

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Андреюшкова Дарья Александровна

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы**

Особенности эволюции хромосом лучепёрых рыб

Направление подготовки

06.06.01 Биологические науки

Направленность

03.01.07 Молекулярная генетика

Новосибирск - 2018

Работа выполнена в лаборатории сравнительной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Научный руководитель:

Трифонов Владимир Александрович

Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией сравнительной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность.

Класс Лучепёрые рыбы (Actinopterygii) насчитывает более 30 000 видов [1] и является самым многочисленным классом типа Хордовые. Класс включает четыре эволюционные ветви [1]: отряд Многопёрообразные (Polypteriformes), отр. Осетрообразные (Acipenseriformes), инфракласс Костные ганоиды (Holostei) инфракласс Костистые рыбы (Teleostei) [2] (Рис. 1). Последняя клада является в настоящее наиболее многообразной и включает более 30 отрядов, из которых наиболее многочисленным является отряд Окунеобразные (Perciformes) [1,2]. Наиболее известные модельные организмы среди рыб (например, данио рерио) также относятся к костистым рыбам.

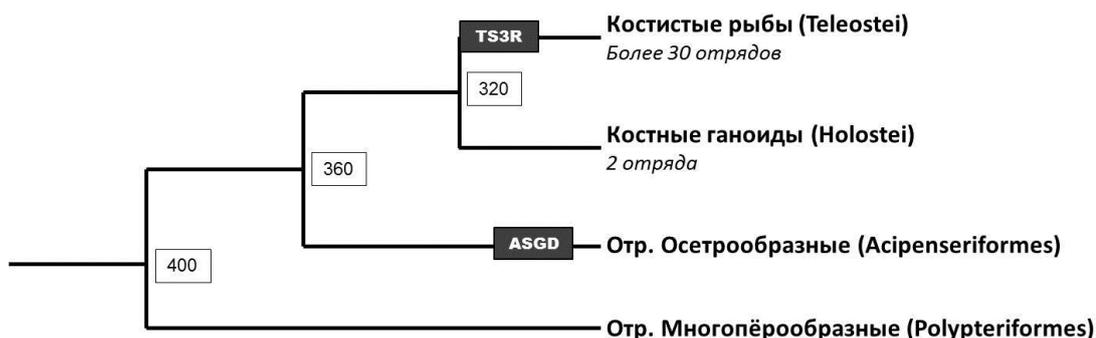


Рисунок 1. Эволюционное древо лучепёрых рыб. В узлах указано время дивергенции таксонов в миллионах лет. TS3R – полногеномная дупликация, специфичная для костистых рыб; ASGD – полногеномная дупликация, специфичная для осетрообразных.

Лучепёрые рыбы представляют большой интерес для исследования эволюции геномов и кариотипов за счёт толерантности многих представителей к полногеномным дупликациям [3] и высокому разнообразию способов определения пола [4].

Так, полиплоидные виды и популяции встречаются в различных отрядах лучепёрых [5-7], в том числе, в отряде Осетрообразные [8]. Несмотря на проблемы, возникающие при дупликациях генома (в частности, нарушения эпигенетической регуляции), такие события могут поставлять новый материал для отбора последовательностей [9]. Две полногеномные дупликации (1R и 2R), имевшие место около 500-600 млн. лет назад, по-видимому, сыграли существенную роль в эволюции хордовых [10-12]. Помимо этого, инфракласс Костистые рыбы претерпел дополнительный раунд полногеномной дупликации около 320 млн. лет назад (TS3R, «teleost-specific 3R») [10] (см. Рис. 1). В связи с этим изучение полиплоидных представителей лучепёрых рыб может расширить представления о полногеномных дупликациях и связанных с ними эволюционных событиях.

Лучепёрые рыбы также являются удобным таксоном для изучения биологии пола благодаря большому разнообразию способов определения пола внутри класса и их эволюционной пластичности. Эти способы могут различаться даже у близкородственных видов [4]. В случае генетического определения гетерогаметным может быть как мужской, так и женский пол, половые хромосомы зачастую являются гомоморфными и слабодифференцированными [13, 14], у некоторых представителей класса множественные половые хромосомы [15, 16].

До недавнего времени малоизученными оставались геномы базальных таксонов класса Лучепёрые, не относящихся к костистым рыбам, однако их исследования могут внести существенный вклад в понимание эволюции позвоночных, поскольку они отделились от костистых рыб до TS3R. Так, в 2016 году был секвенирован и собран геном панцирной щуки (*Lepisosteus oculatus*, инфракласс Костные ганоиды). Оказалось, что хромосомы этого вида лучше подходят для сравнения с хромосомами тетрапод, чем

хромосомы модельных видов костистых рыб, так как в геноме панцирной щуки, не несущем дополнительных полногеномных дупликаций, группы сцепления оказались очень консервативными [17].

В отличие от многопёрообразных и костных ганоидов, все современные осетрообразные являются полиплоидами, претерпевшими по меньшей мере один раунд полногеномной дупликации (ASGD, «acipenserid-specific WGD») независимо от костистых рыб (см. Рис. 1). Общий предок этой группы, вероятно, имел 60 хромосом в диплоидном наборе, а минимальное количество хромосом у современных представителей составляет около 110-120 (палеотетраплоидное состояние) [8].

В Отделе разнообразия и эволюции геномов ИМКБ СО РАН ранее была отработана методика получения клеточных культур фибробластов рыб и получены хромосомные суспензии и хромосомспецифичные микродиссекционные библиотеки стерляди (*Acipenser ruthenus*, отр. Осетрообразные) [18] и культуры фибробластов калабарского каламоихта (*Erpetoichthys calabaricus*, отр. Многопёрообразные). Также в отделе имеется набор хромосомных суспензий представителей костистых рыб из отряда Окунеобразные, в том числе, полосатого оплегната (*Oplegnathus fasciatus*, полученный от сотрудников Чжаныцзянского океанографического университета (Чжаныцзян, Китай).

Целью данной работы являлось исследование особенностей эволюции хромосом представителей класса Лучепёрые рыбы, относящихся как к костистым рыбам (полосатый оплегнат), так и к другим группам данного класса (стерлядь, калабарский каламоихт) с применением молекулярно-цитогенетических и биоинформатических методов.

Задачи.

1. Исследовать происхождение половых хромосом полосатого оплегната (*Oplegnathus fasciatus*).
2. Секвенировать хромосомспецифичные библиотеки стерляди и выровнять полученные последовательности на референсный геном панцирной щуки (*Lepisosteus oculatus*).
3. Выявить межхромосомные перестройки, произошедшие после дивергенции стерляди и пятнистой панцирной щуки.
4. Охарактеризовать кариотип калабарского каламоихта (*Erpetoichthys calabaricus*) с использованием классических цитогенетических методов.
5. Выполнить микродиссекцию отдельных хромосом и хромосомных районов калабарского каламоихта и FISH полученных библиотек и библиотек стерляди на метафазных хромосомах данного вида.

Научная новизна и практическая ценность.

В рамках данной работы было проверено и подтверждено предположение о происхождении множественных половых хромосом полосатого оплегната. Была показана применимость метода выравнивания хромосомспецифичных библиотек, предложенного к.б.н., м.н.с. Макуниным А.И., для эволюционно далёких видов. Впервые напрямую выявлены хромосомные перестройки у представителя сем. Осетровые. Получены более точные, чем опубликованные ранее, результаты цитогенетических анализов представителя отр. Многопёрообразные.

В целом данное исследование освещает новые аспекты эволюции хромосом такой многочисленной и разнообразно группы, как класс Лучепёрые рыбы. Полученные хромосомспецифичные библиотеки полосатого оплегната могут быть использованы в работе с другими видами окунеобразных. Результаты, полученные при биоинформатическом анализе библиотек хромосом стерляди, могут быть полезны для улучшения сборки генома данного вида. Использование суспензий хромосом калабарского каламоихта, полученных из культур первичных фибробластов, представляется более удобным для дальнейших цитогенетических исследований.

Апробация работы.

Результаты работы были представлены на международной конференции «Хромосома 2015» (Новосибирск, 24-28 августа 2015), VIII всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2015» (Новосибирск, 20-25 сентября 2015), международной мини-конференции «Хромосомы и митоз - 2016» (25 ноября 2016), II всероссийской конференции с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (Новосибирск, 18-23 июня 2017), международной конференции «Беляевские чтения» (Новосибирск, 7-10 августа 2017), международной конференции «Хромосома 2018» (Новосибирск, 20-24 августа 2018).

Вклад автора.

Автором самостоятельно выполнены все описанные эксперименты с хромосомными суспензиями полосатого оплегната (*Oplegnathus fasciatus*), анализ выравниваний хромосомспецифичных библиотек стерляди (*Acipenser ruthenus*) на геном пятнистой панцирной щуки (*Lepisosteus oculatus*), частичная реконструкция хромосом общего предка этих двух видов и межхромосомных перестроек, а также микродиссекция хромосом калабарского каламоихта (*Erpetoichthys calabaricus*), приготовление библиотек этих хромосом и все описанные эксперименты, связанные с флуоресцентной *in situ* гибридизацией (FISH), для данного объекта.

Получение C_{0t} ДНК стерляди выполнено совместно с н.с. Сердюковой Н.А., FISH-эксперименты на хромосомах стерляди произведены вместе с к.б.н., н.с. Беклемишевой В.Р., анализ результатов этих экспериментов проводился совместно с к.б.н., н.с. Беклемишевой В.Р., к.б.н., с.н.с. Билтуевой Л.С. и к.б.н., зав. лаб., в.н.с. Трифоновым В.А. Биоинформатический анализ секвенированных последовательностей осуществлялся совместно с к.б.н., м.н.с. Макуниным А.И.

Пробоподготовка образцов для секвенирования библиотек стерляди выполнена м.н.с. Дружковой А.С.

Публикации.

По результатам и проблематике настоящего исследования опубликовано 14 работ, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях рекомендованного перечня ВАК.

Благодарности.

Автор выражает признательность Трифонову В.А., Макунину А.И., Романенко С.А., Беклемишевой В.Р., Билтуевой Л.С., Дружковой А.С., Сердюковой Н.А., Лемской Н.А., Кичигину И.Г., Прокопову Д.Ю. и другим сотрудникам Отдела разнообразия и эволюции геномов ИМКБ СО РАН, а также Д. Ксу (D. Xu).

В работе были использованы ресурсы Центра коллективного пользования "Молекулярная и клеточная биология" при ИМКБ СО РАН.

Исследование поддержано грантами РФФИ №14-14-00275 и РФФИ №15-29-02384

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение суспензий метафазных хромосом

Клеточные культуры первичных фибробластов калабарского каламоихта (*Erpetoichthys calabaricus*) были ранее получены в Отделе разнообразия и эволюции геномов из двух особей данного вида (Eca1 и Eca2). Суспензии хромосом калабарского каламоихта были получены из культур совместно с к.б.н., н.с. Лемской Н.А. и к.б.н.,

с.н.с. Билтуевой Л. С. согласно протоколу, разработанному для стерляди. В качестве гипотонического раствора использовали 33,5 мМ раствор хлорида калия (Еса1) либо 7,75 мМ раствор цитрата натрия (Еса1 и Еса2).

Приготовление препаратов метафазных хромосом.

Приготовление препаратов полосатого оплеegnата (*Oplegnathus fasciatus*), стерляди (*Acipenser ruthenus*) и калабарского каламоихта проводили по стандартному протоколу [20]. При относительной влажности воздуха не менее 40% на чистое сухое предметное стекло наносили 10-15 мкл суспензии, при необходимости до и после нанесения суспензии наносили 10-30 мкл метанол-уксусного фиксатора (3:1). В случае приготовления препаратов для микродиссекции (хромосомы полосатого оплеegnата и калабарского каламоихта) суспензии наносились на влажное стекло.

Окрашивание метафазных хромосом.

Окрашивание метафазных хромосом производилось согласно стандартным методикам [18-20].

Для проверки суспензий использовали рутинное окрашивание с использованием раствора красителя Гимза.

Для препаратов хромосом стерляди и калабарского каламоихта, используемых впоследствии для флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), применялось GTG-окрашивание («G-banding by trypsin using Giemsa»). Время обработки и концентрация трипсина зависели от качества хромосомной суспензии и условий дальнейшей обработки. После окрашивания и контроля качества препараты отмывались в ксилоле и метанол-уксусном фиксаторе.

Препараты метафазных хромосом полосатого оплеegnата и калабарского каламоихта, используемые для получения микродиссекционных библиотек, перед окрашиванием раствором красителя Гимза также подвергали кратковременной обработке трипсином.

Для хромосом калабарского каламоихта также было выполнено С-окрашивание и окрашивание СМА₃ (хромомицином А₃).

Микродиссекция и получение хромосомспецифичных библиотек.

В рамках данной работы была выполнена микродиссекция отдельных хромосом полосатого оплеegnата и калабарского каламоихта. Все процедуры выполнялись согласно стандартному протоколу [20]. В качестве целевых хромосом в случае полосатого оплеegnата была выбрана Y-хромосома и случайные акроцентрики (Рис. 2), в случае калабарского каламоихта – плечи случайных крупных и средних хромосом и целые мелкие хромосомы (Рис. 3). Для приготовления библиотек использовали единичные хромосомы или фрагменты одной хромосомы.

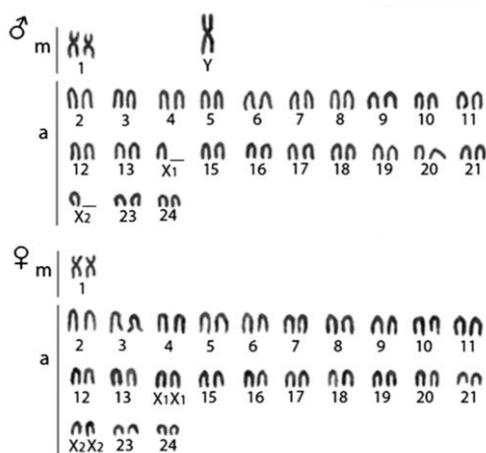


Рисунок 2. Кариотипы самца (вверху) и самки (внизу) полосатого оплеegnата (*Oplegnathus fasciatus*) [16].

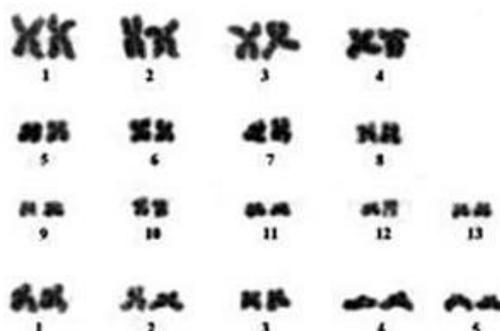


Рисунок 3. Кариотип калабарского каламоихта (*Erpetoichthys calabaricus*), рутинная окраска [21].

Дальнейшая обработка, амплификация и флуоресцентное мечение ДНК диссектированных хромосом осуществлялась с использованием набора реагентов для приготовления библиотек и полногеномной амплификации согласно протоколу производителя («Sigma-Aldrich»).

Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH).

Для проверки и характеристики хромосомспецифичных библиотек полосатого оплегната, стерляди и калабарского каламоихта использовали FISH, как было описано ранее [18,20].

В качестве флуоресцентно меченых зондов, используемых для гибридизации с метафазными хромосомами полосатого оплегната, использовались хромосомспецифичные микродиссекционные библиотеки полосатого оплегната, полученные в рамках данного исследования, и последовательности 18S-28S рДНК, имеющиеся в Отделе разнообразия и эволюции геномов.

Для гибридизации с метафазными хромосомами стерляди использовались микродиссекционные библиотеки хромосом стерляди, полученные ранее в Отделе разнообразия и эволюции геномов.

На препаратах метафазных хромосом калабарского каламоихта были гибридизованы как библиотеки данного вида, полученные в этой работе, так и библиотеки хромосом стерляди.

Гибридизационная смесь в случае библиотек полосатого оплегната и калабарского каламоихта содержала около 40 нг ДНК каждого зонда, 50% формамид, 10% декстрансульфат и 2×SSC; в случае библиотек стерляди – около 40 нг ДНК каждого зонда, 6,2 мкг C₀t₃₀ ДНК стерляди, 40% формамид, 10% декстрансульфат и 2×SSC.

Получение, анализ и обработка изображений.

Изображения метафазных хромосом были получены с помощью микроскопов Olympus BX53 и Zeiss «Axioscope 2», оснащённых лампами флуоресцентного и видимого света и цифровыми монохроматическими камерами ProgRes («Jenoptik»), с использованием программ «ВидеоТест Карио 3.1» и «ВидеоТест FISH». Обработка изображений проводилась с помощью редакторов «Corel Paint Shop Pro X2» и «PhotoFiltre 7».

Секвенирование хромосомспецифичных библиотек

Полученные ранее микродиссекционные библиотеки хромосом стерляди после проверки с помощью FISH были секвенированы на приборе MiSeq Illumina. Протопоподготовка и секвенирование осуществлялись согласно протоколу производителя.

Биоинформатический анализ последовательностей хромосомспецифичных библиотек.

Выравнивание последовательностей секвенированных хромосомспецифичных библиотек стерляди осуществлялось с использованием программы DOPseq_analyzer и алгоритмов Bowtie 2 [22] BWA-MEM [23] согласно разработанной ранее методике [24]. В качестве референсного генома использовался геном пятнистой панцирной щуки (*Lepisosteus oculatus*, GCA_000242695.1) [17].

Данный метод раньше не применялся для выявления синтенных районов хромосом между видами с таким временем дивергенции (около 360 млн. лет), поэтому для оценки влияния эволюционных расстояний на результаты выравнивания в качестве контроля были взяты последовательности библиотеки хромосомы 12 собаки (*Canis lupus familiaris*), CFA12 [24] и выполнено их выравнивание на геномы разных позвоночных животных: собаки (GCA_000002285.2), кошки (*Felis catus*, GCA_000181335.3), коровы (*Bos taurus*, GCA_000003055.4), человека (*Homo sapiens*, GCA_000001405.25), домового опоссума (*Monodelphis domestica*, GCF_000002295.2), курицы (*Gallus gallus*, GCA_000002315.3), пятнистой панцирной щуки и данио рерио (*Danio rerio*, GCA_000002035.3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полосатый оплегнат (*Oplegnathus fasciatus*).

Гены рРНК (18S-28S) локализуются на р-плече хромосомы 1 полосатого оплегната (единственная пара субметацентрических аутосом в кариотипе, Рис. 2, 4).

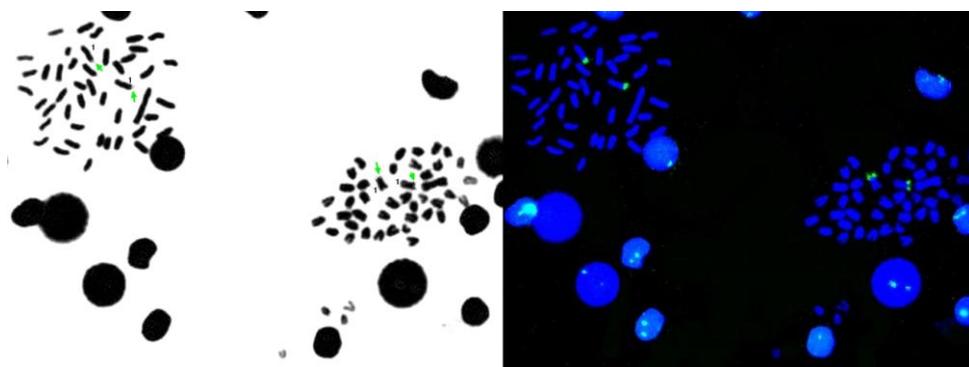


Рисунок 4. Локализация последовательностей 18S-28S рДНК (зелёный сигнал) на хромосомах полосатого оплегната (в поле зрения две метафазные пластинки).

Было получено девять микродиссекционных библиотек Y-хромосомы и 3 библиотеки аутосомом полосатого оплегната (Табл. 1, Рис. 5). Три библиотеки Y-хромосомы (Y-a, Y-d и Y-h) и три библиотеки аутосомом были секвенированы в Чжэньцзянском океанографическом университете. В настоящее время идёт анализ результатов секвенирования.

Таблица 1. Характеристика микродиссекционных библиотек полосатого оплегната (OFA).

Библиотека	Результат FISH	
	Самец	Самка
Библиотеки OFAY		
Y-a	OFAY + 1 акроцентрическая хромосома (OFAX ₁ либо OFAX ₂).	1 пара акроцентрических хромосом (OFAX ₁ либо OFAX ₂).
Y-b	OFAY + 2 акроцентрические хромосомы с разной интенсивностью (OFAX ₁ и OFAX ₂).	2 пары акроцентрических хромосом с разной интенсивностью (OFAX ₁ и OFAX ₂) + слабые сигналы на некоторых других хромосомах.
Y-d	OFAY + 2 акроцентрические хромосомы (OFAX ₁ и OFAX ₂). На акроцентриках сигнал слабее, чем на OFAY.	2 пары акроцентрических хромосом (OFAX ₁ и OFAX ₂).
Y-e	OFAY + 2 акроцентрические хромосомы (OFAX ₁ и OFAX ₂).	1 пара акроцентрических хромосом (OFAX ₁ либо OFAX ₂) + слабые сигналы на некоторых других хромосомах.
Y-g	OFAY + 2 акроцентрические хромосомы (OFAX ₁ и OFAX ₂).	1 или 2 пары акроцентрических хромосом (OFAX ₁ либо OFAX ₂) + слабые сигналы на некоторых других хромосомах.
Y-h	OFAY + 2 акроцентрические хромосомы (OFAX ₁ и OFAX ₂) + слабые сигналы на некоторых других хромосомах.	2 пары акроцентрических хромосом (OFAX ₁ и OFAX ₂) + слабые сигналы на некоторых других хромосомах.
3'	OFAY + 2 акроцентрические хромосомы с разной интенсивностью	2 пары акроцентрических хромосом с разной интенсивностью (OFAX ₁ и

	(OFAX ₁ и OFAX ₂).	OFAX ₂) + слабые сигналы на некоторых других хромосомах.
7'	OFAY + 2 акроцентрические хромосомы с разной интенсивностью (OFAX ₁ и OFAX ₂).	2 пары акроцентрических хромосом (OFAX ₁ и OFAX ₂).
12'	OFAY + 1 или 2 акроцентрические хромосомы (OFAX ₁ либо OFAX ₂) + слабые сигналы на некоторых других хромосомах.	1 пара акроцентрических хромосом (OFAX ₁ либо OFAX ₂) + слабые сигналы на некоторых других хромосомах.
Библиотеки аутосом OFA		
1A	2 акроцентрические хромосомы	2 акроцентрические хромосомы
4C	2 пары акроцентрических хромосом с разной интенсивностью	2 пары акроцентрических хромосом с разной интенсивностью
11B	2 акроцентрические хромосомы	2 акроцентрические хромосомы

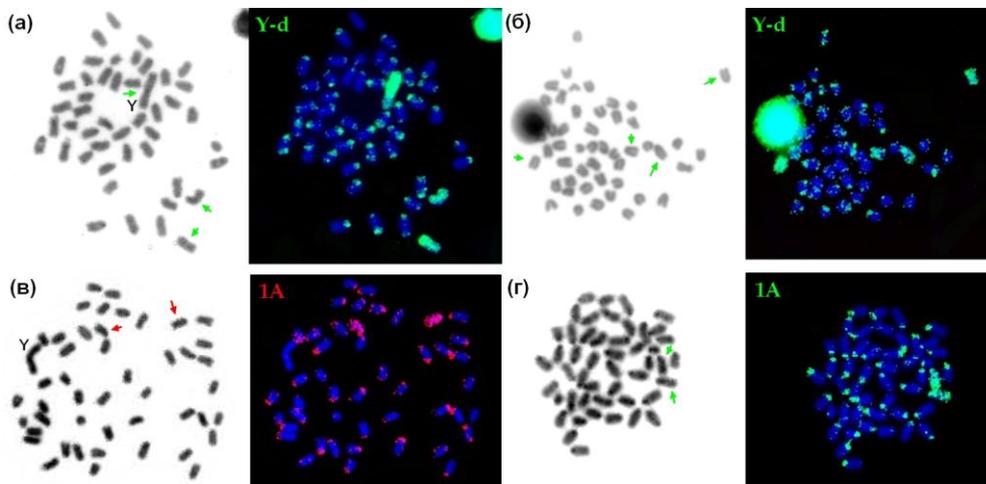


Рисунок 5. Примеры FISH хромосомспецифичных библиотек полосатого оплегната на метафазных хромосомах самца (а, в) и самки (б, г) данного вида.

Полосатый оплегнат является одним из видов со множественными половыми хромосомами. Обычно к этому приводит слияние предка одной из половых хромосом с аутосомой. Действительно, исходя из результатов FISH (Y-специфичные зонды в основном метят Y и обе X-хромосомы) можно сделать вывод о том, что Y-хромосома данного вида несёт районы, гомологичные обеим X-хромосомам, и образовалась в результате робертсоновской транслокации прото-Y на аутосому (Рис. 6). Однако этих результатов не достаточно для того, чтобы выяснить, какая из двух X-хромосом полосатого оплегната является эволюционно более молодой, образовавшейся из аутосомы.

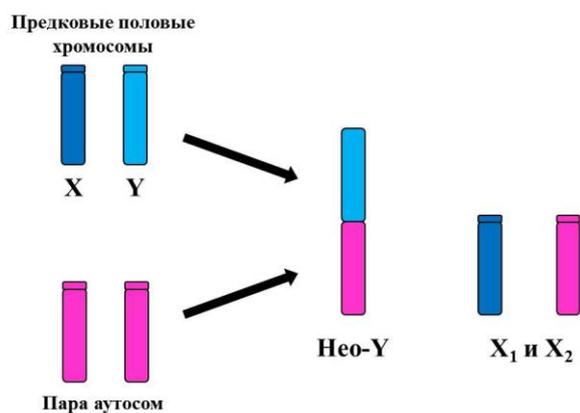


Рисунок 6. Эволюция половых хромосом полосатого оплеugnата.

Стерлядь (*Acipenser ruthenus*)

Кариотип стерляди состоит из 120 хромосом в диплоидном наборе, которые можно разделить на 3 группы по размеру и распределению повторённых последовательностей [25]: макрохромосомы (ARUT1-10), хромосомы среднего размера (ARUT11-30) и микрохромосомы (ARUT31-60) (Рис. 7).

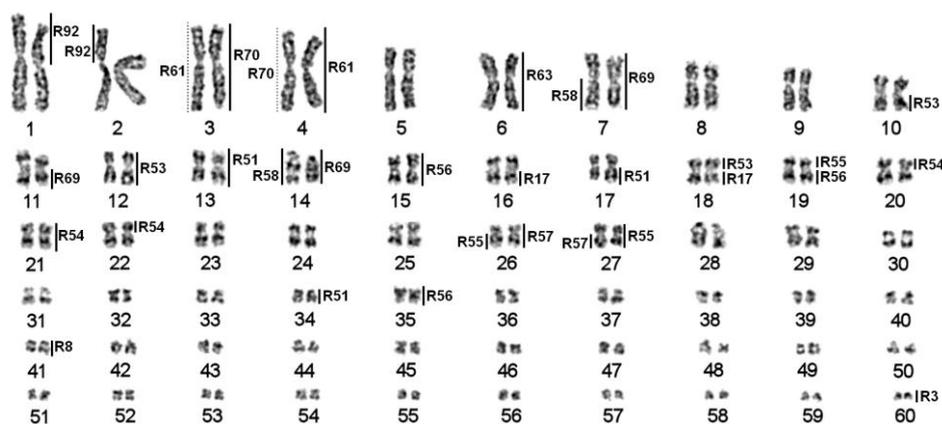


Рисунок 7. Кариотип стерляди [18] с локализованными микродиссекционными библиотеками (библиотеки, дающие одинаковую картину гибридизации, не показаны). Пунктирные линии соответствуют слабому гибридизационному сигналу.

В настоящее время Отделе разнообразия и эволюции геномов имеется около 60 рабочих хромосомспецифичных библиотек стерляди (микродиссекция выполнена к.б.н., с.н.с. Романенко С.А.), из них 19 ассоциированы с конкретными хромосомами стерляди путём анализа FISH-изображений и попарного сравнения библиотек друг с другом (Рис. 7, 8, Табл. 2). На данный момент секвенировано 35 библиотек. Последовательности библиотек R51, R53, R55-59, R61, R69, R70 опубликованы в базе данных NCBI SRA под номерами SAMN07665612-21 [26].

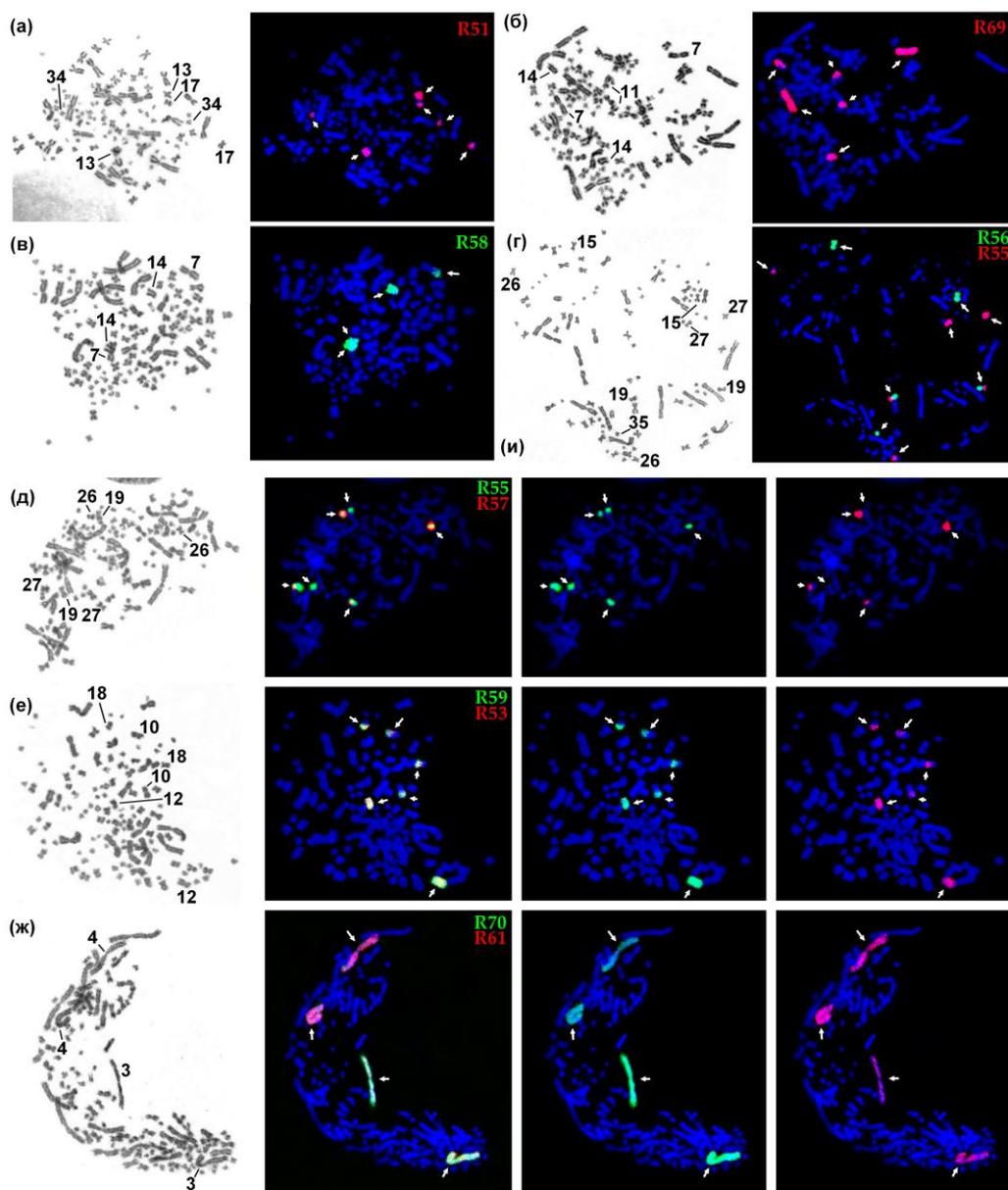


Рисунок 8. Примеры FISH хромосомспецифичных библиотек стерility на хромосомах данного вида.

Секвенированные библиотеки стерility были выровнены на геном пятнистой панцирной щуки с помощью программы DOPseq_analyzer [24]. Наиболее точные результаты были показаны для библиотек некоторых макрохромосом и хромосом среднего размера (приведены в Табл. 2). В случае библиотек крупных хромосом целевые районы выравнивания выявлялись значительно хуже из-за отсутствия заметных различий в значениях средних попарных расстояний между позициями (вероятно, в результате меньшего в целом покрытия районов референсного генома). Библиотеки мелких хромосом при выравнивании давали неспецифические результаты. Возможно, это объясняется высокой обогащённостью микрохромосом повторёнными последовательностями.

Таблица 2. Характеристика хромосомспецифичных библиотек стерляди (ARUT), результаты выравнивания их последовательностей на геном пятнистой панцирной щуки и сопоставление с предковыми хромосомами. LG – группа сцепления («linkage group»)

Библиотека	Исходная хромосома	FISH на хромосомах стерляди	Группы сцепления пятнистой панцирной щуки [17]	Хромосома курицы [17]	Хромосома общего предка амниот [33]	Хромосома общего предка костных позвоночных [33]
R17	ARUT16q или ARUT18q	ARUT16q, ARUT18q	LG3	1 (часть), 26, 10	1 (часть) или 4 (часть), 17, 10, 26	2 (часть) или 5 или 23, 19, 3, 11
R51, R60	ARUT13	ARUT13, ARUT17q, ARUT34	LG7 (дист. район)	5	7 или 13 или 14	8 или 15 или 16
			LG21	17	3 (часть) от 26	3
R52, R53, R59	ARUT12	ARUT10q, ARUT12, ARUT18p	LG12	7	4 (часть)	2 (часть)
			LG20	15	11	12
R54	ARUT21	ARUT21, ARUT20p, ARUT22p	LG7 (дист. район)	4	8, 18	9, 21
			LG22	19	16	18
R55	ARUT27	ARUT19p, ARUT26q, ARUT27	LG25	21	22	25
			LG27	5	7 или 13 или 14	8 или 15 или 16
R56	ARUT15	ARUT15, ARUT19q, ARUT35	LG10 (дист. район)	18	1 (часть)	6 (часть)
			LG23	11	12	14
R57	ARUT26	ARUT26, ARUT27q	LG27	5	7 или 13 или 14	8 или 15 или 16
R58	ARUT14	ARUT7q, ARUT14	LG8	1	1 или 4	2 (часть) или 5 или 23
R61	ARUT4	ARUT3 (слабый сигнал), ARUT4	LG9	2	2 5, 13 или 14	1 4, 5 или 18
			LG11	3		
R63, R68	ARUT6	ARUT6	LG16	6	6	17
R69	ARUT7	ARUT7, ARUT11q, ARUT14	LG5 (дист. район)	1	1 или 4	2 (часть) или 5 или 23
			LG8	2	2	1
R70	ARUT3	ARUT3, ARUT4 (слабый сигнал)	LG9	1 (часть), 26, 10	1 (pat) или 4 (часть), 17, 10, 26	2 (часть) или 5 или 23, 19, 3, 11
			LG11			

Стерлядь и пятнистая панцирная щука являются достаточно эволюционно далёкими видами (время дивергенции около 360 млн. лет [27]), поэтому для того, чтобы удостовериться в правомерности применения для них данного метода выравнивания последовательностей, в качестве контроля была использована хромосомспецифичная

библиотека собаки (CFA12) [24], и при аналогичных условиях произведено её выравнивание на геномы позвоночных животных с различным временем дивергенции (Табл 3). В случае этих видов районы, гомологичные хромосоме 12 собаки, известны [17,24,28-31]. Для большинства рассмотренных геномов (в том числе, генома пятнистой панцирной щуки) результаты выравнивания в целом согласуются с ранее опубликованными данными, несмотря на то, что время дивергенции между этими двумя видами составляет около 450 млн. лет. Таким образом, данный метод выравнивания последовательностей с помощью DOPseq_analyzer может быть использован для поиска гомологичных районов между видами, разошедшимися около 360 млн. лет назад.

Таблица 3. Выравнивание библиотеки CFA12 [24] на геномы позвоночных животных с различным временем дивергенции: CFA – собака (*Canis lupus familiaris*), FCA - кошка (*Felis catus*), BTA - корова (*Bos taurus*), HSA - человек (*Homo sapiens*), MDO – домовый опоссум (*Monodelphis domestica*), GGA - курица (*Gallus gallus*), LOC – пятнистая панцирная щука (*L. oculatus*), DRE – данио рерио (*Danio rerio*).

	Референсные геномы							
	CFA	FCA	BTA	HSA	MDO	GGA	LOC	DRE
Результат выравнивания CFA12 (хромосома, сцепления) группа	12	B2	9, 23	6	2	27, 5, 3, 2	16, 7, 8, 1, 11	4
Хромосомы, гомологичные CFA12	12 [24]	B2 [28,29]	9, 23 [29]	6 [28]	2 [29]	3, 36 [29]	1, 16, 9, 11 [17]	13, 16, 19, 20, 21, 23 [30,31]
Время дивергенции, млн. лет	0	55 [32]	85 [32]	90 [32]	180 [33]	350 [10]	450 [10]	450 [10]

Стерлядь является палеотетраплоидным видом, геном которого претерпел общую для осетровых полногеномную дупликацию (ASGD, «acipenserid-specific WGD») [8]. Процесс редиплоидизации продолжается в настоящее время [18], и в основном хромосомспецифичные библиотеки при гибридизации на хромосомы стерляди дают сигналы больше, чем на одной паре хромосом (см. Рис. 7, 8, Табл. 3). Однако большинство таких библиотек метит не две пары хромосом целиком, а одну пару целиком и дополнительные районы (например, плечи двух других пар хромосом, как в случае с R53-55). Это свидетельствует о межхромосомных перестройках, имевших место после ASGD. Хромосомы стерляди были сопоставлены с группами сцепления панцирной щуки и соответствующими им хромосомными районами курицы (т.к. группы сцепления птиц обладают достаточно высокой эволюционной консервативностью) [17] и предковых хромосом [33] (Табл. 3), в результате чего были частично воссозданы хромосомные перестройки, имевшие место после дивергенции этих двух видов лучепёрых рыб (Рис. 9).

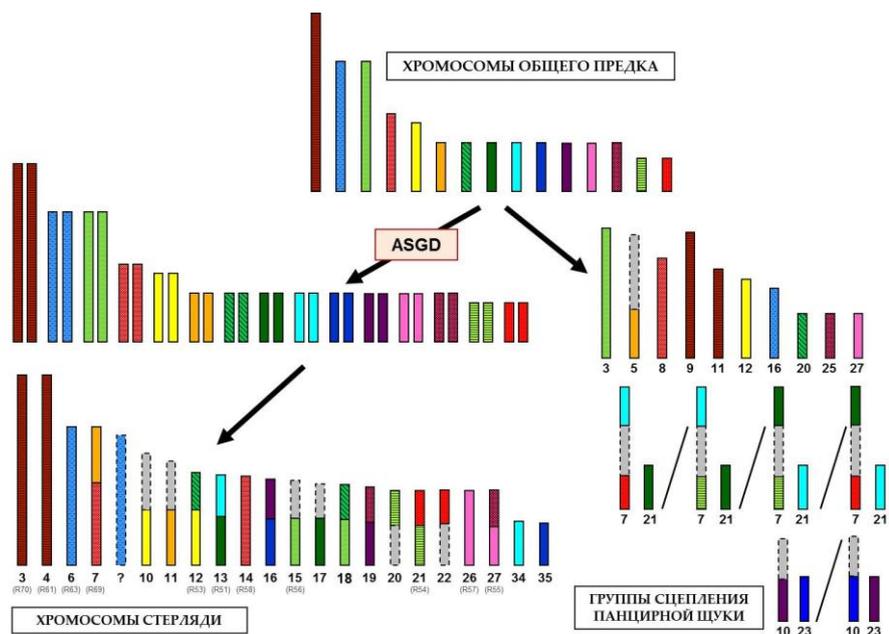


Рисунок 9. Схема предполагаемых межхромосомных перестроек в эволюции стерляди и пятнистой панцирной щуки (для исследованных ромосом). Серым цветом показаны районы с неизвестной синтенией. Для групп сцепления панцирной щуки 7, 10, 21 и 23 показано несколько возможных вариантов эволюции. ASGD – специфичная полногеномная дупликация осетровых.

Калабарский каламоихт (*Erpetoichthys calabaricus*)

Кариотип калабарского каламоихта был ранее уже описан с помощью стандартных цитогенетических методов [21]. Однако в той работе использовались суспензии метафазных хромосом, полученные непосредственно из тканей почек, жабр и гонад без предварительного культивирования клеток. В данном исследовании хромосомные суспензии были получены из культур первичных фибробластов каламоихта, что значительно повысило классических цитогенетических методов. В целом полученные нами результаты не противоречат опубликованным ранее для данного вида [21] (Рис. 3, Рис. 10). Помимо этого, в работе был применён метод GTG-окрашивания (см. Рис. 10), результаты которого для данного вида не публиковались ранее, и который позволяет лучше дифференцировать хромосомы сходных форм и размеров.

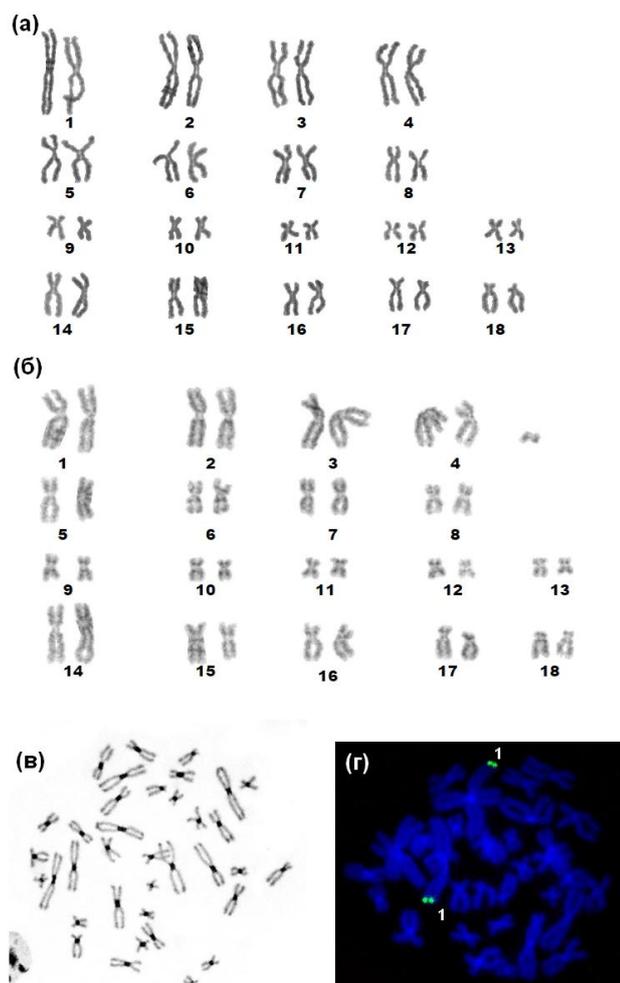


Рисунок 10. Метафазные хромосомы калабарского каламоихта: а – рутинное окрашивание (особь Esa1); б – GTG-окрашивание (особь Esa2 с хромосомной перестройкой), в – C-окрашивание (Esa1), г – окрашивание DAPI (синий) и CMA₃ (зелёный) (Esa1).

Была выполнена микродиссекция отдельных мелких хромосом и плеч крупных хромосом калабарского каламоихта. Получено 22 библиотеки, 16 из которых проверены с помощью FISH. Специфических сигналов гибридизации выявлено не было (Рис. 11), по-видимому, из-за высокой обогащённости генома повторёнными последовательностями. Сходная картина наблюдалась при гибридизации библиотек стерляди с хромосомами калабарского каламоихта (см. Рис.11). По-видимому, несмотря на достаточно большое время дивергенции (около 400 млн. лет [2]) между этими двумя видами до сих пор сохраняются общие повторённые последовательности ДНК.

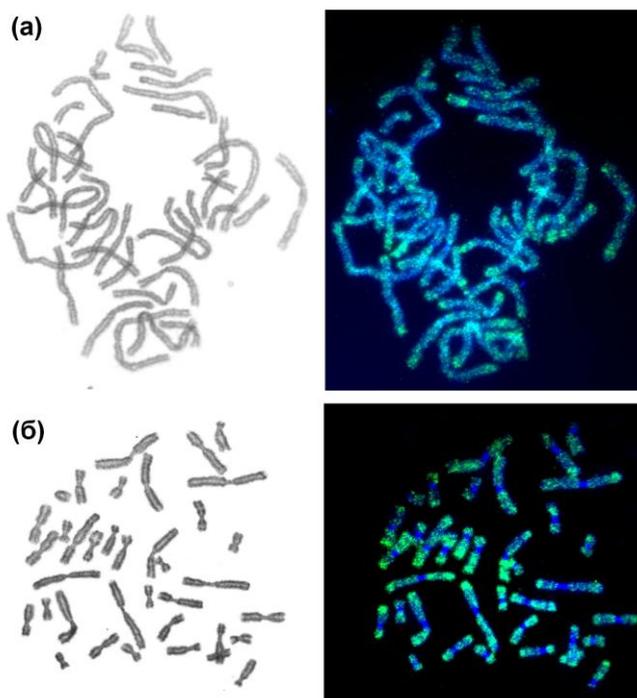


Рисунок 11. FISH на метафазных хромосомах калабарского каламоихта: а – микродиссекционной библиотеки калабарского каламоихта; б - микродиссекционной библиотеки стерляди (R64).

ВЫВОДЫ

1. Y-хромосома полосатого оплегната (*Oplegnathus fasciatus*) действительно образовалась в результате слияния прото-Y-хромосомы с аутосомой.
2. Несмотря на то, что стерлядь и пятнистая панцирная щука являются давно разошедшимися в эволюции видами (около 360 млн. лет назад), между некоторыми их хромосомами до сих пор сохраняются районы синтении.
3. Для обнаружения оставшихся синтенных районов между хромосомами стерляди и пятнистой панцирной щуки необходима дальнейшая проработка метода выравнивания последовательностей библиотек.
4. Впервые были напрямую показаны межхромосомные перестройки у представителя сем. Осетровые, имевшие место после ASGD.
5. Использование клеточных культур первичных фибробластов калабарского каламоихта позволило получить изображения метафазных хромосом с более высоким разрешением, чем было получено в других работах.
6. Результаты, полученные для хромосом калабарского каламоихта с помощью классических цитогенетических методов, не противоречат полученным ранее.
7. Между геномами калабарского каламоихта и стерляди сохраняются общие повторённые последовательности, несмотря на то, что время дивергенции между этими видами составляет около 400 млн. лет.
8. Более целесообразным представляется изучение повторённых последовательностей ДНК, широко представленные в геноме калабарского каламоихта.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1. **Андреюшкова Д.А.**, Трифонов В.А., Xu D., Сердюкова Н.А., Лемская Н.А., Беклемишева В.Р. Флуоресцентная *in situ* гибридизация микродиссекционных проб Y-хромосомы полосатого оплеugnата (*Oplegnathus fasciatus*) и локализация последовательностей рибосомной РНК на препаратах метафазных хромосом *O. fasciatus* // Материалы международной конференции «Хромосома 2015». Новосибирск, 2015. С. 58
2. **Андреюшкова Д.А.** Эволюция системы множественных половых хромосом на примере половых хромосом полосатого оплеugnата (*Oplegnathus fasciatus*) // Материалы VIII всеоссийского с международным участием Конгресса молодых учёных-биологов «Симбиоз – Россия 2015». Новосибирский государственный университет. Новосибирск, 2015. С. 101.
3. Кичигин И.Г., **Андреюшкова Д.А.**, Побединцева М.А., Трифонов В.А. Многообразие типов генетического определения пола лучеперых рыб (Actinopterygii) // Цитология. – 2016. – №.58. – С. 405-411.
4. **Andreyushkova D.A.**, Prokopov D.Y., Biltueva L.S., Serdyukova N.A., Lemskaya N.A., Romanenko S.A., Trifonov V.A. Karyotypic and molecular cytogenetic characterization of the reedfish (*Erpetoichthys calabaricus*) // Abstracts of the international mini-conference “Chromosomes and mitosis”. Novosibirsk, 2016. P. 14.
5. Beklemisheva V.R., **Andreyushkova D.A.**, Biltueva L.S., Lemskaya N.A., Romanenko S.A., Kulemzina A.I., Serdyukova N.A., Graphodatsky A.S., Trifonov V.A. Investigation of polyploidy in Acipenseridae family using sterlet fluorescent chromosomespecific microdissection probes // Abstracts of the international mini-conference “Chromosomes and mitosis”. Novosibirsk, 2016. P. 16.
6. Прокопов Д.Ю., Билтуева Л.С., Воробьева Н.В., Романенко С.А., Беклемишева В.Р., **Андреюшкова Д. А.**, Макунин А.И., Дружкова А.С., Сердюкова Н.А., Кудрявцева А.В., Комиссаров А.С., Кливер С.Ф., Графодатский А.С., Трифонов В.А. // Применение методов высокопроизводительного секвенирования и молекулярной цитогенетики для изучения геномов осетрообразных. V Научно-практическая конференция молодых ученых с международным участием «Современные проблемы и перспективы развития рыбохозяйственного комплекса». Москва, 2017. С. 243.
7. **Андреюшкова Д.А.**, Макунин А.И., Беклемишева В.Р., Романенко С.А., Дружкова А.С., Билтуева Л.С., Сердюкова Н.А., Графодатский А.С., Трифонов В.А. Анализ микродиссекционных библиотек хромосом стерляди (*Acipenser ruthenus*) с использованием данных высокопроизводительного секвенирования // Acta Naturae 9 (Спецвыпуск 1). Новосибирск, 2017. С. 75.
8. Трифонов В.А., Макунин А.И., Романенко С.А., Беклемишева В.Р., Билтуева Л.С., Прокопов Д.Ю., Побединцева М.А., Дружкова А.С., **Андреюшкова Д.А.**, Гусельников С.В., Сердюкова Н.А., Кудрявцева А.В., Комиссаров А.С., Кливер С.Ф., Шартл М., Графодатский А.С. Секвенирование и анализ генома и транскриптома стерляди (*Acipenser ruthenus*) // Acta Naturae 9 (Спецвыпуск 1). Новосибирск, 2017. С. 80.
9. Trifonov V.A., Makunin A.I., Romanenko S.A., Biltueva L.S., Beklemisheva V.R., Pobedintseva M.A., Prokopov D.Yu., **Andreyushkova D.A.**, Graphodatsky A.S. Whole genome duplications in vertebrate evolution // Mol Cytogenet 10 (Suppl 1). Florence, 2017. 20 (L17).

10. **Andreyushkova D.A.**, Makunin A.I., Beklemisheva V.R., Romanenko S.A., Druzhkova A.S., Kulemzina A.I., Biltueva L.S., Serdyukova N.A., Graphodatsky A.S., Trifonov V.A. Revealing of the chromosome synteny regions between sterlet (*Acipenser ruthenus*) and spotted gar (*Lepisosteus oculatus*) // Беляевские чтения. Международная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева. Тезисы докладов. Новосибирск, 2017. С. 113.
11. **Andreyushkova D.A.**, Makunin A.I., Beklemisheva V.R., Romanenko S.A., Druzhkova A.S., Biltueva L.S., Serdyukova N.A., Graphodatsky A.S., Trifonov V.A. Next generation sequencing of chromosome-specific libraries sheds light on genome evolution in paleotetraploid sterlet (*Acipenser ruthenus*) // Genes. – 2017. – V. 8. – N. 11. – P. 318-340.
12. Guselnikov S.V., Baranov K.O., Najakshin A.M., Mechetina L.V., Chikaev N.A., Makunin A.I., Kulemzin S.V., **Andreyushkova D.A.**, Stöck M., Wuertz S., Gessner J., Warren W.C., Schartl M., Trifonov V.A., Taranin A.V. Diversity of Immunoglobulin Light Chain Genes in Non-Teleost Ray-Finned Fish Uncovers IgL Subdivision into Five Ancient Isotypes // Front Immunol. – 2018. – V. 28. – N. 9. – P. 1079-1094.
13. Trifonov V.A., **Andreyushkova D.A.**, Romanenko S.A., Pobedintseva M.A., Prokopov D. Yu., Biltueva L.S., Beklemisheva V.R., Druzhkova A.S., Makunin A.I., Graphodatsky A.S. Polyploidy and genome evolution of ray-finned fishes // Материалы международной конференции «Хромосома 2018». Новосибирск, 2018. С. 81.
14. **Андреюшкова Д.А.**, Макунин А.И., Романенко С.А., Билтуева Л.С., Беклемишева В.Р., Дружкова А.С., Гусельников С.В., Сердюкова Н.А., Графодатский А.С., Трифонов В.А. Выявление паралогичных районов в геноме стерляди (*Acipenser ruthenus*) // Материалы международной конференции «Хромосома 2018». Новосибирск, 2018. С. 93.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Phylogeny of the ray-finned fishes. Understanding evolution. URL: https://evolution.berkeley.edu/evolibrary/article/fullfishtree_01.
2. Near T.J., Eytan R.I., Dornburg A., Kuhn K.L., Moore J.A., Davis M.P., Wainwright P.C., Friedman M., Smith W.L. Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – V. 109. – N. 24. – P. 13698-13703.
3. Van de Peer Y., Maere S., Meyer A. The evolutionary significance of ancient genome duplications // Nat. Rev. Genet. – 2009. – V. 10 – N.10. – P. 725-732.
4. Кичигин И.Г., Андреюшкова Д.А., Побединцева М.А., Трифонов В.А. Многообразие типов генетического определения пола лучеперых рыб (Actinopterygii) // Цитология. – 2016. – №.58. – С. 405-411.
5. Marburger S., Alexandrou M.A., Taggart J.B., Creer S., Carvalho G., Oliveira C., Taylor M.I. Whole genome duplication and trasposable element proliferation drive genome expansion in Corydoradinae catfishes // Proc. Biol. Sci. – 2018. – V. 285. – N. 1872.
6. Sutherland B.J.G., Rico C., Audet C., Bernatchez L. Sex Chromosome Evolution, Heterochiasmy, and Physiological QTL in the Salmonid Brook Charr *Salvelinus fontinalis*. G3 (Bethesda). – 2017. – V. 7. – N.8. – P. 2749-2762.
7. Sember A., Bohlen J., Šlechtová V., Altmanová M., Pelikánová Š., Ráb P. Dynamics of tandemly repeated DNA sequences during evolution

- of diploid and tetraploid botiidloaches (Teleostei: Cobitoidea: Botiidae) // PLoS One. – 2018. – V. 13. – N.3.
8. Trifonov V.A., Romanenko S.A., Beklemisheva V.R., Biltueva L.S., Makunin A.I., Lemskaya N.A., Kulemzina A.I., Stanyon R., Graphodatsky A.S. Evolutionary plasticity of acipenseriform genomes // Chromosoma. – 2016. – V. 125. – N. 4. – P. 661-668.
 9. Comai L. The advantages and disadvantages of being polyploid // Nat. Rev. Genet. – 2005. – V. 6. – N. 11. – P. 836-846.
 10. Vandepoele K., De Vos W., Taylor J.S., Meyer A., Van de Peer Y. Major events in the genome evolution of vertebrates: Paranome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – V. 101. – N. 6. – P. 1638-1643.
 11. Murat F., Van de Peer Y., Salse J. Decoding plant and animal genome plasticity from differential paleo-evolutionary patterns and processes // Genome Biol. Evol. – 2002. – V. 4. – N. 9. – P. 917-928.
 12. Smith J.J., Keinath M.C. The sea lamprey meiotic map improves resolution of ancient vertebrate genome duplications // Genome Res. – 2015. – V. 25. – N. 8. – P. 81-90.
 13. Kikuchi K., Hamaguchi S. Novel sex-determining genes in fish and sex chromosome evolution // Develop. Dyn. – 2013. – V. 242. – N.4. – P. 339-353.
 14. Devlin R. H., Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences // Aquaculture. – 2002. – V. 208. – N. 3-4. – P. 191-364.
 15. Cardoso A. L., Pieczarka J. C., Nagamachi C. Y., Cardoso A. L., Pieczarka J. C., Nagamachi C.Y. X1X1X2X2/X1X2Y sex chromosome systems in the neotropical Gymnotiformes electric fish of the genus *Brachyhyopomus* // Genet. Mol. Biol. – 2015. – V. 38. – N. 2. – P. 213-219.
 16. Xu D., Lou B., Bertollo L.A., Cioffi M. de B. Chromosomal mapping of microsatellite repeats in the rock bream fish *Oplegnathus fasciatus*, with emphasis of their distribution in the neo-Y chromosome // Mol. Cytogenet. – 2013. – V. 6. – N.1. – P. 12-18.
 17. Braasch I., Gehrke A.R., Smith J.J., Kawasaki K., Manousaki T., Pasquier J., Amores A., Desvignes T., Batze P., Catchen J., et al. The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons // Nat. Genet. – 2016. – V. 48. – N. 4. – P. 427-437.
 18. Romanenko S.A., Biltueva L.S., Serdyukova N.A., Kulemzina A.I., Beklemisheva V.R., Gladkikh O.L., Lemskaya N.A., Interesova E.A., Korentovich M.A., Vorobieva N.V., Graphodatsky A.S., Trifonov V.A. Segmental paleotetraploidy revealed in sterlet (*Acipenser ruthenus*) genome by chromosome painting // Mol. Cytogenet. – 2015. – V. 8. – N. 90.
 19. Графодатский, А. С., Раджабли, С. И. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных млекопитающих. Атлас. – Н.: Наука, 1988. – 127 с.
 20. Yang F., Trifonov V., Ng B.L., Kosyakova N., Carter, N.P. Generation of Paint Probes from Flow-Sorted and Microdissected Chromosomes. In Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) // Liehr, T., Ed.; Springer Protocols Handbooks; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2017.
 21. Morescalchi M.A., Liguori I., Rocco L., Stingo V. Karyotypic characterization and genomic organization of the 5S rDNA in *Erpetoichthys calabaricus* (Osteichthyes, Polypteridae) // Genetica. – 2007. – V. 131. – N. 2. – P.209-216.
 22. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // Nat. Methods. – 2012 – V. 9. – N. 4. – P. 357-359.

23. Li, H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM // arXiv. – 2013. – P. 1-3.
24. Makunin A.I., Kichigin I.G., Larkin D.M., O'Brien P.M., Ferguson-Smith M.A., Yang F., Proskuryakova A.A., Vorobieva N.V., Chernyaeva E.N., O'Brien S.J., Graphodatsky A.S., Trifonov V.A. Contrasting origin of B chromosomes in two cervids (Siberian roe deer and grey brocket deer) unraveled by chromosome-specific DNA sequencing // BMC Genomics. – V. 17. – N. 1. – P. 618-632.
25. Biltueva L.S., Prokopov D.Y., Makunin A.I., Komissarov A.S., Kudryavtseva A.V., Lemskaya N.A., Vorobieva N.V., Serdyukova N.A., Romanenko S.A., Gladkikh O.L., Graphodatsky A.S., Trifonov V.A. Genomic organization and physical mapping of tandemly arranged repetitive DNAs in sterlet (*Acipenser ruthenus*) // Cytogenet. Genome Res. - 2017. – V. 152. – N. 3. – P. 148-157.
26. Andreyushkova D.A., Makunin A.I., Beklemisheva V.R., Romanenko S.A., Druzhkova A.S., Biltueva L.S., Serdyukova N.A., Graphodatsky A.S., Trifonov V.A. Next generation sequencing of chromosome-specific libraries sheds light on genome evolution in paleotetraploid sterlet (*Acipenser ruthenus*) // Genes. – 2017. – V. 8. – N. 11. – P. 318-340.
27. Betancur-R. R., Broughton R.E., Wiley E.O., Carpenter K., López J.A., Li C., Holcroft N.I., Arcila D., Sanciangco M., Cureton LI J.C. et al. The tree of life and a new classification of bony fishes // PLoS Curr. - 2013. – V. 5.
28. Yang, F., O'Brien P.C.M., Milne B.S., Graphodatsky A.S., Solanky N., Trifonov V., Rens W., Sargan D., Ferguson-Smith M.A. A Complete comparative chromosome map for the dog, red fox, and human and its integration with canine genetic maps // Genomics. – 1999. – V. 62. – N. 2. – P. 189-202.
29. Hinrichs A.S., Karolchik D., Baertsch R., Barber G.P., Bejerano G., Clawson H., Diekhans M., Furey T.S., Harte R.A., Hsu F. et al. The UCSC genome browser database: Update 2006 // Nucleic Acids Res. – 2006. – V. 1. - N. 34. - D590-D598.
30. Barbazuk W.B., Korf I., Kadavi C., Heyen, J., Tate S., Wun E., Bedell J.A., McPherson J.D., Johnson S.L. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes // Genome Res. – 2000. – V. 10. – N. 9. – P. 1351-1358.
31. Howe K., Clark M.D., Torroja, C.F., Torrance J., Berthelot C., Muffato M., Collins J.E., Humphray S., McLaren K., Matthews L. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome // Nature. – 2013. – V. 496. – N. 7446. – P. 498-503.
32. Murphy W.J., Larkin D.M., Everts-van der Wind A., Bourque G., Tesler G., Auvil L., Beaver J.E., Chowdhary B.P., Galibert F., Gatzke L. et al. Dynamics of mammalian chromosome evolution inferred from multispecies comparative maps // Science. – 2005. – V. 309. – N. 5734. – P. 613-617.
33. Nakatani Y., Takeda H., Kohara Y., Morishita S. Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates // Genome Res. 2007. – V. 17. – N. 9. – P. 1254-1265.

Отчет о проверке текста
научно-квалификационной работы
на объем заимствования

Андреюшкова Дарья Александровна

«Особенности эволюции хромосом лучепёрых рыб»

Оценка оригинальности: 87.46%

Заимствования: 12.54%

№ документа: 995652

Имя исходного файла: Научный_доклад_Андреюшкова.doc

Размер файла: 13.3 МБ

Размер текста: 36334

Слов в тексте: 5416

Число предложений: 369

Источники (доля в тексте – ссылка):

10.4%

https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%98%D0%BD%D1%81%D1%82%D0%B8%D1%82%D1%83%D1%82_%D0%BC...

16.4% <http://www.list-org.com/company/814678>

10.4% http://ruwiki.org/wiki/%D0%98%D0%BD%D1%81%D1%82%D0%B8%D1%82%D1%83%D1%82_%D0%BC%D0%BE...

<http://earthpapers.net/strukturno-funktsionalnaya-organizatsiya-hromosom-opistorhid>

25.5% <http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/about>

25.4% <http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/about>

20.1% <http://www.list-org.com/company/6935629>

20.1% <https://www.rusprofile.ru/id/5798571>

5.4% <http://fishbiosystem.ru/PERCIFORMES/PERCIFORMES1.html>

5.0% <http://www.activestudy.info/rasshheplenie-po-polu/>

5.6% https://bib.social/biologiya_1092/prilojeniya-93494.html

6.0% https://medinfo.social/genetika_982/gibridizatsiya-situ-hromosomnyiy-peynting-56001.html

6.3% [http://bono-](http://bono-esse.ru/blizzard/A/Posobie/Genetik/Genetika_dok/chromosomi_i_chrom_bolezn...)

[esse.ru/blizzard/A/Posobie/Genetik/Genetika_dok/chromosomi_i_chrom_bolezn...](http://bono-esse.ru/blizzard/A/Posobie/Genetik/Genetika_dok/chromosomi_i_chrom_bolezn...)

5.0% <https://poznayka.org/s58494t1.html>
13.6% <https://studopedia.info/1-97723.html>
5.6% <http://detzdrav.com/1987.html>
7.6% <https://persona.tsu.ru/Conferences/Index/12181?reportsPage=2>
32.9% <http://www.mcb.nsc.ru/laboratory/lcg>
47.6% <https://www.mcb.nsc.ru/laboratory/lcg>
53.7% <https://www.mcb.nsc.ru/laboratory/lca>
23.2% http://grant.rscf.ru/prjcard_int?14-14-00275
28.5% <http://www.mcb.nsc.ru/en/laboratory/lca>
39.2% <http://www.mcb.nsc.ru/laboratory/lnsu>
8.6%
https://figshare.com/articles/Supplementary_tables_and_figures_from_Whole_genome_dupl...
18.1% <https://www.mcb.nsc.ru/node/1047>
5.3% <https://biologydirect.biomedcentral.com/articles/10.1186/1745-6150-3-50>
9.4% <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0024948.html>
10.7% https://www.nature.com/articles/s41598-017-08476-y?error=cookies_not_supported&code=5...
5.7% <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2018.00081/full>
8.7% <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3608002/>
8.8% <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4530641/>
8.6% <https://library.swtjc.edu/eds/detail?db=cmedm&an=27516089&isbn=1471-2164>
6.1% <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1347506/>

Оригинальность работы составляет 87.46 % , что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» на сайте www.antiplagius.ru
06.09.2018 г.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.б.н. К.В. Разум