анализа позволили выделить 17 наиболее представленных последовательностей сатДНК. Все последовательности сатДНК были локализованы на метафазных хромосомах самца *S. malachiticus* с помощью FISH (Рис.2).



**Рисунок 2.** Локализация последовательностей сатДНК на метафазных хромосомах самца *S. malachiticus*, после проведения С-окрашивания с использованием флуоресцентных красителей. Каждому сателлиту соответствует свой цвет. Стрелки указывают на расположение кластеров сатДНК; цвет стрелок определяет сатДНК соответствующего цвета, представленную в панели внизу,

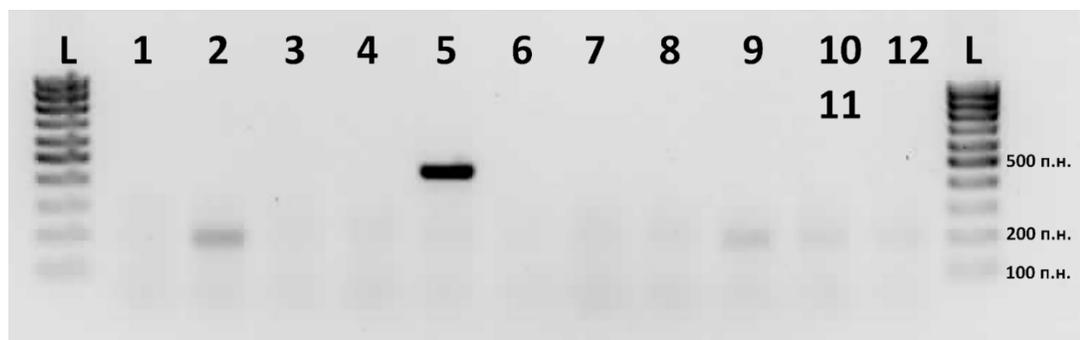
размер стрелок соответствует интенсивности сигнала. Черные точки показывают локализацию центромеры для каждой пары хромосом.

Результаты гибридизации зондов к сатДНК на метафазных хромосомах показали, что 10 из 17 последовательностей сатДНК локализуются на половых хромосомах. 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. Последовательности SMA-Sat83L и SMA-Sat181L образовывали дополнительные блоки на макрохромосомах, помимо основного сигнала на Y-хромосоме. Последовательность SMA-Sat-79H показала множество интерстициальных блоков на макрохромосомах, однако на половых хромосомах она локализовалась лишь на дистальных концах р-плеча X-хромосомы и q-плеча Y-хромосомы.

## 2. Поиск предполагаемых половых хромосом йеменского хамелеона (*Chamaeleo calytratus*, ССА) и анализ их генетического состава

### 2.1. Идентификация предполагаемых половых хромосом *C. calytratus*

Проточный кариотип *C. calytratus* состоял из 11 пиков. FISH с мечеными зондами на метафазных хромосомах самца *C. calytratus* подтверждает соответствие большинства пиков одной паре хромосом. Только один зонд окрашивал две пары хромосом (хромосомы 10 и 11). Для определения половых хромосом *C. calytratus* мы использовали ПЦР-ассоциированное картирование ранее описанных Y-специфичных RAD-seq маркеров (M2, M3, M11, M12, M13) с использованием специфичных хромосомам ДНК-библиотек в качестве матрицы (Nielsen и др., 2018). Среди пяти маркеров только маркер M2 показал достоверный ПЦР-продукт, соответствующей хромосоме 5 (Рис. 3).



**Рисунок 3.** Электрофорез в агарозном геле с результатами 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.

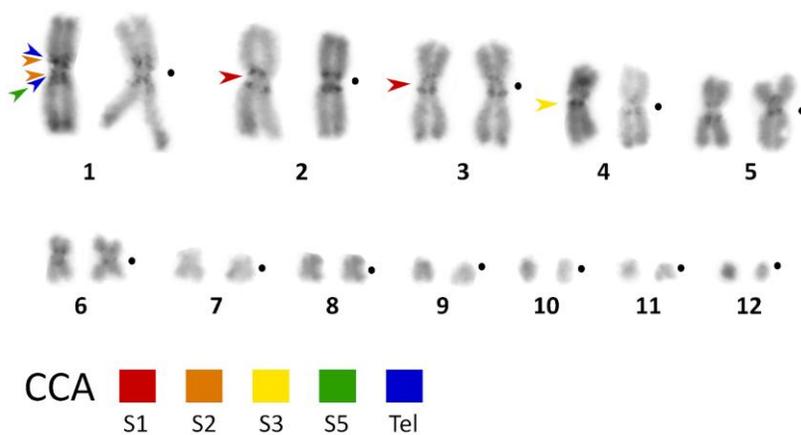
Данный результат указывает на то, что хромосома 5 может быть предполагаемой парой половых хромосом у *C. calyptratus*.

## 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 плоскоротой ящерицы (*Phrynosoma platyrhinos*, PPL, MUON\_PhPlat\_1.1) с помощью программы DOPseq\_analyzer. Сравнительный анализ показал, что предполагаемые половые хромосомы *C. calyptratus* ортологичны синтенным группам, соответствующим ACA5 и ACAX (PPL5 и PPLX, соответственно).

## 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 повторенных последовательностей с помощью программы RepeatExplorer2 и инструмента TAREAN, что позволило выделить 5 последовательностей сатДНК. Локализация полученных последовательностей сатДНК на метафазных хромосомах самца *C. calyptratus* показала их принадлежность аутосомам (Рис.4).



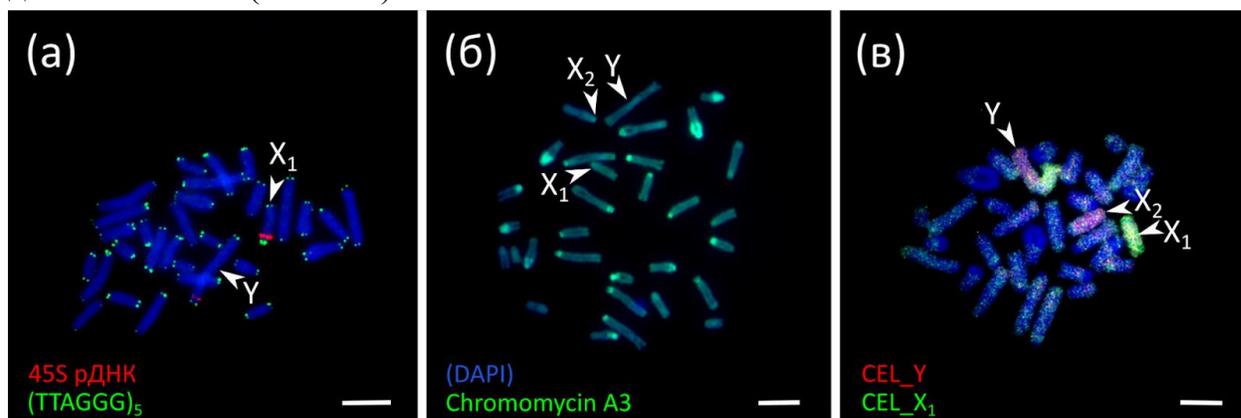
**Рисунок 4.** Локализация последовательностей сатДНК на метафазных хромосомах самца *C. calyptratus*, после проведения С-окрашивания с использованием флуоресцентных красителей. Каждому сателлиту соответствует

свой цвет. Стрелки указывают на расположение кластеров сатДНК; цвет стрелок определяет сатДНК соответствующего цвета, представленную в панели внизу, размер стрелок соответствует интенсивности сигнала. Черные точки показывают локализацию центромеры для каждой пары хромосом.

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

#### 3.1. Цитогенетическое сравнение половых хромосом *C. elegans* и *C. mitratus*

Кариотип самца *C. mitratus* полностью идентичен ранее описанному кариотипу самца *C. elegans* и состоит 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* несет ядрышкового организатора, расположенный на дистальном конце длинного плеча (Рис. 5: а).



**Рисунок 5.** (а) Результаты FISH с зондами к 45S рДНК и теломерной ДНК на метафазных хромосомах *C. mitratus*. Стрелками обозначены половые хромосомы. (б) – С-подобное окрашивание метафазных хромосом самца *C. mitratus*. Синий псевдоцвет – DAPI, зеленый – хромомицин А3. (в) FISH с сортировочными 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. 5: б). Проточный кариотип самца *C. elegans* был опубликован ранее Касаи с соавторами (Kasai, O'Brien, Ferguson-Smith, 2019). Мы локализовали зонды, основанные на ДНК-библиотеках,

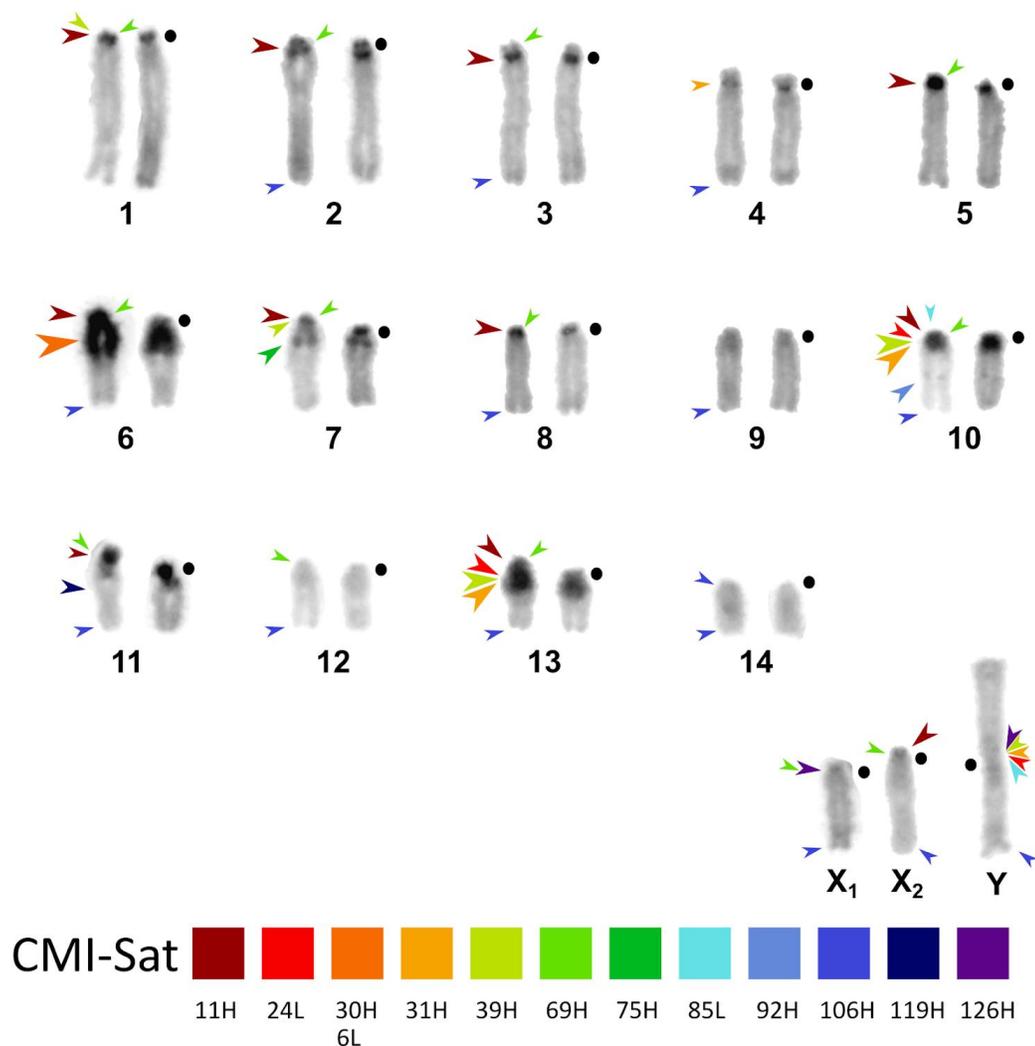
соответствующих половым хромосомам *C. elegans*, на метафазных хромосомах самца *C. mitratus* с помощью FISH (Рис. 5: в). Зонд, содержащий Y-хромосому, окрашивал метацентрическую хромосому (Y) и две акроцентрические хромосомы, на одной из которых были локализованы кластеры рибосомной ДНК (X<sub>1</sub>). Мы определили зонды, соответствующие X<sub>1</sub>- и X<sub>2</sub>-хромосомам путем совместной гибридизации зонда к Y-хромосоме с другими зондами из набора сортировочных ДНК-библиотек (Рис.5: в). Зонд, содержащий X<sub>2</sub>-хромосому, оказался контаминирован одной парой аутосом.

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

ДНК-библиотеки, содержащие последовательности X<sub>1</sub>-, X<sub>2</sub>- 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 эублефара (*Eublepharis macularis*, EMA, Emac\_v1.0.1) с помощью программы DOPseq\_analyzer. Результаты сравнительного анализа показали, что X<sub>1</sub>-хромосома ортологична синтенным группам ACA6q+ACA12 (EMA12) и ACA8 (соответствует фрагменту EMA16), в то время как X<sub>2</sub>-хромосома ортологична короткому плечу хромосомы 3 анолиса (соответствует фрагменту EMA6). В составе Y-хромосомы были обнаружены ортологии со всеми вышеперечисленными группами.

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

После секвенирования геномной ДНК самца *C. mitratus* было получено порядка 4 млн. прочтений. Из них 0.9 млн. прочтений были проанализированы в программе RepeatExplorer. Анализ данных секвенирования геномной ДНК позволил выделить 14 последовательностей сатДНК. Локализация обнаруженных последовательностей сатДНК на метафазных хромосомах *C. mitratus* с помощью FISH показала, что большинство из них локализуется в C-позитивных блоках (Рис. б). Семь последовательностей сатДНК (CMI-Sat11H, CMI-Sat-24L, CMI-Sat-31H, CMI-Sat-39H, CMI-Sat-69H, CMI-Sat-85L, CMI-Sat-106H) демонстрировали сигналы как на половых хромосомах, так и на аутосомах, только один кластер (CMI-Sat126H) оказался специфичным для X<sub>1</sub>- и Y-хромосом. Остальные последовательности сатДНК показали свою принадлежность аутосомам.



**Рисунок 6.** Локализация последовательностей сатДНК на метафазных хромосомах *C. mitratus*, после проведения С-окрашивания с использованием флуоресцентного красителя хромомицин А3. Каждому сателлиту соответствует свой цвет. Стрелки указывают на расположение кластеров сатДНК; цвет стрелок определяет сатДНК соответствующего цвета, представленную в панели внизу, размер стрелок соответствует интенсивности сигнала. Черные точки показывают локализацию центромеры для каждой пары хромосом.

## ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Половые хромосомы представителей инфраотряда игуанообразные (*Iguania*)

Для многих представителей игуан клады Pleurodonta описаны нео-половые хромосомы, сформировавшиеся в результате слияний предковой половой

хромосомы (соответствует X-хромосоме *A. carolinensis*, АСАХ) с различными аутосомами (Altmanová и др., 2018; Rovatsos и др., 2014). В рамках данной работы мы обнаружили, что нео-половые хромосомы *S. malachiticus* сформировались в результате слияний АСАХ с четырьмя парами микрохромосом (АСА11, АСА16, АСА17, АСА18). 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 АСАХ+АСА11 обнаружено в составе половых хромосом игуан рода *Ctenonotus* (Giovannotti и др., 2017; Lisachov и др., 2019) и Z-хромосомы у гекконов рода *Paroedura* (Rovatsos и др., 2019b). Слияние АСАХ+АСА18 встречается у игуан рода *Norops*, а АСА16+АСА11 входят в состав Z-хромосомы представителей семейства настоящие ящерицы (Lacertidae) (Giovannotti и др., 2017; Srikulnath и др., 2014). Кроме того, АСАХ описана в составе половых хромосом трёхкоготных черепах (Testudines: Trionychidae) (Kawagoshi и др., 2009; Rovatsos и др., 2017a), а синтенные группы АСА16 и АСА11 встречаются в составе половых хромосом у игуан клады Acrodonta.

C-позитивный блок в составе Y-хромосомы вероятнее всего соответствует некогда выродившимся последовательностям АСАХ. Результаты нашего исследования показывают, что процесс деградации сопровождается накоплением сателлитной ДНК: в C-позитивном блоке на Y-хромосоме локализуется как минимум девять последовательностей сатДНК (Рис. 2). Накопление сателлитной ДНК в гетерохроматиновых областях описано у широкого спектра видов (Ezaz, Deakin, 2014). Только последовательности SMA-Sat144H и SMA-Sat186L являются специфичными для половых хромосом, остальные сателлиты локализуются и на аутосомах.

Среди представителей семейства Chamaeleonidae генетическое определение пола описано всего для двух родов, при этом представители рода *Furcifer* характеризуются системой половых хромосом ZZ/ZW, а для йеменского хамелеона из рода *Chamaeleo* обнаружены гомоморфные половые хромосомы системы XX/XY (Rovatsos и др., 2024; Nielsen и др. 2018). Предполагается, что в течение последних 45 млн лет в семействе Chamaeleonidae произошла либо смена одной системы определения на другую, либо формирование двух независимых систем половых хромосом (Rovatsos и др., 2024). Точный возраст предполагаемых половых хромосом йеменского хамелеона остается неизвестным. Мы не обнаружили накоплений тандемных повторов или других цитогенетических различий между гомологами. Опубликованные ранее исследования не показали ни разницы в распределении конститутивных гетерохроматиновых блоков на предполагаемых

половых хромосомах при С-окрашивании метафазных хромосом *C. calypttratus* [Rovatsos и др., 2017b], ни потери генов [Nielsen и др., 2018].

Синтенные группы, обнаруженные в составе половых хромосом йеменского хамелеона, описаны в составе половых хромосом у многих видов рептилий. 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 и др., 2021) и муррайской речной черепахи (*Emydura macquarii*) (Zhu и др., 2022), а фрагмент хромосомы 1 курицы может быть ортологичен XX/XY сцинков (Kostmann и др., 2021).

Обнаружение предковой половой хромосомы игуан клады Pleurodonta (АСАХ) у представителя игуан клады Acrodonta позволяет предположить, что данная синтенная группа являлась предковой половой хромосомой и для 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 (Hansson, Olsson, 2018; Quinn и др., 2007b). Поэтому наличие синтенной группы АСАХ как в составе предковой половой хромосомы игуан клады Pleurodonta, так и в составе половых хромосом *C. calypttratus* вероятнее всего является конвергентным сходством.

Таким образом, половые хромосомы заборной малахитовой игуаны являются примером эволюционно старой системы половых хромосом, которая претерпела множество транслокаций с аутосомами, в то время как половые хромосомы йеменского хамелеона являются примером 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 АСАХ в составе половых хромосом и заборной малахитовой игуаны, и йеменского хамелеона, вероятнее всего обусловлено конвергентным течением эволюции гоносом у представителей разных клад игуанообразных.

## **2. Половые хромосомы представителей инфраотряда гекконообразные (Gekkota)**

При исследовании половых хромосом у представителей рода *Coleonyx* было выдвинуто предположение, что гоносомы *C. elegans* и *C. mitratus* ортологичны и возникли около 34 млн лет назад (Pensabene и др. 2020). Авторы данной работы смогли определить, что синтенные группы генов, располагающиеся на хромосомах 1, 6 и 11 курицы, формируют район, вырожденный на Y-хромосоме, однако генетический состав псевдоаутосомного района 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 детектируются зондами, содержащими ДНК половых хромосом *C. elegans*. Результаты сравнительного биоинформатического анализа с использованием генома североамериканского красногорлого анолиса показали, что описанная ранее синтенная группа, соответствующая хромосоме 8 анолиса (хромосома 11 курицы), располагается на  $X_1$ -хромосоме, в то время как группа АСАЗр (соответствует фрагментам хромосом 1 и 6 курицы) ортологична  $X_2$ -хромосоме. Также мы смогли выделить не описанные ранее районы ортологии  $X_1$ -хромосомы с хромосомами 12 и 6q анолиса (хромосомы 27 и 14 курицы). В то же время хромосома  $X_2$  по всей видимости полностью ортологична р-плечу хромосомы 3 анолиса (соответствует фрагментам хромосом 6 и 9 курицы). Обнаруженные нами новые синтенные группы генов, вероятно, вовлечены в формирование псевдоаутосомного района.

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 ортологична фрагменту Z-хромосомы змей кледы Caenophidia (Rovatsos и др., 2015) и X-хромосомы темного тигрового питона (*Python bivittatus*) (Gamble и др., 2017). Синтенная группа АСА12 (соответствует хромосоме 14 курицы) недавно была описана в составе ZZ/ZW половых хромосом у мраморного геккона (*Christinus marmoratus*) и псевдоаутосомной части XX/XY половых хромосом коричневого анолиса (*Anolis sagrei*) (Kichigin и др., 2016; Zhu и др., 2022). Среди ранее опубликованных 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 утконосов, которые являются псевдоаутосомными регионами (Cortez и др., 2014; Pensabene и др., 2020).

С-окрашивание метафазных хромосом самца *C. mitratus* выявило обширные С-позитивные блоки на аутосомах, в которых локализуются большинство найденных последовательностей сатДНК (Рис. 6). Несмотря на то, что половые хромосомы самца *C. mitratus* не имеют выраженных С-позитивных блоков, их перичентромерные районы также характеризуются наличием шести последовательностей сатДНК. Примечательно, что последовательности СМІ-Sat24L, СМІ-Sat31H, СМІ-Sat39H, СМІ-Sat85L, показавшие сигналы в перичентромерном районе Y-хромосомы, и последовательность СМІ-Sat11H, локализующийся на  $X_2$ -хромосоме, дают выраженные сигналы в крупных С-позитивных областях некоторых аутосом, но в то же время не обнаружены на  $X_1$ -хромосоме (Рис. 6). Кроме того, последовательность СМІ-Sat69H, локализующаяся

в перицентромерных областях на большинстве аутосом, хромосомах  $X_1$  и  $X_2$  не обнаружена на Y-хромосоме (Рис. 6). Вероятнее всего, вышеперечисленные последовательности сатДНК имеют аутосомное происхождение. Накопление повторенных элементов именно в перицентромерных районах половых хромосом может быть следствием снижения уровня рекомбинации центромерных и перицентромерных районах (Talbert, Henikoff, 2010). Только одна последовательность сатДНК (СМI-Sat-126H) оказалась специфичной для половых хромосом и формировала блоки в перицентромерных областях Y-хромосомы и  $X_1$ -хромосомы (Рис. 6). При этом на  $X_1$ -хромосоме наблюдался более яркий сигнал, чем на Y-хромосоме. Обычно гетерохроматизация и последующая дегградация характерны только для Y- и W-хромосом, в то время как X- и Z-хромосомы остаются стабильными. Однако иногда повторенные последовательности с Y- и W-хромосом могут перемещаться и накапливаться на X- и Z-хромосомах, как это произошло у некоторых полевок рода *Microtus* (Rovatsos и др., 2017с).

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

## 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 составе 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 основных работ, опубликованных по теме диссертации:**

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. and 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, 376(1833): 20200099, WoS, Scopus, IF= 6.3

2. **Tishakova K. V.**, Prokopov D. Y., Davletshina G. I., Rummyantsev A. V., O'Brien P. C., Ferguson-Smith M. A., Giovannotti M., Lisachov A. P. and Trifonov, V. A.: Identification of Iguania Ancestral Syntenic Blocks and Putative Sex Chromosomes in the Veiled Chameleon (*Chamaeleo calypttratus*, Chamaeleonidae, Iguania). *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23(24): 15838, WoS, Scopus, IF= 5.6

3. Lisachov A., **Tishakova, K.**, Romanenko S., Lisachova L., Davletshina G., Prokopov D., Kratochvíl L., O'Brien P., Ferguson-Smith M., Borodin P. and Trifonov V.: Robertsonian fusion triggers recombination suppression on sex chromosomes in *Coleonyx* geckos. *Scientific Reports* 2023, 13(1): 15502., WoS, Scopus, IF= 4.6