

Описание кариотипа и сравнительный анализ генома глухаря обыкновенного (*Tetrao urogallus*)

Иванова Е.^{1,2*}, Беклемишева В.¹, Галкина С.³, О'Коннор Б.⁴, Гриффин Д.⁴,
Графодатский А.¹, Проскуракова А.¹

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Университет Кента, Кентербери, Великобритания

* ekater1na.s.ivanova@yandex.ru

Ключевые слова: *Gallus gallus*; *Burhinus oedicnemus*; сравнительный хромосомный пэинтинг; бактериальные искусственные хромосомы (BAC); конститутивный гетерохроматин; рибосомные гены; теломера

Мотивация и цель: Обыкновенный глухарь (*Tetrao urogallus*) является распространенным видом на территории Европы и Азии, в том числе занимает широкий ареал на территории России. Глухарь входит в состав отряда курообразные, семейство фазановые (Galliformes, Phasianidae). Отряд курообразные входит в базальную ветвь клады новонебных (Neognathae), охватывающей большинство современных птиц. Несмотря на наличие Hi-C сборки генома хромосомного уровня, выполненной в рамках проекта Darwin Tree of Life [1], в литературе отсутствуют данные о кариотипе обыкновенного глухаря. Целью настоящего исследования стало всестороннее изучение хромосомного набора глухаря и сравнение его с кариотипом гипотетического общего предка новонебных (Neognathae). Для достижения этой цели необходимо описать кариотип глухаря с применением различных методов дифференциального окрашивания хромосом, локализовать методом FISH уникальные последовательности курицы (*Gallus gallus*), клонированные в искусственных бактериальных хромосомах (BAC), и хромосомоспецифичные зонды авдотки (*Burhinus oedicnemus*), а также привязать хромосомные скаффолды к хромосомам глухаря.

Методы и алгоритмы: Для получения препаратов хромосом обыкновенного глухаря получены первичные клеточные культуры фибробластов и суспензии фиксированных метафазных клеток по ранее разработанной методике [2]. Для описания кариотипа с использованием красителя Гимза получены рутинно окрашенные хромосомы и применены различные методы дифференциального окрашивания (GTG-, CBG-, CDAG-) [3–5]. Для выявления гомологичных районов в кариотипах обыкновенного глухаря и авдотки методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) [6] были использованы хромосомоспецифичные зонды, разработанные для авдотки [7]. Для сравнения кариотипов глухаря и курицы были использованы BAC-клоны, содержащие уникальные последовательности курицы (CHORI-261) [8]. Для локализации теломерных и ядрышкообразующих районов в кариотипе глухаря были использованы пробы, содержащие теломерные повторы [9] и зонды к генам 18S и 28S рРНК [10]. Все зонды были синтезированы с включением меченых нуклеотидов и локализованы на хромосомах. Выравнивание

сборок геномов хромосомного уровня курицы [11] и обыкновенного глухаря [1] и визуализация синтенных групп были осуществлены в программе Geneious.

Результаты: Впервые описан кариотип обыкновенного глухаря с помощью рутинного окрашивания и методов GTG-, CBG-, CDAG-бэндинга. Наши результаты по подсчету диплоидного числа хромосом у этого вида ($2n = 78$) совпадают с более ранними оценками и в целом согласуются с количеством скаффолдов, полученных при сборке генома. На основании данных FISH с пробами хромосом авдотки и ВАС-клонов курицы, а также с теломерными повторами и рибосомными генами были выявлены ортологичные районы на 29 аутосомах и Z-хромосоме обыкновенного глухаря. На основании этих данных стало возможным соотнести хромосомные скаффолды с хромосомами обыкновенного глухаря. Нами были обнаружены несоответствия между физическим размером хромосом и относительным размером скаффолдов.

Показано согласование молекулярно-цитогенетических и сравнительно-биоинформатических данных, которые выявили слияние хромосом 6 и 8 и разрыв хромосомы 2, ортологичной хромосомам курицы, в кариотипе глухаря. Ортолог хромосомы 4 курицы сохраняет структуру общего предка новонебных, представленную хромосомой 4 и микрохромосомой. Выравнивание геномов в Geneious показало, что макрохромосомы глухаря сохраняют порядок консервативных сегментов, характерный для курицы. Локализация ВАС-клонов курицы на хромосомах глухаря с помощью FISH подтвердила данные сравнения геномов, полученные при анализе *in silico*. В микрохромосомах не было выявлено транслокаций как биоинформатически, так и с помощью FISH. Инверсии на хромосомах глухаря 6, 10, 17, 23 и 28 выявлены с помощью биоинформатического анализа, но не подтвердились молекулярно-цитогенетическими данными.

Выводы: Впервые получено полное описание кариотипа обыкновенного глухаря (*Tetrao urogallus*, $2n = 78$) с использованием методов классической, дифференциальной и молекулярной цитогенетики. В результате интеграции биоинформатического и цитогенетического подходов установлено соответствие между хромосомными скаффолдами и хромосомами обыкновенного глухаря. Согласно полученным данным, кариотип глухаря высококонсервативен и практически не отличается от кариотипа общего предка новонебных (*Neognathae*) [12]. Хромосомы 6, 10, 17, 23 и 28 обыкновенного глухаря характеризуются наличием инверсий в сравнении с ортологичными хромосомами курицы. Было показано, что кариотип обыкновенного глухаря отличается от кариотипа курицы двумя слияниями (ортологичными хромосомам 6 и 8, 31 и 35 курицы) и разрывом элемента, ортологичного хромосоме 2 курицы.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФИ (№ 23-74-01016).

Description of the karyotype and comparative analysis of the western capercaillie (*Tetrao urogallus*) genome

Ivanova E.^{1, 2*}, Beklemisheva V.¹, Galkina S.³, O'Connor R.⁴, Griffin D.K.⁴, Graphodatsky A.¹, Proskuryakova A.¹

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

⁴ University of Kent, Canterbury, UK

Key words: *Gallus gallus*; *Burhinus oedicnemus*; comparative chromosome painting; bacterial artificial chromosomes (BAC); constitutive heterochromatin; ribosomal genes; telomere

Motivation and Aim: Western capercaillie (*Tetrao urogallus*) is a common species in Europe and Asia, including the territory of Russia. The capercaillie is a part of order Galliformes, family Phasianidae. Galliformes belong to the basal branch of Neognathae, which includes the most modern birds. Despite the presence of a chromosome level genome assembly of capercaillie based on Hi-C technologies, which was obtained as part of the Darwin Tree of Life project [1], there is no published data on the karyotype of western capercaillie. The purpose of this study was to conduct a comprehensive analysis of the chromosomal set of western capercaillie and to compare it with the karyotype of the hypothetical common ancestor of neopalates (Neognathae). To achieve this goal, it was necessary to characterize the karyotype of western capercaillie using various methods of differential chromosome staining, localize the set of chicken (*Gallus gallus*) sequences cloned in bacterial artificial chromosomes (BAC) and chromosome-specific probes of Eurasian stone-curlew (*Burhinus oedicnemus*) using FISH, and link chromosome scaffolds the chromosomes.

Methods and Algorithms: To obtain metaphase plates of western capercaillie, cell cultures of fibroblasts and suspensions of fixed metaphase cells were obtained according to a previously developed method [2]. The karyotype was described using Giemsa staining, routine staining and various differential staining methods (GTG-, CBG-, CDAG-) [3–5]. To identify homologous regions in the karyotypes of western capercaillie and Eurasian stone-curlew with fluorescent in situ hybridization (FISH) [6], chromosome-specific probes developed for Eurasian stone-curlew were used [7]. To compare the karyotypes of capercaillie and chicken, BAC clones containing unique chicken sequences (CHORI-261) were used [8]. To localize telomeric and nucleolus organizer regions in western capercaillie karyotype, samples containing telomeric repeats [9] and probes for the 18S and 28S rRNA genes [10] were used. All probes were synthesized with labeled nucleotides and localized on chromosomes. Alignment of chromosome level genome assemblies of chicken [11] and capercaillie [1] and visualization of syntenic groups was carried out in Geneious.

Results: For the first time, the karyotype of the western capercaillie was described using routine staining and GTG-, CBG-, and CDAG-banding methods. Our results of counting the diploid number of chromosomes in this species ($2n = 78$) coincide with earlier estimates and are generally consistent with the number of scaffolds obtained during genome assembly. Based on FISH data with samples of Eurasian stone-curlew chromosomes and chicken BAC-clones, as well as with telomeric repeats and ribosomal genes, orthologous regions were identified on 29 autosomes and the Z-chromosome of western capercaillie. Based on these data, it became possible to correlate chromosome scaffolds with chromosomes of western capercaillie. We found discrepancies between the physical size of chromosomes and the relative size of scaffolds.

The agreement between molecular cytogenetic and comparative bioinformatics data is shown, which revealed the fusion of chromosomes 6 and 8 and the fission of chromosome 2 orthologous to chicken chromosomes, in the karyotype of capercaillie. The ortholog of chicken chromosome 4 in capercaillie retains structure of the common ancestor of neopalates being presented by chromosome 4 and microchromosome.

Genome alignment in Geneious showed that the capercaillie macrochromosomes retain the order of conserved segments of the chicken. Localization of chicken BAC clones on western capercaillie chromosomes using FISH confirmed the genome comparison data obtained from *in-silico* analysis. No translocations were detected in microchromosomes either bioinformatically or using FISH. Inversions on the 6, 10, 17, 23 and 28 chromosomes of the capercaillie were identified using bioinformatics analysis, but were not supported by molecular cytogenetic data.

Conclusions: For the first time, a complete description of the karyotype of western capercaillie (*Tetrao urogallus*, $2n = 78$) has been obtained using the methods of classical, differential and molecular cytogenetics. As a result of bioinformatic and cytogenetic approaches, correspondences were established between the scaffolds and chromosomes of western capercaillie. According to the data obtained, the karyotype of capercaillie is highly conservative and highly similar with the karyotype of the common ancestor of neopalates (Neognathae) [12]. Chromosomes 6, 10, 17, 23 and 28 of western capercaillie differ from the orthologous chromosomes of the chicken by inversions. It was shown that the karyotype of the common capercaillie differs from the chicken karyotype by two fusions (orthologous to chicken chromosomes 6 and 8, 31 and 35) and a fission of an element orthologous to chicken chromosome 2.

Funding: The study is supported by the research grant No. 23-74-01016 from the Russian Science Foundation.

Список литературы/References

1. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_951394365.1/
2. Romanenko S.A. et al. Segmental paleotetraploidy revealed in sterlet (*Acipenser ruthenus*) genome by chromosome painting. *Mol Cytogenet.* 2015;8(1):90
3. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet.* 1971;298(7731):971-972
4. Sumner A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res.* 1972;75(1):304-306
5. Lemskaya N.A. et al. A combined banding method that allows the reliable identification of chromosomes as well as differentiation of AT-and GC-rich heterochromatin. *Chromosom Res.* 2018;12(26):307-315
6. Nie W. et al. Avian comparative genomics: Reciprocal chromosome painting between domestic chicken (*Gallus gallus*) and the stone curlew (*Burhinus oedicnemus*, Charadriiformes). An atypical species with low diploid number. *Chromosom Res.* 2009;17(1):99-113
7. <https://bacpacresources.org>
8. Liehr T. Fluorescence in Situ Hybridization (FISH). Springer, 2017
9. Maden B.E.H. et al. 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. *Biochem J.* 1987;246(2):519-527
10. Ijdo J.W. et al. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(17):4780
11. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_016699485.2/
12. Kretschmer R. et al. Interspecies chromosome mapping in caprimulgiformes, piciformes, suliformes, and trogoniformes (Aves): Cytogenomic insight into microchromosome organization and karyotype evolution in birds. *Cells.* 2021;10(4):826