


Районы, обогащенные повторенными последовательностями ДНК, в хромосомах *Macrostomum mirumnovem* – вида, недавно прошедшего полногеномную дупликацию

К.С. Задесенец, Н.Б. Рубцов 

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

 e-mail: rubt@bionet.nsc.ru

Аннотация. Свободноживущий плоский червь *Macrostomum mirumnovem* – неополитиплоидный вид, его геном претерпел недавнюю полногеномную дупликацию (Whole Genome Duplication, WGD). В результате слияния гаплоидного хромосомного набора в его кариотипе произошло формирование двух новых крупных хромосом, MMI1 и MMI2. Создание микродиссекционных ДНК-библиотек, обогащенных повторенными последовательностями ДНК, и их последующая гибридизация *in situ* с метафазными хромосомами *M. mirumnovem* выявили в этих хромосомах районы, обогащенные повторенными последовательностями ДНК. Разные ДНК-пробы устанавливали в хромосомах *M. mirumnovem* районы, обогащенные разными повторенными последовательностями. Локализация и размер этих районов варьировали в разных копиях крупных хромосом, это предполагало их дивергенцию и снижение уровня гомологии, что может после полной дупликации генома приводить к его редиплоидизации. Помимо возникших *de novo* районов хромосом основного набора, обогащенных повторенными последовательностями, в кариотипе у большинства исследованных особей обнаружены В-хромосомы, которые варьировали по размеру и морфологии. Различия в составе ДНК у этих В-хромосом были показаны с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с полученными микродиссекционными ДНК-пробами на хромосомном материале, взятом от разных животных. Флуоресцентная гибридизация *in situ* этих ДНК-проб по-разному окрашивала В-хромосомы, содержащиеся в кариотипах у разных особей *M. mirumnovem*. Часть В-хромосом интенсивно окрашивалась при проведении FISH, тогда как на других В-хромосомах гибридизационных сигналов не было. Специфический FISH-сигнал отсутствовал даже в прицентромерных районах таких В-хромосом. В настоящей статье обсуждаются возможные механизмы возникновения и последующей эволюции В-хромосом у *M. mirumnovem*. Полученные результаты указывают на важную роль повторенных последовательностей, которую они могут играть в процессе реорганизации генома, приводя к быстрой дифференциации дуплицированных копий хромосом. Высокий уровень внутривидового кариотипического разнообразия по численному и структурному хромосомным перестройкам и по формированию новых хромосомных районов, обогащенных повторенными последовательностями, а также небольшой размер тела (~2 мм) и простота поддержания лабораторных культур *M. mirumnovem* делают этот вид перспективной моделью в исследованиях геномной и кариотипической эволюции видов, недавно прошедших полногеномную дупликацию.


Ключевые слова: микродиссекция метафазных хромосом; ДНК-пробы; повторенные последовательности ДНК; транспозиция мобильных элементов; FISH; амплификация ДНК; В-хромосомы.

Для цитирования: Задесенец К.С., Рубцов Н.Б. Районы, обогащенные повторенными последовательностями ДНК, в хромосомах *Macrostomum mirumnovem* – вида, недавно прошедшего полногеномную дупликацию. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6):636-642. DOI 10.18699/VJ20.657

Regions enriched for DNA repeats in chromosomes of *Macrostomum mirumnovem*, a species with a recent Whole Genome Duplication

K.S. Zadesenets, N.B. Rubtsov 

Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 e-mail: rubt@bionet.nsc.ru

Abstract. The free-living flatworm *Macrostomum mirumnovem* is a neopolyploid species whose genome underwent a recent Whole Genome Duplication (WGD). In the result of chromosome fusions of the ancient haploid chromosome set, large metacentric chromosomes were formed. In addition to three pairs of small metacentrics, the current karyotype of *M. mirumnovem* contains two pairs of large metacentric chromosomes, MMI1 and MMI2. The generation of microdissected DNA libraries enriched for DNA repeats followed by DNA probe preparation and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) were performed. The DNA probes obtained marked chromosome regions enriched for different DNA repeats in the *M. mirumnovem* chromosomes. The size and localization of these regions varied in different copies

of large chromosomes. They varied even in homologous chromosomes, suggesting their divergence due to genome re-diploidization after a WGD. Besides the newly formed chromosome regions enriched for DNA repeats, B chromosomes were found in the karyotypes of the studied specimens of *M. mirumnovem*. These B chromosomes varied in size and morphology. FISH with microdissected DNA probes revealed that some Bs had a distinct DNA content. FISH could paint differently B chromosomes in different worms and even in the same sample. B chromosomes could carry a bright specific fluorescent signal or could show no fluorescent signal at all. In latter cases, the specific FISH signal could be absent even in the pericentromeric region of the B chromosome. Possible mechanisms of B chromosome formation and their further evolution are discussed. The results obtained indicate an important role that repetitive DNAs play in genome re-diploidization initiating a rapid differentiation of large chromosome copies. Taking together, karyotype peculiarities (a high level of intraspecific karyotypic diversity associated with chromosome number variation, structural chromosomal rearrangements, and the formation of new regions enriched for DNA repeats) and some phenotypic features of *M. mirumnovem* (small body size, short life-cycle, easy maintenance in the laboratory) make this species a perspective model in the studies of genomic and karyotypic evolution in species passed through a recent WGD event.

Key words: metaphase chromosome microdissection; DNA probes; repetitive DNA; mobile element transposition; FISH; DNA amplification; B chromosomes.

For citation: Zadesenets K.S., Rubtsov N.B. Regions enriched for DNA repeats in chromosomes of *Macrostomum mirumnovem*, a species with a recent Whole Genome Duplication. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):636-642. DOI 10.18699/VJ20.657

Введение

Сравнительная геномика открыла новые возможности для изучения механизмов возникновения полногеномной дупликации (Whole Genome Duplication, далее WGD) и последствий такого крупномасштабного изменения генома, затрагивающего практически все гены. Показано, что значительная часть современных видов растений и животных представляет собой результат как минимум одного, а чаще нескольких раундов WGD (Wendel, 2000; Papouliou et al., 2003; Dehal, Boore, 2005). В большинстве филогенетических линий животных они имели место сотни миллионов лет назад, и современные виды представляют собой палеополиплоиды, в геномах которых можно выявить лишь следы WGD (Dehal, Boore, 2005). В связи с этим сравнительный анализ их геномов может дать лишь ограниченные представления о механизмах возникновения WGD и последующих процессах реорганизации дуплицированного генома. Принято считать, что существует два основных механизма прохождения WGD: автополиплоидизация, результатом которой является автотетраплоидный геном, и аллополиплоидизация – удвоение генома организма, возникшего в результате межвидовой гибридизации. В последнем случае сформированный геном содержит геномы обоих родительских видов, т.е. может сохранять многие черты своего гибридного предка. Роль WGD в эволюции генома у животных недавно была подробно рассмотрена в работе (Задесенец, Рубцов, 2018).

Раунды WGD обнаружены в геномах у представителей различных филогенетических линий: грибов, растений, животных. Полученные разными исследовательскими группами данные свидетельствуют о том, что их число существенно отличается в разных таксонах, например у ротифер – 1, у большинства видов позвоночных – 2, у многих видов растений – 3, у лососевых рыб – 4 (Dehal, Boore, 2005; Glasauer, Neuhaus, 2014; Kenny et al., 2018). У репы *Brassica rapa* в геномной эволюции имело место чередование нескольких событий полногеномных дупликаций и даже трипликации всего генома (Moghe et al., 2014). Ряд современных биологов полагает, что WGD могут создавать предпосылки для дальнейших крупных эволюционных преобразований, но некоторые исследователи придерживаются иной точки зрения, считая большинство

пост-WGD видов тупиковой ветвью эволюции (Mayrose et al., 2011; Soltis et al., 2014). К сожалению, из-за отсутствия необходимой методической базы основные исследования долгое время были посвящены полиплоидии и WGD у растений. Появление новых методов молекулярной генетики, совершенствование технологий массового параллельного секвенирования принципиально изменили положение дел в этой области биологии (Задесенец и др., 2017). Возникло новое направление – сравнительная геномика, и все больше видов животных оказывается вовлеченными в эти исследования (Comparative Genomics, 2000). Одна из острых проблем в этой области – крайне небольшое число видов, в эволюции которых WGD произошла относительно недавно (Задесенец, Рубцов, 2018).

Нужно отметить, что большое число полиплоидных вариантов, вероятно, – действительно тупиковые ветви эволюции (Mayrose et al., 2011; Barker et al., 2016), представляющие собой новые, менее конкурентоспособные, по сравнению со своими диплоидными предками, варианты. Тем не менее следы WGD, обнаруженные в геномах практически всех ныне живущих видов, указывают на существенный вклад WGD при формировании принципиально новых механизмов адаптации к условиям окружающей среды (Glasauer, Neuhaus, 2014; Fisher et al., 2018). Несмотря на то, что WGD может быть ключевым событием в формировании новых филогенетических линий, возможности изучения самого феномена WGD и запускаемых им процессов на ранних этапах реорганизации генома в значительной степени ограничены. Стремительный прогресс в развитии новых методов молекулярной генетики и геномики открыл большие возможности и перспективы в исследованиях эволюции на новом, геномном, уровне. Однако число перспективных объектов и моделей для изучения WGD остается очень небольшим. Вовлечение в исследования новых видов, геномы которых были сформированы в результате недавней WGD, становится одной из наиболее актуальных задач. Группа видов свободноживущих плоских червей рода *Macrostomum* может оказаться одной из таких перспективных модельных систем.

Молекулярно-цитогенетический анализ кариотипа и генома *Macrostomum lignano* показал, что основные особенности его организации, отличающие его от кариоти-

пов большинства других видов макростомид, связаны с недавней WGD, которую претерпел геном этого вида в ходе его эволюции (Zadesenets et al., 2017a, b). Кариотипы у большинства представителей рода *Macrostomum* состоят из небольшого числа мелких метацентрических хромосом (Egger, Ishida, 2005; Zadesenets et al., 2016; Schärer et al., 2020). Полагают, что базальным предковым кариотипом служит кариотип $2n = 6$, вследствие WGD число хромосом которого оказалось удвоенным, увеличившись до $2n = 12$, у ряда видов. В результате слияния всех хромосом гаплоидного набора предкового вида в одну хромосомное число *M. lignano* уменьшилось до восьми (Egger, Ishida, 2005; Zadesenets et al., 2016). Более того, в паралогичных районах хромосом *M. lignano* были обнаружены дополнительные различия, которые возникли, скорее всего, уже после WGD (Zadesenets et al., 2017a, b). Установленная нестабильность кариотипа *M. lignano*, вероятно, – также следствие продолжающегося процесса редиплоидизации его генома. Кариотипирование новых видов рода *Macrostomum* привело к открытию нами еще одного вида, геном которого представляет собой результат недавнего независимого раунда WGD, сопровождающегося интенсивной реорганизацией кариотипа, включающей слияния предковых хромосом, структурные хромосомные перестройки, обогащение районов крупных хромосом повторами, а также формирование В-хромосом (Zadesenets et al., 2020). Результаты молекулярно-цитогенетического анализа хромосом *M. mirumnovem* свидетельствуют о том, что расселение и амплификация повторенных последовательностей играют большую роль в реорганизации кариотипа этого вида. Настоящая работа, посвященная анализу распределения в хромосомах *M. mirumnovem* некоторых из таких повторов, основана на создании микродиссекционных ДНК-проб, содержащих главным образом повторенные последовательности ДНК.

Материалы и методы

Лабораторная аутбредная культура свободноживущих червей вида *M. mirumnovem*. В работе использована лабораторная культура *M. mirumnovem*, любезно предоставленная проф. Лукасом Шарером (Зоологический институт Университета Базеля, Швейцария). Особи *M. mirumnovem* культивировали в лаборатории морфологии и функции клеточных структур Института цитологии и генетики СО РАН более года. Первичное кариотипирование было проведено через три месяца после сбора образцов *M. mirumnovem* из природных популяций (Zadesenets et al., 2020). Уже на этом этапе был выявлен высокий уровень кариотипического разнообразия. Наиболее часто встречающийся кариотип состоял из девяти хромосом: непарный, самый крупный метацентрик (ММ11), пара метацентрических хромосом (ММ12), несколько уступающих ему по размеру, и три пары мелких метацентрических хромосом ММ13–ММ15 (Schärer et al., 2020; Zadesenets et al., 2020).

Молекулярно-цитогенетический анализ, включающий получение микродиссекционных полнохромосомных ДНК-проб для всех хромосом *M. mirumnovem* (Задесенец, Рубцов, 2020), показал, что крупные хромосомы ММ11–ММ12 сформировались в результате слияния всех хромосом предкового гаплоидного набора. В сфор-

мированных таким образом хромосомах, вероятно, произошли активное расселение мобильных элементов и амплификация последовательностей ДНК, приведшая к возникновению многочисленных районов, обогащенных повторенными последовательностями (Zadesenets et al., 2020). Мониторинг кариотипа у особей *M. mirumnovem*, выполненный перед проведением микродиссекции мелких метацентриков, обнаружил увеличение кариотипического разнообразия у особей лабораторной культуры и увеличение в ней частоты встречаемости В-хромосом. В нашем исследовании для получения микродиссекционных ДНК-проб брали только метафазные пластинки с кариотипом $2n = 9$. При проведении флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) использовали препараты метафазных хромосом, полученные из особей с различными вариантами кариотипа.

Приготовление препаратов метафазных хромосом.

Регулярный мониторинг, включающий кариотипирование индивидуальных особей лабораторной культуры, проводили по описанному ранее стандартному протоколу (Zadesenets et al., 2016). Для каждой кариотипированной особи проанализировано не менее 10 метафазных пластинок. Препараты для осуществления микродиссекции готовили, применяя суспензионный метод, позволяющий добиться лучшей сохранности ДНК диссецируемых хромосом. Для приготовления фиксированной суспензии митотических клеток брали 100 половозрелых особей. Процедуру выполняли согласно стандартной методике, описанной ранее (Zadesenets et al., 2016). Метафазные пластинки распластывали на чистых, влажных холодных покровных стеклах ($60 \times 24 \times 0.17$ мм), что позволяло выполнять микродиссекцию при максимально возможном увеличении инвертированного микроскопа Axiovert 10 (ZEISS, Германия).

Окрашивание метафазных хромосом. При рутинном кариотипировании хромосомы окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole solution), растворенным в среде для заключения VECTASHIELD® (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, США), содержащей антифейд, в соответствии со стандартным протоколом. Препараты метафазных хромосом, подготовленные для проведения микродиссекции, окрашивали в 2 % растворе красителя Гимза (в однократном фосфатном буфере pH = 7.2, ПанЭко, Москва, РФ) (Задесенец, Рубцов, 2020).

Микроскопический анализ хромосомных препаратов выполнен в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН в Институте цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, РФ) с помощью люминесцентного микроскопа AxioPlan 2 (ZEISS, Германия), оснащенного CCD-камерой и комплектом фильтров #49, #10 и #15 (ZEISS). Для регистрации и последующей обработки микроскопических изображений хромосом применяли программное обеспечение ISIS4 (METASystems GmbH, Германия).

Микродиссекция метафазных хромосом и получение микродиссекционных ДНК-проб. Техника микродиссекции метафазных хромосом, примененная для получения ДНК-проб из хромосом разных видов рода *Macrostomum*, описана ранее (Zadesenets et al., 2016). Для амплификации

микроманипуляционно собранного материала метафазных хромосом использовали стандартный вариант сиквенс-независимой амплификации ДНК, как показано ранее (Zadesenets et al., 2017a, b). Процедура микродиссекции от выбора метафазной пластинки до переноса диссектированного материала в пробирку с реакционной смесью подробно представлена в работе (Задесенец, Рубцов, 2020).

В настоящем исследовании собран материал единичных копий двух мелких хромосом. Отличие в приготовлении ДНК-проб от стандартного протокола заключалось в модификации состава коллекционного буфера, в который непосредственно собирали диссектированный хромосомный материал (~40 нл в оттянутом силиконизированном носике Пастеровской пипетки). Коллекционная капля содержала буфер для лизиса белков и фрагментации ДНК (коммерческий буфер из кита Whole Genome Amplification 4 (WGA4) kit, Sigma-Aldrich, США) и 0.1 % неионный детергент Triton X-100 (VWR Life Science AMRESCO, США). Все последующие этапы подготовки ДНК к амплификации и непосредственно амплификация ДНК проведены согласно ранее описанному протоколу (Zadesenets et al., 2016, 2017a, b) при увеличенном числе циклов ПЦР (35 циклов) на последнем этапе приготовления микродиссекционной ДНК-библиотеки.

Создание микродиссекционных ДНК-библиотек включает два этапа: первый – создание из ДНК диссектированного хромосомного материала фрагментов ДНК, фланкированных соответствующими последовательностями (WGA4 kit, Sigma-Aldrich, США); второй – амплификация таких фрагментов в полимеразной цепной реакции (ПЦР). В зависимости от эффективности получения фрагментов, фланкированных соответствующими последовательностями на первом этапе, либо в амплификацию вовлекаются последовательности, многократно повторенные в геноме, и значительная часть уникальных и низкоповторенных последовательностей, либо из-за уменьшенной доли последовательностей ДНК, вовлеченных в амплификацию, преимущественно происходит амплификация многократно повторенных последовательностей. Таким образом, при уменьшении эффективности создания фрагментов ДНК, способных к амплификации на первом этапе создания ДНК-библиотек, представленность уникальных последовательностей ДНК в полученных микродиссекционных ДНК-библиотеках значительно уменьшается, а полученные ДНК-библиотеки оказываются обогащенными повторными последовательностями. Увеличение числа циклов ПЦР на втором этапе создания микродиссекционной ДНК-библиотеки позволяет получить необходимое количество продукта. Модификация коллекционного буфера, использованного на первом этапе создания ДНК-библиотек, обусловила создание ДНК-библиотек,кратно обогащенных высокоповторенными последовательностями, что подтвердило практически полное отсутствие сигнала в большинстве эухроматиновых районов хромосом, после FISH с ДНК-пробами на их основе.

Полученный продукт полимеразной цепной реакции метили в 20 дополнительных циклах ПЦР в присутствии модифицированных нуклеотидтрифосфатов, конъюгированных с флуорохромами: Flu-12-dUTP [fluorescein-5(6)-carboxamidocaproyl-[5(3-aminoallyl)2'-deoxyuri-

dine-5'-Triphosphate] (Биосан, Новосибирск, РФ) или TAMRA-5-dUTP (5-tetramethylrhodamine-dUTP) (Биосан) (Zadesenets et al., 2017a, b). Для мечения использовали кит GenomePlex® Whole Genome Amplification Reamplification kit (WGA3) (Sigma-Aldrich, США).

Флуоресцентную гибридизацию *in situ* с метафазными хромосомами *M. mirumnovem* осуществляли согласно протоколу (Zadesenets et al., 2017a, b), но без супрессии гибридизации повторенных последовательностей. При проведении FISH анализировали хромосомные препараты, приготовленные из индивидуальных особей *M. mirumnovem*, FISH выполняли как с индивидуальными микродиссекционными ДНК-пробами, так и в варианте двухцветной FISH ДНК-проб S3 и S4. Анализировали не менее чем по 10 особей.

Результаты и обсуждение

Создание ДНК-проб из хромосом *M. mirumnovem* и FISH ДНК-проб с метафазными хромосомами. ДНК-пробы S3 и S4 были получены из диссектированного материала единичных копий двух мелких метацентриков. Флуоресцентная гибридизация *in situ* ДНК-проб с метафазными хромосомами *M. mirumnovem* выявила в хромосомах районы, обогащенные повторными последовательностями, гомологичными фрагментам ДНК, присутствующим в ДНК-пробах S3 и S4 (рис. 1, 2). Далее районы, демонстрирующие специфический сигнал FISH ДНК-пробы S3, будут обозначены как S3D-районы (regions detected by FISH with the S3 DNA probe), а районы FISH ДНК-пробы S4, – как S4D-районы. Точная локализация таких районов в метафазных хромосомах *M. mirumnovem* в нашем исследовании представляла некоторую проблему, обусловленную сложностью описания морфологии и дифференциального окрашивания хромосом этого вида.

На крупных метацентриках, хромосомах ММ1 и ММ2, FISH ДНК-пробы S4 давала интенсивный сигнал точно в районе их первичной перетяжки, а также дополнительные сигналы в плечах этих хромосом (см. рис. 1, а, б и рис. 2). Помимо сигналов в районах крупных хромосом, FISH ДНК-пробы S4 дала интенсивный сигнал в прицентромерном районе хромосомы ММ4, а у некоторых исследованных особей также в дистальном районе q-плеча этой хромосомы (см. рис. 1, а, б и 2, в). Слабые сигналы (на грани возможности их выявления) были также отмечены в прицентромерных районах хромосом ММ3 и ММ5. Из-за небольшого размера блока прицентромерного структурного гетерохроматина в хромосомах *M. mirumnovem* нельзя сделать окончательного заключения о локализации S4D-районов непосредственно в прицентромерном гетерохроматине или прилежащих к нему эухроматиновых районах даже в хромосомах ММ1 и ММ2. Локализация гибридизационного сигнала в конденсированных метафазных хромосомах ММ3–ММ5 часто оказывалась еще более осложненной (см. рис. 1, а–г). Следует отметить, что на менее конденсированных копиях хромосом ММ3–ММ5 с выраженной первичной перетяжкой гибридизационный сигнал ДНК-пробы S4 всегда был локализован в ее районе (см. рис. 2, в).

Таким образом, учитывая небольшой размер прицентромерного блока гетерохроматина, приходится признать,

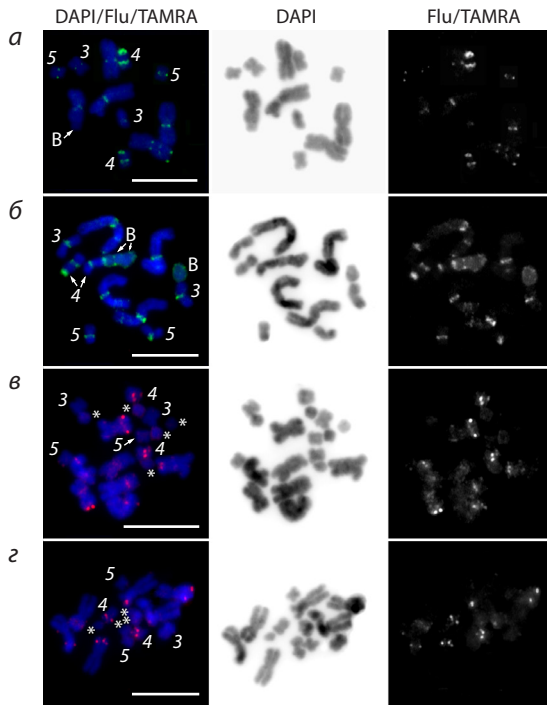


Рис. 1. Флуоресцентная гибридизация *in situ* микродиссекционных ДНК-проб S3 (красный сигнал) и S4 (зеленый сигнал) с метафазными хромосомами разных особей *M. mirumnovem*, хромосомы которых отличаются размером районов, обогащенных повторенными последовательностями (а–в). Представлены также инвертированные изображения DAPI-окрашивания и раздельная регистрация флуорохромов Flu/TAMRA.

Обозначены хромосомы MMI3–MMI5 (3–5 соответственно) и В-хромосома. Звездочками отмечены предполагаемые В-хромосомы (мелкие хромосомы, по размеру или морфологии отличные от хромосом MMI3–MMI5). Цифрами обозначены номера хромосом. Масштабная линейка 10 мкм.

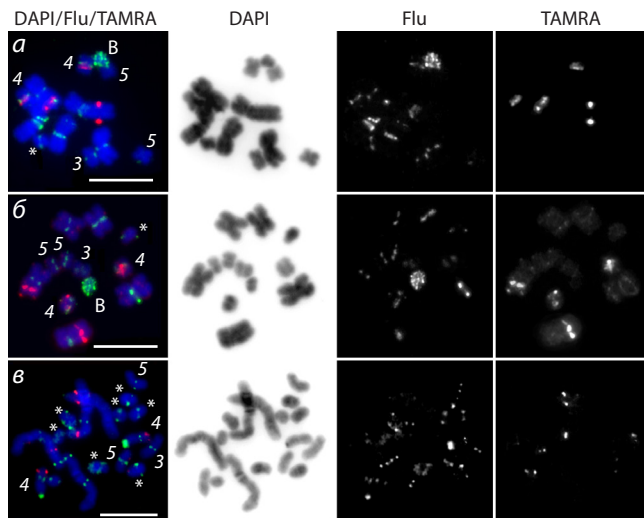


Рис. 2. Флуоресцентная гибридизация *in situ* микродиссекционных ДНК-проб S3 (красный сигнал) и S4 (зеленый сигнал) с метафазными хромосомами высокого (а, б) и низкого (в) уровней конденсации. Представлены метафазные пластинки разных особей *M. mirumnovem*, хромосомы которых отличаются размером районов, обогащенных повторенными последовательностями (а–в). Продемонстрированы инвертированные изображения DAPI-окрашивания и раздельная регистрация флуорохромов Flu и TAMRA.

Обозначения см. на рис. 1.

что вопрос, локализованы ли S4D-районы в прицентромерном гетерохроматине хромосом или в проксимальном эухроматиновом районе одного из хромосомных плеч, остается открытым. Для простоты дальнейшего описания полученных результатов мы будем называть эти районы прицентромерными, осознавая некоторую некорректность использования терминологии в описании результатов FISH с ДНК-пробой S4, можно сказать, что она давала сигналы в прицентромерных районах всех А-хромосом, хотя их интенсивность в разных районах хромосом значительно варьировала, меняясь от интенсивного сигнала в районе первичной перетяжки некоторых копий хромосом MMI1, MMI2 и MMI4 до слабых раздельных сигналов на разных хроматидах небольших метацентрических хромосом MMI3 и MMI5 (см. рис. 1, а, б). Варьирование интенсивности сигнала ДНК-пробы S4 в районах хромосом, включая разные копии гомологичных хромосом, вероятно, обусловлено отличиями в количестве копий соответствующих повторов в этих районах. Нельзя исключить также, что в некоторых случаях такие вариации в интенсивности сигнала FISH могут быть обусловлены неполной гомологией повторенных последовательностей в этих районах и фрагментов ДНК в составе ДНК-пробы S4. Необходимо отметить, что кроме специфических сигналов в районах А-хромосом, FISH ДНК-пробы S4 слабо окрашивала некоторые В-хромосомы (см. рис. 1, б и 2, а, б).

Интенсивные специфические FISH-сигналы ДНК-пробы S3 были отмечены только в районах хромосомы MMI4 и в районах крупных метацентрических хромосом (MMI1 и MMI2). Причем двухцветная FISH ДНК-проб S3 и S4 показала, что они обогащены различными высокоповторенными последовательностями, так как не выявлено ни одного района совместной локализации S3D- и S4D-районов (см. рис. 2, а–в). Районы S3D и S4D в проксимальном районе хромосомы MMI4 локализованы близко друг к другу, однако и в этом случае колокализации сигналов FISH ДНК-проб S3 и S4 не наблюдали. Более того, у одной из особей, молекулярно-цитогенетический анализ которых был выполнен в настоящем исследовании, обнаружено смещение S3D-района в дистальный район р-плеча хромосомы MMI4, что хорошо видно на слабоконденсированных хромосомах (см. рис. 2, в). Вероятно, изменение локализации S3D-района обусловлено инверсией с одной из точек разрыва, локализованной между S3D- и S4D-районами, что, помимо перемещения S3D-района, привело к значительному увеличению расстояния между ними. Таким образом, полученные результаты двухцветной FISH указывают на то, что при создании ДНК-библиотек S3 и S4 в амплификацию были вовлечены разные повторенные последовательности хромосомы MMI4.

Сигналы FISH ДНК-пробы S3 в районах мелких метацентриков MMI3 и MMI5 были очень низкой интенсивности, лишь немного превышающей неспецифической флуоресценции. Мы полагаем, что эти районы либо содержали относительно небольшое число повторов, гомологичных ДНК микродиссекционной ДНК-пробы S3, либо присутствующие в них повторы имели более низкий уровень гомологии с ДНК этой пробы.

В плечах некоторых крупных метацентрических хромосом присутствовали районы, в которых после FISH с ДНК-пробой S3 был зарегистрирован флуоресцентный сигнал, по интенсивности и размеру превосходящий сигнал в проксимальном районе хромосомы ММ14 (см. рис. 1, а–г и 2, а–в). Необходимо отметить, высокую вариабельность интенсивности флуоресцентного сигнала в крупных хромосомах. В метафазных пластинках у исследованных образцов присутствовали как крупные хромосомы, в районах которых были очень интенсивные сигналы, так и их гомологи, в районах которых уровень интенсивности специфического сигнала сопоставим с таковым в районах хромосом ММ13 и ММ15 (см. рис. 1 и 2).

Возможные механизмы возникновения районов, обогащенных повторенными последовательностями, и их последующей эволюции. Вопрос о молекулярных механизмах формирования вариабельности размеров, локализации и обогащенности районов повторами, выявляемыми с помощью ДНК-проб S3 и S4, остается открытым. Однако, рассматривая его, необходимо вспомнить, что в составе хромосом ММ11 и ММ12 есть протяженные районы гомологии с участками хромосомы ММ14 (Zadesenets et al., 2020). Варьирование S3D- и S4D-районов по локализации и размеру в хромосомах ММ11 и ММ12, а также их отсутствие в плечах хромосом ММ13 и ММ15 позволяют предположить, что они представляют собой результат амплификации последовательностей ДНК, присутствовавших еще в предковой хромосоме, слияние которой с другими хромосомами предкового кариотипа и стало причиной возникновения крупных метацентрических хромосом ММ11 и ММ12. Распространение таких районов внутри хромосомы может происходить в результате инверсий. В пользу последнего предположения свидетельствует изменение локализации S3D-района в хромосоме ММ14 у одного из анализируемых образцов (см. рис. 2, в).

На основании полученных в нашем исследовании результатов не представляется возможным оценить, сколько и какие повторенные последовательности входят в состав полученных ДНК-проб. В последующих работах ответ на этот вопрос может быть получен при клонировании фрагментов ДНК из созданных микродиссекционных ДНК-библиотек и последующей FISH ДНК-проб, приготовленных из этих фрагментов ДНК. Ранее такой подход был успешно применен для анализа состава ДНК В-хромосомы одного из видов саранчовых, *Podisma kanoi* (Bugrov et al., 2007). Альтернативный вариант изучения состава ДНК полученных ДНК-библиотек – их массовое параллельное секвенирование – ранее был использован для выяснения состава ДНК В-хромосом восточноазиатской лесной мыши, *Apodemus peninsulae*, В-хромосом желтогорлой мыши, *Apodemus flavicollis*, и малой сверхчисленной маркерной хромосомы человека (Makunin et al., 2018). Однако при таком дизайне эксперимента результаты массового параллельного секвенирования должны быть верифицированы с помощью ДНК-проб, созданных на основе полученных секвенсов, так как в микродиссекционных ДНК-пробах всегда присутствует некоторое количество контаминирующей их ДНК. Кроме того, для успешной и эффективной интерпретации результатов секвенирования и описания обнаруженных повторенных

последовательностей желательна наличие референсной сборки генома изучаемого вида (Задесенец и др., 2017), получение которых, в случае *M. mirumnovem*, весьма проблематично ввиду высокой нестабильности кариотипа и генома этого вида.

В-хромосомы *M. mirumnovem*. Как было отмечено выше, помимо районов А-хромосом, FISH ДНК-пробы S4 также специфично окрашивала некоторые В-хромосомы (см. рис. 1, б и 2, а–в). Эти результаты позволяют предложить один из сценариев формирования таких В-хромосом: они сформировались из прицентромерного района одной из А-хромосом в результате хромосомных разрывов, приводящих к возникновению маленькой сверхчисленной хромосомы, состоящей из прицентромерного района исходной хромосомы, и последующей амплификации повторенных последовательностей ДНК как гомологичных ДНК микродиссекционной ДНК-пробы, так и других повторенных последовательностей. На наличие таких ДНК-повторов в составе В-хромосомы указывает ее неравномерное и не очень интенсивное окрашивание при проведении FISH ДНК-пробы S4. Эти повторы могут происходить как из прицентромерного района хромосомы-предшественника соответствующих В-хромосом, так и иметь иное происхождение. Часть В-хромосом не давала никакого специфического сигнала после FISH с ДНК-пробой S4. Специфический сигнал флуоресцентной гибридизации *in situ* отсутствовал даже в прицентромерных районах этих хромосом (см. рис. 1, а), что свидетельствует об амплификации разных типов повторенных последовательностей ДНК при формировании В-хромосом, а, возможно, и о разном происхождении.

Заключение

С помощью микродиссекционных ДНК-проб, полученных по модифицированному протоколу и содержащих преимущественно повторенные последовательности ДНК, нам удалось выявить в хромосомах *M. mirumnovem* районы, обогащенные повторенными последовательностями ДНК. Оказалось, что обогащение таких хромосомных районов повторенными последовательностями может значительно варьировать. Возникновение и последующие изменения в таких районах в крупных метацентрических хромосомах ММ11 и ММ12 могут приводить к дивергенции копий гомологичных хромосом. Кроме того, полученные результаты указывают на то, что состав ДНК в разных копиях В-хромосом у особей вида *M. mirumnovem* может различаться. В формировании, по крайней мере, некоторых В-хромосом принимали участие повторенные последовательности, гомологичные повторам из проксимальных районов А-хромосом.

Список литературы / References

- Задесенец К.С., Ершов Н.И., Рубцов Н.Б. Полногеномное секвенирование геномов: от секвенирования фрагментов ДНК к сборке генома. *Генетика*. 2017;53(6):641-650. DOI 10.7868/S0016675817050137.
- [Zadesenets K.S., Ershov N.I., Rubtsov N.B. Whole-genome sequencing of eukaryotes: from sequencing of DNA fragments to a genome assembly. *Russ. J. Genet.* 2017;53(6):631-639. DOI 10.1134/S102279541705012X.]

- Задесенец К.С., Рубцов Н.Б. Дупликация генома в эволюции генома животных. *Генетика*. 2018;54(10):1107-1119. DOI 10.1134/S0016675818090163.
[Zadesenets K.S., Rubtsov N.B. Genome duplication in animal evolution. *Russ. J. Genet.* 2018;54(10):1125-1136. DOI 10.1134/S1022795418090168.]
- Задесенец К.С., Рубцов Н.Б. Получение микродиссекционных ДНК-проб из метафазных хромосом в случае невозможности идентификации целевой хромосомы методами рутинного окрашивания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):519-524. DOI 10.18699/VJ20.46-о.
[Zadesenets K.S., Rubtsov N.B. Generation of microdissected DNA probes from metaphase chromosomes in case of an impossibility of chromosomes identification by routine staining. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):519-524. DOI 10.18699/VJ20.46-о.]
- Barker M.S., Husband B.C., Pires J.C. Spreading wing and flying high: the evolutionary importance of polyploidy after a century of study. *Am. J. Bot.* 2016;103(7):1-7. DOI 10.3732/ajb.1600272.
- Bugrov A.G., Karamysheva T.V., Perepelov E.A., Elisaphenko E.A., Rubtsov D.N., Warchalowska-Sliwa E., Tatsuta H., Rubtsov N.B. DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh. (Orthoptera, Acrididae). *Chromosome Res.* 2007;15(3):315-326. DOI 10.1007/s10577-007-1128-z.
- Comparative Genomics. Sankoff D., Nadeau J.H. (Eds.). Kluwer Academic Publ., 2000. DOI 10.1007/978-94-011-4309-7.
- Dehal P., Boore J.L. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol.* 2005;3:e314. DOI 10.1371/journal.pbio.0030314.
- Egger B., Ishida S. Chromosome fission or duplication in *Macrostomum lignano* (Macrostomorpha, Plathelminthes) – remarks on chromosome numbers in ‘archoophoran turbellarians’. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 2005;43(2):127-132. DOI 10.1111/j.1439-0469.2005.00300.x.
- Fisher K.J., Buskirk S.W., Vignogna R.C., Marad D.A., Lang G.I. Adaptive genome duplication affects patterns of molecular evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 2018;14(5):e1007396. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007396>.
- Glasauer S.M.K., Neuhauss S.C.F. Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Mol. Genet. Genomics.* 2014;289(6):1045-1060. DOI 10.1007/s00438-014-0889-2.
- Kenny N.J., Chan K.W., Nong W., Qu Z., Maeso I., Yip H.Y., Chan T.F., Kwan H.S., Holland P.W.H., Chu K.H., Hui J.H.L. Ancestral whole-genome duplication in the marine chelicerate horseshoe crabs. *Heredity*. 2018;116(2):190-199. DOI 10.1038/hdy.2015.89.
- Makunin A.I., Rajičić M., Karamysheva T.V., Romanenko S.A., Druzhkova A.S., Blagojević J., Vujošević M., Rubtsov N.B., Graphodatsky A.S., Trifonov V.A. Low-pass single-chromosome sequencing of human small supernumerary marker chromosomes (sSMCs) and *Apodemus* B chromosomes. *Chromosoma*. 2018;127(3):301-311. DOI 10.1007/s00412-018-0662-0.
- Mayrose I., Zhan S.H., Rothfels C.J., Magnuson-Ford K., Barker M.S., Rieseberg L.H., Otto S.P. Recently formed polyploid plants diversify at lower rates. *Science*. 2011;60(333):1257. DOI 10.1126/science.1207205.
- Moghe G.D., Hufnagel D.E., Tang H., Xiao Y., Dworkin I., Town C.T., Conner J.K., Shiu S.-H. Consequences of whole-genome triplication as revealed by comparative genomic analyses of the wild radish *Raphanus raphanistrum* and three other Brassicaceae species. *Plant Cell*. 2014;26(5):1925-1937. DOI 10.1105/tpc.114.124297.
- Panopoulou G., Hennig S., Groth D., Krause A., Poustka A.J., Herwig R., Vingron M., Leirach H. New evidence for genome-wide duplications at the origin of vertebrates using an amphioxus gene set and completed animal genomes. *Genome Res.* 2003;13:1056-1066. DOI 10.1101/gr.874803.
- Schärer L., Brand J.N., Singh P., Zadesenets K.S., Stelzer C.-P., Viktorin G. A phylogenetically informed search for an alternative *Macrostomum* model species with notes on taxonomy, mating behavior, karyology, and genome size. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 2020;58:41-65. DOI 10.1111/jzs.12344.
- Soltis D.E., Segovia-Salcedo M.C., Jordon-Thaden I., Majure L.C., Miles N.M., Mavrodiev E.V., Mei W., Cortez M.B., Soltis P.S., Gitzendanner M.A. Are polyploids really evolutionary dead-ends (again)? A critical reappraisal of Mayrose et al. *New Phytol.* 2014;202(4):1105-1117. DOI 10.1111/nph.12756.
- Wendel J.F. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.* 2000;42:225-249. DOI 10.1023/A:1006392424384.
- Zadesenets K.S., Ershov N.I., Berezikov E., Rubtsov N.B. Chromosome evolution in the free-living flatworms: first evidence of intrachromosomal rearrangements in karyotype evolution of *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes, Macrostomida). *Genes*. 2017a;8:298. DOI 10.3390/genes8110298.
- Zadesenets K.S., Jetybayev I.Y., Schärer L., Rubtsov N.B. Genome and karyotype reorganization after whole genome duplication in free-living flatworms of the genus *Macrostomum*. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:680. DOI 10.3390/ijms21020680.
- Zadesenets K.S., Schärer L., Rubtsov N.B. New insights into the karyotype evolution of the free-living flatworm *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes, Turbellaria). *Sci. Rep.* 2017b;7:6066. DOI 10.1038/s41598-017-06498-0.
- Zadesenets K.S., Vizoso D.B., Schlatter A., Konopatskaia I.D., Berezikov E., Schärer L., Rubtsov N.B. Evidence for karyotype polymorphism in the free-living flatworm, *Macrostomum lignano*, a model organism for evolutionary and developmental biology. *PLoS One*. 2016;11:e0164915. DOI 10.1371/journal.pone.0164915.

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда, № 19-14-00211. Авторы благодарят проф. Л. Шарера за предоставление образцов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 11.12.2019. После доработки 25.05.2020. Принята к публикации 25.05.2020.