

Поиск маркеров, пригодных для цитогенетической идентификации отдельных хромосом, в кариотипе живородящей ящерицы *Zootoca vivipara*

Жукова Ю.^{1*}, Куприянова Л.², Попова М.³, Галкина С.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

* st121062@student.spbu.ru

Ключевые слова: Reptilia; кариотип; теломеры; флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH); хромосомная изменчивость

Мотивация и цель: *Zootoca vivipara* (Ящерица живородящая) является широко распространенным видом семейства Lacertidae (Reptilia). Этот вид обитает почти на всей территории Северной, Центральной и Восточной Европы, а также на севере Азии. Данный вид ящериц интересен своей хромосомной изменчивостью. На основании исследований кариотипов было показано, что вид *Z. vivipara* включает морфологически слабо дифференцированные подвиды и хромосомные формы с неопределенным таксономическим статусом [1]. К настоящему времени в пределах данного вида обнаружено 7 хромосомных форм [2]. Объектом нашего исследования стала восточная (русская) форма живородящей ящерицы, обитающая в восточной части Европы. Ее кариотип характеризуется разным числом хромосом у самцов ($2n = 36$) и у самок ($2n = 35$). В хромосомный набор входят 32 аутосомы и различное количество половых хромосом: 2 пары Z-хромосом у самцов ($Z_1Z_1Z_2Z_2$) и Z_1Z_2W у самок [3]. Кариотип очень сложен с цитогенетической точки зрения: все хромосомы русской формы, включая половые, являются акроцентриками, что значительно усложняет их идентификацию. С помощью С-бэндинга возможно отличить только W-хромосому от аутосом, поскольку она обладает заметными центромерным, теломерным и интерстициальным бэндами [4]. Помимо митотических хромосом, в литературе присутствуют данные и о хромосомах, полученных из сперматоцитов на стадии диакинеза профазы I мейоза ($n = 18$) [5]. На сегодняшний день в общедоступной базе генетических данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) имеется три сборки расшифрованного генома живородящей ящерицы, две из них собраны до хромосомного уровня [6]. Эти данные могут быть использованы для поиска многокопийных последовательностей, специфичных для отдельных хромосом и пригодных для разработки молекулярных зондов. Описанные ранее рассеянные повторы SINE-Zv 700, SINE-Zv 300 [7], Zv516 и Zv817 [8] локализуются практически на всех хромосомах и не могут быть использованы в качестве таких маркеров. Цель нашей работы – поиск хромосом-специфичных маркеров и разработка зондов, пригодных для идентификации в кариотипе *Zootoca vivipara* отдельных хромосом, в том числе половых, методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Методы и алгоритмы: Для получения препаратов хромосом живородящей ящерицы были получены суспензии фиксированных клеток из красного костного мозга. Ящерицы были пойманы в дикой природе на территории Ленинградской области (поселок Вырица). Цитогенетическое картирование хромосом проводили при помощи FISH с зондами к tandemным повторам, включая теломерные, биоинформатически рассчитанные повторы Zviv84A, Zviv84B и tandemные повторы, содержащие мотив CепpB. Для идентификации данных повторов в геноме ящерицы использовали специальный скрипт Python и специальный C++ скрипт [9]. К данным повторам были разработаны прямомеченные зонды Zviv84A Cy3 (5'-CAYACAGGGGAGAAACCMWTMARTGYWTGGARTGTGGAAAG) и Zviv84B FAM (5'-SCRMAGRTC GCGCGGGCGCTGTTTGCCGGGCTTGTC AAGC CMRSMWMV). Для поиска последовательностей 5S рибосомной ДНК (рДНК) и генов ядрышкового организатора в сборке генома живородящей ящерицы использовали последовательности соответствующих генов рРНК домашней курицы (GenBank X01309.1, KT445934.2). Поиск осуществляли с помощью алгоритма NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Анализ последовательностей рДНК осуществляли в программе Geneious Prime 2023.0.1 (Biomatters Ltd.). В качестве зондов для генов рРНК использовали олигонуклеотид к гену 5S рРНК (5'-ACAGCACCCGGTATTCCCAGGCGGTCTCCCAT CCAAGTACTAACCGGG) и плазмиду, содержащую фрагмент гена 18S рРНК японского перепела, на 99 % гомологичную последовательности этого же гена у живородящей ящерицы.

Результаты: При картировании зондов на митотических хромосомах ящерицы нами обнаружено, что блоки теломерного повтора (TTAGGG) $_n$ находятся только на концах хромосом, интерстициальных сайтов не выявлено. Сходное распределение наблюдалось и при картировании на хромосомах-ламповых щетках. Полученный результат совпадает с имеющимися литературными данными о том, что интерстициальные теломерные сайты довольно редко встречаются в кариотипах чешуйчатых рептилий [10]. Zviv84A в геномной сборке сконцентрирован на 2, 5, 9, 10 и 13 хромосомах. Zviv84B рассеян по хромосомам. При гибридизации с Zviv84A обнаружены яркие прителомерные сигналы только на хромосомах 2 и 5. Гибридизация с Zviv84B дает рассеянные сигналы на хромосомах, поэтому этот повтор не может быть использован в качестве хромосомного маркера. Кластеры генов 5S и 18S рРНК располагаются в геноме на хромосомах 5 и 17 соответственно.

Выводы: Зонды к tandemному повтору Zviv84A и кластерам генов 5S и 18S рРНК могут быть использованы для идентификации хромосом 2, 5 и 17 в кариотипе *Zootoca vivipara*.

Благодарность: Авторы выражают благодарность РЦ ЦКП «Хромас» Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета.

Search for markers suitable for cytogenetic identification of individual chromosomes in the karyotype of the common lizard *Zootoca vivipara*

Zhukova J.^{1*}, Kupriyanova L.², Popova M.³, Galkina S.¹

¹ Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

² Zoological Institute, RAS, St. Petersburg, Russia

³ Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

* st121062@student.spbu.ru

Key words: Reptilia; karyotype; telomeres; fluorescence *in situ* hybridization (FISH); chromosomal variation

Motivation and Aim: *Zootoca vivipara* (the common lizard) is a widespread species of the family Lacertidae (Reptilia). This species is native to much of northern Eurasia, including northern, central and eastern Europe, as well as northern Asia. This reptile is interesting for its chromosomal variability. Based on karyotype studies, it was shown that the species *Z. vivipara* includes morphologically poorly differentiated subspecies and chromosomal forms with uncertain taxonomic status [1]. To date, 7 chromosomal forms have been found within this species [2]. The object of our study was the eastern (Russian) form of the viviparous lizard inhabiting the eastern part of Europe. Its karyotype is characterized by a different number of chromosomes in males ($2n = 36$) and females ($2n = 35$). The chromosome set includes 32 autosomes and a varying number of sex chromosomes: two pairs of Z chromosomes in males ($Z_1Z_1Z_2Z_2$) and Z_1Z_2W in females [3]. The cytogenetic description of the karyotype is challenging because all chromosomes of the Russian form, including the sex chromosomes, are acrocentric. This morphology significantly complicates chromosome identification. Using C-banding, only the W chromosome can be distinguished from autosomes due to its prominent centromeric, telomeric, and interstitial bands [4]. In addition to mitotic chromosomes, data on meiotic chromosomes from spermatocytes at the diakinesis stage ($n = 18$) are also available [5]. To date, the publicly available genetic database of the US National Centre for Biotechnology Information (NCBI) contains three assemblies of the decoded genome of the viviparous lizard, two of which are assembled to the chromosomal level [6]. These data can be used to search for multicopy sequences specific to individual chromosomes, suitable for developing molecular probes. The previously described interspersed repeats SINE-Zv 700, SINE-Zv 300 [7], Zv516 and Zv817 [8] are localized on almost all chromosomes and are therefore unsuitable as such markers. The aim of our work is to search for chromosome-specific markers and develop probes suitable for the identification of individual chromosomes, including sex chromosomes, in the karyotype of *Zootoca vivipara* by fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

Methods and Algorithms: Chromosome preparations were obtained from fixed red bone marrow. Lizards were caught in the wild on the territory of the Leningrad region (in Vyritsa village). We performed FISH with probes to tandem repeats, including telomeric, bioinformatically calculated repeats Zviv84A, Zviv84B and repeats containing the CenpB motif. A special Python script and a special C++ script were used to identify these repeats in the lizard genome [9]. Directly labelled probes Zviv84A Cy3 (5'-CAYACAGGGGAGAAACCMTWTMARTGYWTGGARTGTGGAAAG) и Zviv84B FAM (5'-SCRMAGRTCGGCGGGCGCTGTTTGCCGGGCTTGTCAAGCCMRSMWMV) were designed. A domestic chicken rRNA sequence (GenBank X01309.1) was used to search for 5S ribosomal DNA (rDNA) sequences and core organizer genes in the live-bearing lizard genome assembly. Searches were performed using the NCBI BLAST algorithm (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). The rDNA sequences were analyzed using Geneious Prime 2023.0.1 software (Biomatters Ltd.), repeats containing the CenpB motive. A custom Python script and a custom C++ script were used to identify these repeats in the lizard genome [9]. Directly labelled probes Zviv84A Cy3 (5'-CAYACAGGGGAGAAACCMTWTMARTGYWTGGARTGTGGAAAG) и Zviv84B FAM (5'-SCRMAGRTCGGCGGGCGCTGTTTGCCGGGCTTGTCAAGCCMRSMWMV) were designed for these repeats. To search for 5S ribosomal

DNA (rDNA) sequences and nucleolar organizer genes in the lizard genome assembly, we used the corresponding domestic chicken rRNA genes sequences (GenBank X01309.1, KT445934.2). Searches were performed using the NCBI BLAST algorithm (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). The rDNA sequences were analyzed using Geneious Prime 2023.0.1 software (Biomatters Ltd.).

Results: We found that telomeric repeat (TTAGGG)_n blocks are only located at chromosome ends, no specific signals in interstitial sites were observed on mitotic chromosomes after FISH. A similar distribution was observed when high resolution mapping on chromosomes at the lampbrush stage. This result coincides with data reported in the literature that interstitial telomeric sites are rather rare in karyotypes of Squamata [10]. Zviv84A in the genomic assembly is concentrated on chromosomes 2, 5, 9, 10 and 13. Zviv84B is dispersed on chromosomes. FISH with the Zviv84A probe revealed bright peritelomeric signals on chromosomes 2 and 5. FISH with the Zviv84B probe gives interspersed signals, so this repeat is unsuitable as a chromosomal marker. The 5S and 18S rRNA gene clusters are located in the genome on chromosomes 5 and 17 respectively.

Conclusion: Probes specific to the tandem repeat Zviv84A and the 5S and 18S rRNA gene clusters can be used to identify chromosomes 2, 5 and 17 in the karyotype of *Zootoca vivipara*.

Acknowledgments: The authors are grateful to the Research Resource Center “Chromas” of the Science Park of St. Petersburg State University.

Список литературы/References

1. Куприянова Л.А., Мелашенко О.Б. Новые данные о внутривидовом кариотипическом разнообразии живородящей ящерицы (*Zootoca vivipara* (Lichtenstein 1823), Lacertidae): распространение и расселение на крайнем западе России. *Зоологический журнал*. 2015;1(94):106-110
[Kupriyanova L.A., Melashchenko O.B. New data on intraspecific karyotypic diversity of a viviparous lizard (*Zootoca vivipara* (Lichtenstein 1823), Lacertidae): distribution and settlement in the far west of Russia. *Zoological J*. 2015;1(94):106-110 (in Russian)]
2. Surget-Groba Y. et al. Intraspecific phylogeography of *Lacerta vivipara* and the evolution of Viviparity. *Mol Phylogenet Evol*. 2001;3(18):449-459
3. Safronova L.D., Kupriyanova L.A. Metaphase and meiotic chromosomes, synaptonemal complexes (SC) of the lizard *Zootoca vivipara*. *Russ J Genet*. 2016;11(52):1186-1191
4. Kupriyanova L.A. Karyotype diversity of the Eurasian lizard *Zootoca vivipara* (Jacquin, 1787) from Central Europe and the evolution of viviparity. In: Proceedings of the 13th Congress of the Societas Europaea Herpetologica. 2006;67-72
5. Kupriyanova L., Safronova L. A brief review of meiotic chromosomes in early spermatogenesis and oogenesis and mitotic chromosomes in the viviparous lizard *Zootoca vivipara* (Squamata: Lacertidae) with multiple sex chromosomes. *Animals*. 2022;1(12):19
6. www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=8524
7. Petraccioli A., Guarino F.M., Kupriyanova L. et al. Isolation and characterization of interspersed repeated sequences in the common lizard, *Zootoca vivipara*, and their conservation in squamata. *Cytogenet Genome Res*. 2019;157(1-2):65-76
8. Mezzasalma M., Capriglione T., Kupriyanova L. et al. Characterization of two transposable elements and an ultra-conserved element isolated in the genome of *Zootoca vivipara* (Squamata, Lacertidae). *Life*. 2023;13:637
9. Попова М.А. Анализ разнообразия больших тандемных повторов в геноме хищников. Выпускная квалификационная работа магистра. 2023
[Popova M.A. Analysis of the Diversity of Large Tandem Repeats in Carnivora. Graduation thesis. 2023 (in Russian)]
10. Rovatsos M. et al. Interstitial telomeric motifs in squamate reptiles: when the exceptions outnumber the rule. *PLoS One*. 2015;8(10):e0134985