

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

На правах рукописи

Гацкая Сима Сергеевна

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Структура и экспрессия основных форм центромерного
гистона CENH3 у ржи, пшеницы и их гибридов

Направление подготовки	06.06.01 Биологические науки
Направленность	03.01.07 Молекулярная генетика

Новосибирск - 2020

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной генетики ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Научный руководитель: **Вершинин Александр Васильевич**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики ФГБУН Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Центромеры являются специализированными районами хромосом, которые осуществляют контроль за процессом деления клеток у всех видов растений и животных. Наиболее специализированной и универсальной характеристикой активной центромеры является присутствие центромерной модификации гистона H3, называемой CENH3 у растений (CENP-A у млекопитающих). В многокомпонентном молекулярном комплексе центромеры CENH3, взаимодействуя с другими коровыми гистоновыми белками, формирует специфический тип нуклеосом, что необходимо для формирования кинетохора — структуры, к которой прикрепляется веретено клеточного деления (Cheeseman, Desai, 2008). На молекулярном уровне участок хроматина, в котором в состав нуклеосом входит CENH3, и составляет центромеру. Это отмечено для хромосом с любыми формами центромер: моноцентрическими, дицентрическими, голоцентрическими, а так же с нецентромерами (Comai et al., 2017). Таким образом, CENH3 можно рассматривать как эпигенетическую «метку» центромеры (Allshire, Karpen, 2008). При потере CENH3 из центромер не происходит формирования кинетохора и правильного расхождения хромосом в ходе деления клеток (Talbert et al., 2004). Любая ошибка в транскрипции генов, кодирующих CENH3, трансляции, модификации или транспорте молекул CENH3 может повлиять на процесс правильной сборки центромерного хроматина и привести к потере центромерной функции (Allshire, Karpen, 2008).

Белок CENH3, подобно каноническому гистону H3, состоит из двух доменов: С - терминального (или HFD, histone-fold domain) и N - терминального «хвоста» (NTT). Между последовательностями HFD CENH3 и H3 наблюдается высокая гомология (Henikoff et al., 2001), но центромерная форма гистона отличается более протяженным N-терминальным доменом. Аминокислотная последовательность N-терминального домена CENH3 имеет низкую гомологию с соответствующей последовательностью канонического гистона H3 и характеризуется значительной межвидовой гетерогенностью (Malik, Henikoff, 2001; Talbert et al., 2002). Важная роль CENH3 в процессе клеточного деления определяется особенностями его структуры: в составе HFD домена имеются участки, ответственные за определение хромосомной локализации центромеры, centromere targeting domain (CATD) (Lermontova et al., 2006), в то время как N-терминальный домен отвечает за связь с белками кинетохора (Henikoff et al., 2001). В отличие от консервативного канонического гистона H3, CENH3 проявляет способность к быстрой адаптивной эволюции у некоторых видов (Malik, Henikoff, 2009).

У большинства диплоидных видов растений, у которых была исследована структура и копияность *CENH3*, обнаружена одна копия гена этого гистона. В том числе у злаков - кукурузы, риса — *CENH3* кодируется одним геном (Zhong et al. 2002; Nagaki et al. 2004). Однако, у диплоидных видов из трибы *Triticeae*, таких, как виды ржи, пшеницы, ячменя, эгилопс (*Secale*, *Triticum*, *Hordeum*, *Aegilops*) обнаружено два варианта гена этого гистона, называемые α и β (Evtushenko et al. 2017; Sanei et al. 2011; Yuan et al. 2015). Эти варианты отличаются нуклеотидной последовательностью, уровень идентичности между генами α *CENH3* и β *CENH3* у видов ржи составляет 81–83% (Evtushenko et al. 2017).

До настоящего момента остается неясным, почему у злаков трибы *Triticeae* сохраняется две различные по структуре формы центромерного гистона H3. На хромосомах ячменя показано, что оба варианта центромерного гистона H3 включаются в центромеры при делении клеток, как во время митоза, так и в мейозе, являясь функциональными белками (Ishii et al, 2015). Уровень экспрессии различных вариантов *CENH3* и их включения в центромеры варьирует в различных тканях ячменя (Ishii et al. 2015) и между дикими и культурными тетраплоидными видами пшеницы, что рассматривается в качестве действия адаптивной эволюции (Yuan et al., 2015). Получение новых данных о соотношении уровней экспрессии двух форм *CENH3* в течение онтогенеза, а так же в зависимости от типа ткани для культивируемой ржи (*S.cereale*) будет способствовать выявлению функциональной роли каждой формы *CENH3* и их возможного влияния на образование стабильных гибридных геномов в процессе отдаленной гибридизации. Исследованиями последних лет экспериментально установлено, что *CENH3* является одним из важнейших регуляторов взаимодействия двух различных родительских наборов хромосом в ядре, возникающем в процессе отдаленной гибридизации (Moraes et al., 2011, Sanei et al., 2011). Однако, молекулярные механизмы которые участвуют в формировании нового генетического гомеостаза в гибридном геноме при скрещивании пшеницы и ржи до сих пор практически не изучены. На гибридах ржи и пшеницы показано, что оба родительских генома участвуют в формировании структуры *CENH3* секалотритикум (*Secale L. × Triticum L.*)(Липихина и др., 2018). Исследование транскрипционной активности α *CENH3* и β *CENH3* в условиях собственной родительской и гибридной цитоплазматической среды поможет понять роль двух форм *CENH3* в регуляции и разрешении межгеномных конфликтов, которые могут происходить в процессе межродовой гибридизации внутри одного ядра гибридной зародышевой клетки.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является определение транскрипционной активности генов-паралогов центромерного гистона *CENH3* на отдельных стадиях индивидуального развития культивируемой ржи (*S.cereale* сорт

Imperial), а так же сравнительный анализ экспрессии этих генов у аллополиплоидных гибридов ржи и пшеницы секалотритикум (*Str. Verasen*×*Mihas* и *Str. Verasen*×*Dubrava*) и их родительских видов (*S. cereale* v. *Verasen*, *Triticale* v. *Mihas* и *Triticale* v. *Dubrava*).

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оптимизировать систему для оценки относительной экспрессии α и β форм *CENH3* ржи методом RT-PCR
2. Оценить относительную экспрессию α и β форм *CENH3* в различных тканях ржи (вегетативных и генеративных) и на разных стадиях развития ржи
3. Определить нуклеотидные последовательности β *CENH3* родительских форм гибридов секалотритикум — тетраплоидной ржи Верасень и гексаплоидных тритикале Михась и Дубрава
4. Выявить транскрипционный профиль различных форм *CENH3* в вегетативных и генеративных тканях ржано-пшеничных амфиплоидов секалотритикум и их родительских видов

Научная новизна. В ходе данной работы впервые была проведена оценка уровня экспрессии α и β форм гена *CENH3* в разных органах и на разных стадиях развития культивируемой ржи *S. cereale* subsp. *cereale* методом ПЦР в режиме реального времени.

Впервые определена молекулярная структура β *CENH3* тетраплоидной ржи Верасень и гибридов — тритикале Михась и тритикале Дубрава. С использованием полученных данных проведена оценка относительного уровня экспрессии α и β форм *CENH3* у гибридов секалотритикум, а так же их родительских видов. Принципиально новым подходом является использование гибридных форм, что позволяет сравнить работу генов, кодирующих *CENH3*, в условиях собственной родительской и гибридной цитоплазматической среды.

Теоретическая и практическая значимость работы. В данной работе проведен сравнительный анализ активности генов-паралогов *CENH3* в различных тканях и на различных стадиях развития растений ржи, что позволяет определить, имеют ли эти гены функциональные отличия. Результаты изучения экспрессии α и β форм *CENH3* на гибридных формах ржи и пшеницы внесут существенный вклад в понимание фундаментальной проблемы, заключающейся в определении видовых особенностей молекулярной структуры и функциональной активности центромер и их способности проявлять эту активность в гибридных клетках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Для определения уровней транскрипции α CENH3 и β CENH3 были выращены растения ржи *S. cereale* subsp. *cereale* 'Imperial', а так же тетраплоидной ржи Верасень (RRRR, $2n = 4x = 28$), растения гексаплоидных тритикале Михась и Дубрава (AABBRR, $2n = 6x = 42$) и их гибриды — растения секалотритикум (\times Secalotriticum Rozenst., RRAABB, $2n = 6x = 42$) Верасень \times Михась и Верасень \times Дубрава. Семена гибридов секалотритикум и исходных родительских форм созданы в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси и предоставлены д.б.н. И. А. Гордеем. Семена ржи 'Империал' были получены из коллекции Всероссийского исследовательского института генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (accession no. 9368).

Ткани корешков и колеоптилей собирали непосредственно после прорастания. Для получения генеративных тканей проростки проходили яровизацию в течение двух месяцев при температуре 2-4°C, затем их выращивали до колошения в теплице ИЦиГ СО РАН. Для получения материала развивающихся зерен колосья были кастрированы и опылялись индивидуально. Собранные биологические образцы замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до выделения РНК.

Общую РНК экстрагировали с применением TRI Reagent (MRC, Inc., USA), согласно руководству производителя. Чтобы избежать контаминации геномной ДНК, тотальную РНК обрабатывали ДНКазой (DNA-free™ Kit, Ambion, США). Кодированная ДНК была синтезирована из обработанной ДНКазой РНК с помощью Fire Script Reverse Transcriptase (BiolabMix, Россия).

Для определения нуклеотидных последовательностей β CENH3 с подготовленными образцами кДНК проводили реакции ПЦР на амплификаторе C1000™ (Bio Rad, USA) с использованием праймеров, указанных в работе (Evtushenko et al., 2017):

F: 5'-TGGGTCGCACGAAGCAC-3'

R: 5'-TCACCAAAGCCTTCTCCCC-3'

Все используемые в исследовании праймеры были синтезированы в ООО «БИОССЕТ», Новосибирск.

С полученными продуктами ПЦР проводили электрофорез в 1,8% агарозном геле, затем элюировали фрагменты ДНК из геля с помощью миниколонок QIAquick (QIAGEN, USA) по протоколу производителя. Для проведения реакции лигирования продуктов ПЦР в вектор использовали кит для клонирования ПЦР продуктов (InsTAclone PCR Cloning Kit, Thermo Fisher Scientific). С помощью полученной лигазной смеси трансформировали электрокомпетентные клетки штамма *E.coli* XL-MRF' (фирмы Invitrogen) и выращивали

их на селективной среде. Колонии, в которых произошла трансформация, выкалывали и переносили в пробирки с жидкой средой LB для наращивания в течении 14 часов, а затем выделяли из них плазмидную ДНК. Наличие встройки проверяли реакцией рестрикции с использованием рестриктаз EcoRI и HindIII и последующим электрофорезом. С полученными образцами плазмидной ДНК, содержащими вставки последовательностей β CENH3, проводили реакции секвенирования на амплификаторе BIS Thermocycler с использованием BigDye^R Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems). Капиллярное секвенирование выполнялось на базе оборудования ИМКБ СО РАН сотрудниками института.

Относительные уровни транскрипции α CENH3 и β CENH3 определяли в подготовленных образцах кДНК методом RT-PCR на приборе LightCycler ® 480 Instrument II (Roche). В 25 μ l PCR смеси входило 12.5 μ l BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (2 \times) (BiolabMix, Россия), 0.3 mM соответствующих праймеров (в случае обратного праймера для β CENH3 — 0.2 mM) и 8мкл разбавленного образца кДНК. Реакции выполнялись в двух технических повторах для референсных генов и в трех технических повторах для образцов α и β CENH3 на приборе LightCycler ® 480 Instrument II (Roche) по специально подобранной программе (денатурация 95 °C 5 мин., затем 45 циклов: 95 °C 15 сек., отжиг 62 °C 20 сек. и элонгация при 72°C 30 сек.). Отсутствие димеров праймеров и побочных продуктов в продуктах реакций контролировалось с помощью кривых плавления и постановок NTC-реакций. Вычисление эффективностей реакций и относительный RT-PCR анализ были выполнены с использованием программного обеспечения амплификатора LC480.

Результаты и обсуждение

Оптимизация RT-PCR системы для оценки относительной экспрессии α и β форм CENH3 ржи

Исходя из задач исследования, для определения относительных уровней транскрипции α CENH3 и β CENH3 был использован метод RT-PCR с интеркалирующим флуоресцентным красителем SYBR Green I. Для нормализации уровней транскрипции были использованы три референсных гена — *Ta2776*, *Ta54227*, *Ta53967* (Таблица 1). Референсные гены с оптимальными характеристиками были выбраны на основании исследования по поиску и проверке референсных генов для пшеницы (Paolacci et al., 2009), как ближайшего родственника ржи, так как на ржи подобные исследования отсутствуют. Из базы данных TIGR (The TIGR Plant Transcript Assemblies database, <http://plantta.tigr.org>) были извлечены пшеничные последовательности референсных генов, по которым в базе данных контигов геномных сиквенсов ржи *S.cereale* (BioSample:

SAMEA3928734 BioProject: PRJEB13501) был осуществлен поиск последовательностей ортологичных генов ржи. На основании ржаных последовательностей были подобраны праймеры для реакции RT-PCR. Праймеры подбирали и анализировали с помощью программы Primer Quest Tool (eu.idtdna.com). При выборе праймеров учитывалась интрон-экзонная структура генов, что является еще одним условием получения надежных результатов RT-PCR, так как выбор праймеров на границах экзонов позволяет избежать возможного влияния геномной ДНК на результаты.

Таблица 1: Характеристика референсных генов, используемых в работе (согласно Paolacci et al., 2009), и последовательности подобранных праймеров.

Реф. ген (<i>T.aestivum</i> UniGene cluster)	Праймеры для ржаных ортологов	Аннотация гена <i>T.aestivum</i>	Молекулярная функция (согласно GO, http://geneontology.org)
Ta2776	F: 5'-CGATTCAGAGCAGCGTATTGTTG-3' R: 5'-AGTTGGTCGGGTCTCTTCTAAATG-3'	Similar to RNase L inhibitor-like protein	ATP-binding, ATPase activity, Electron carrier activity (ABC transporter)
Ta54227	F: 5'-TACGCCATCAGGGAGAACA-3' R: 5'-CTTCTGGGTTGTCCTTCCTC-3'	Cell division control protein 48 homolog (AAA-superfamily of ATPases)	ATP binding, Nucleoside-triphosphate activity
Ta53967	F: 5'-GCTGGAGTCAGGGCTAAT-3' R: 5'-CGACAATGAGACCGTAGAGA-3'	Vacuolar ATP synthase 16kDa proteolipid subunit	Hydrogen ion transporting ATPase activity, rotational mechanism

Ранее у различных видов ржи было показано наличие двух генов центромерного гистона, α CENH3 и β CENH3. Кодированные нуклеотидные последовательности этих генов были секвенированы и детально проанализированы (Evtushenko et al., 2017). Нуклеотидные последовательности α CENH3 и β CENH3 имеют существенные отличия между собой, но не между видами. Они отличаются длиной, экзон-интронной структурой, а уровень идентичности между α CENH3 и β CENH3 составляет 81-83% в районе С-конца и прилегающего к нему небольшого участка N-конца, при этом основная часть участка гена, соответствующего N-концу CENH3, у α CENH3 и β CENH3 слабо выравниваются друг с другом. Кроме основных вариантов последовательностей α ScCENH3-v1 и β ScCENH3-v1, у разных видов ржи были обнаружены и другие варианты, обозначенные α ScCENH3-v2 и β ScCENH3-v2 (Evtushenko et al. 2017). Последовательность α ScCENH3-v1 имеет длину 501 п.о., в то время как α ScCENH3-v2 содержит делецию в 9 п.о.. Так же последовательности этих двух вариантов отличаются некоторыми, в том числе не синонимичными, заменами, уровень идентичности между этими вариантами составляет 94%. Последовательность β ScCENH3-v2 на 6 п.о. длиннее β ScCENH3-v1 (462 и 456 п.о.,

соответственно), и уровень идентичности между нуклеотидными последовательностями составляет 95%. Оба эти варианта, как α CENH3-v1 и -v2, так и β CENH3-v1 и -v2, были обнаружены у *S. cereale* subsp. *cereale* сорта Imperial. Исходя из вышесказанного, в настоящем исследовании стояла задача подобрать праймеры для амплификации фрагментов α CENH3 и β CENH3 таким образом, чтобы отличать последовательности α CENH3 и β CENH3 и одновременно учитывать экспрессию двух вариантов этих генов. Праймеры подбирали с помощью программы Primer Quest Tool (IDT) с учетом интрон-экзонной структуры генов — преимущественно на границах экзонов, чтобы избежать возможного влияния геномной ДНК на результат реакций (Рисунок 1).

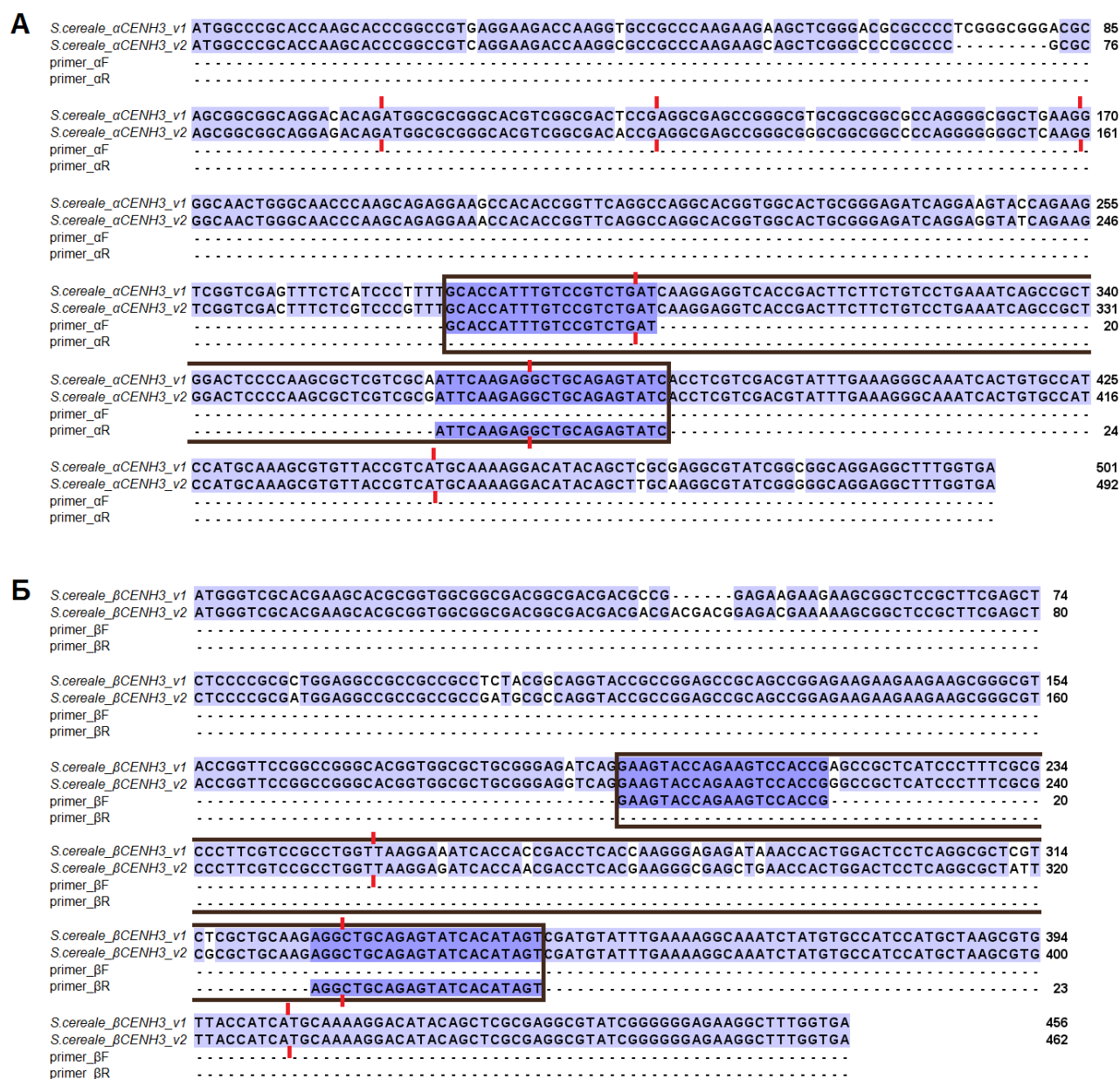


Рисунок 1. Выравнивание нуклеотидных последовательностей α CENH3-v1 и -v2 (A) и β CENH3-v1 и -v2 (B) (согласно Evtushenko et al., 2017). Красными штрихами отмечены границы экзонов, рамкой выделены ампликоны и праймеры, используемые в работе.

Подобранные последовательности праймеров для α CENH3:

F: 5'-GCACCATTTGTCCGTCTGAT-3'

R: 5'-GATACTCTGCAGCCTCTTGAAT-3'

Подобранные последовательности праймеров для β CENH3:

F: 5'-GAAGTACCAGAAGTCCACCG-3'

R: 5'-АСТАТГТГАТАCTCTGCAGCCT-3'

Работа праймеров, подобранных для α CENH3, β CENH3, и для референсных генов проверялась с помощью реакций ПЦР, так же была подобрана оптимальная температура отжига. Электрофореграмма продуктов ПЦР показала, что длина ампликонов соответствовала ожидаемой (Рисунок 2). Нуклеотидные последовательности полученных ПЦР-продуктов α CENH3 и β CENH3 были определены с помощью секвенирования и соответствовали ожидаемым.

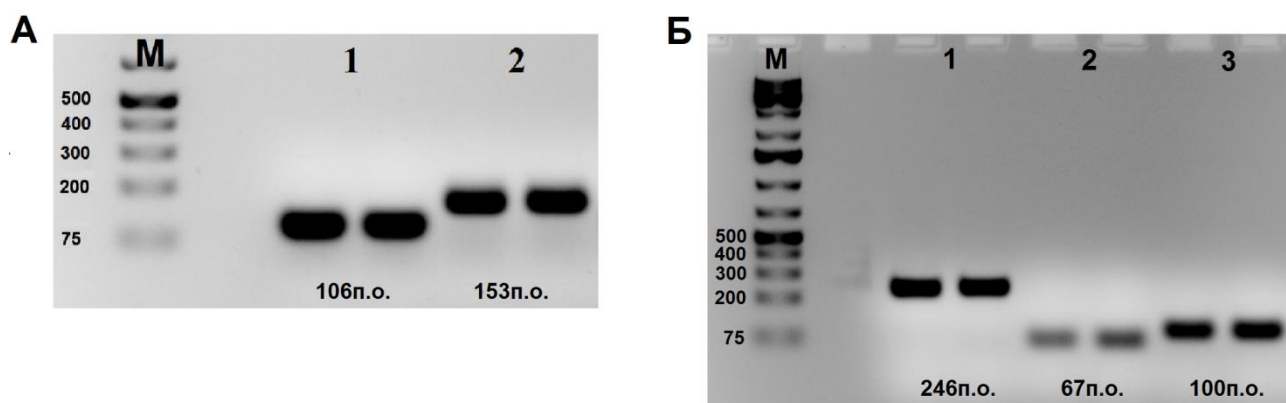


Рисунок 2. Электрофореграмма продуктов проверочной ПЦР: α CENH3 (1) и β CENH3 (2) (А) и референсных генов Ta2776 (1), Ta54227 (2), Ta53967 (3) (Б); указана ожидаемая длина ампликонов

Для проведения RT-PCR реакций была подобрана оптимальная концентрация праймеров для каждой пары и программа. Оптимальные концентрации праймеров определяли по отсутствию побочных продуктов и минимальному значению Ct в реакциях RT-PCR с различным количеством прямого и обратного праймеров со всеми возможными попарными сочетаниями на реакцию — 100 nM, 150 nM, 200 nM, 300 nM и до 400 nM.

Для определения соотношений экспрессии α и β форм CENH3, предварительно были проведены измерения эффективности реакций для каждой пары праймеров. Для этого были выполнены RT-PCR реакции на сериях пятикратных разведений кДНК (в четырёх повторах, с разной кДНК). В расчетах использовались полученные значения эффективности, которые для реакций амплификации α CENH3 и β CENH3 составили 82% и 85% соответственно. Для референсных генов эффективность реакций составила 99,7% для Ta2776, 94,8% для Ta54227 и 94,3% для Ta53967. Расчет относительной экспрессии α

и β *CENH3* осуществлялся с помощью программного обеспечения LC480II (Relative Quantification analysis with high confidence 2nd Derivative max).

Оценка относительной экспрессии α CENH3 и β CENH3 в разных органах и на разных стадиях развития ржи

Для оценки относительной экспрессии α и β форм CENH3 в разных органах и на разных стадиях развития ржи *S. cereale* subsp. *cereale* 'Imperial' были использованы биологические образцы тканей индивидуальных растений. Стадии роста, на которых был собран материал охарактеризованы по шкале развития злаков Задокса (Zadoks J.C. et al, 1974) (Таблица 2).

Таблица 2. Характеристика исследуемых тканей ржи согласно шкале развития злаков Задокса и количество исследованных биологических образцов для каждого типа ткани.

Название ткани	Код по Задоксу	Описание стадии	Кол-во образцов
корешки проростков	Z06	Прорастание, стадия после того, как корешки показываются из зерна (4 день прорастания)	8
колеоптиль	Z09	Прорастание, первый лист у кончика колеоптиля	8
третий лист	Z13	Проросток с развернувшимся 3 листом	6
лист на стадии кущения	Z21-Z24	Стадия кущения, главный побег и 1-4 боковых побега	11
стебель	Z32-33	Рост стебля, определяется 2 или 3 узла	7
пыльник	Z42-44	Начинает раскрываться флаговый лист, стадия между мейозом и развитием зрелой пыльцы	14
пестик	Z50-52	Начинают появляться ости колоса	13
зерно 7 дней	Z73	Зерно через 7 дней после опыления	4

В результате проведенных экспериментов было показано, что оба транскрипта *CENH3*, α и β , экспрессируются во всех исследованных тканях ржи 'Imperial' (Рисунок 3). При сравнении уровней транскрипции в вегетативных и генеративных тканях ржи, можно заключить, что экспрессия обоих вариантов минимальна на вегетативной стадии развития, причем после прорастания наблюдается снижение уровней экспрессии. Транскрипция α CENH3, и β CENH3 резко возрастает в генеративных тканях, и достигает максимума в ткани пестиков, а затем, в процессе развития зерна, снова начинает снижаться.

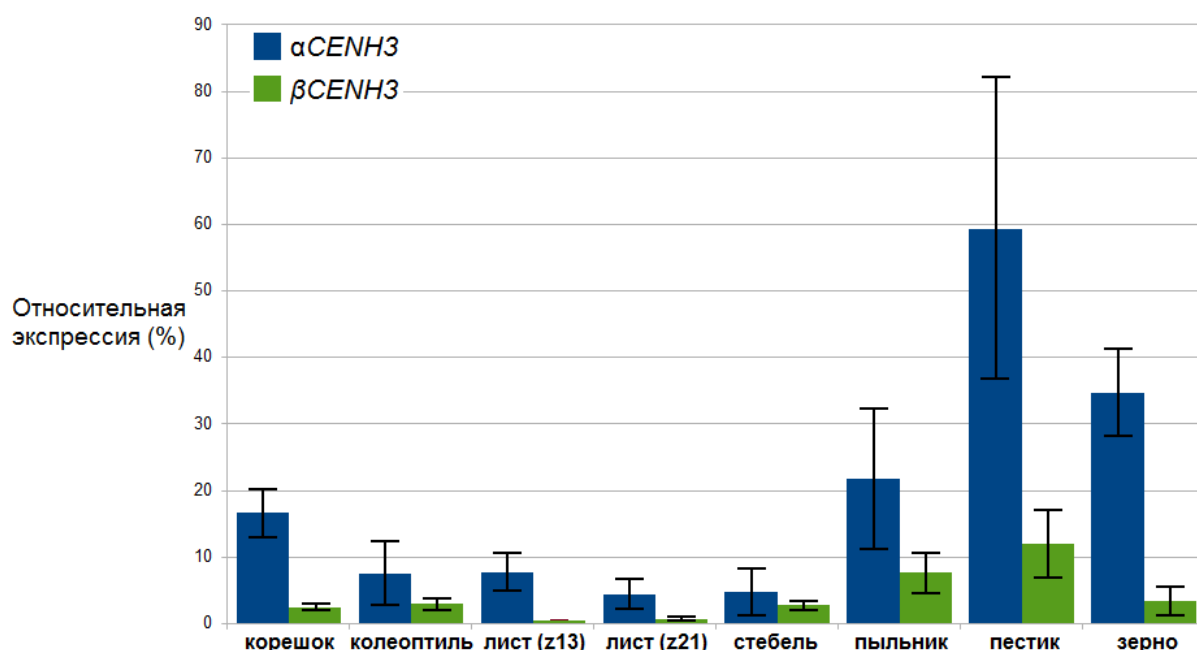


Рисунок 3. Нормализованные уровни транскрипции α CENH3 и β CENH3 в различных тканях растений *S. cereale* subsp. *cereale* 'Imperial'. Показаны средние значения с SD. За 100% принят максимальный уровень транскрипции α CENH3 в ткани пестиков

Таблица 3. Уровни транскрипции α CENH3 и β CENH3, нормализованные к среднему геометрическому трех референсных генов и соотношение уровней транскрипции α CENH3 и β CENH3 в вегетативных и генеративных тканях ржи 'Imperial'

Ткань	α CENH3	β CENH3	α/β
корешки проростков	16,7	2,5	6,7
колеоптиль	7,5	2,9	2,6
третий лист	7,7	0,4	17,6
лист на стадии кущения	4,4	0,7	6,7
стебель	4,7	2,8	1,7
пыльник	21,7	7,6	2,9
пестик	59,4	12,0	4,9
зерно (7 дней)	34,7	3,4	10,3

Во всех исследованных тканях транскрипция α CENH3 в несколько раз превышает транскрипцию β CENH3 (Таблица 3). Однако, относительное содержание транскриптов колеблется в зависимости от типа ткани. Так, в некоторых вегетативных тканях наблюдается относительно высокая экспрессия β CENH3: экспрессия β CENH3 всего в 2,6

раза меньше чем экспрессия α CENH3 в ткани coleoptилей, и в 1,7 раза меньше, чем в ткани стебля. В генеративных органах экспрессия β -формы так же существенна (в пыльниках β CENH3 в среднем в 2,9 раза меньше α CENH3), но в ткани пестиков возрастает уже в меньшей степени, чем экспрессия α -формы (в 4,9 раза меньше α CENH3). Более резкие отличия в экспрессии и значительное преобладание α -форм наблюдаются в тканях корешков проростков (в 6,7 раза), листьев (в 17,6 и 6,7 раза) и развивающемся зерне (в 10,3 раза). Из литературы известно, что и α CENH3, и β CENH3 включаются в центромеры ячменя в митозе и мейозе (Ishii et al., 2015). Аналогичные данные получены и в нашей лаборатории (ЛМГ ИМКБ СО РАН) для центромер митотических хромосом ржи. Значения экспрессии α CENH3 и β CENH3 довольно сильно отличаются, но все же имеют сравнимый уровень в большинстве тканей ржи и, исходя из вышесказанного, обе формы являются функциональными белками. Центромерный гистон H3 играет крайне важную роль в функционировании центромер и процессах деления клетки, поэтому велика вероятность того, что колебания в относительном содержании транскриптов двух различающихся по структуре форм этого гистона отражают тканеспецифичные потребности в этих формах. Значительное увеличение экспрессии и α CENH3, и β CENH3 в генеративных тканях, а так же относительно высокая экспрессия при прорастании, подчеркивает общую значимость двух вариантов центромерного гистона H3 в процессах роста и размножения злаков.

Определение нуклеотидных последовательностей β CENH3 тетраплоидной ржи Верасень и гексаплоидных тритикале Михась и Дубрава.

Для того, чтобы изучить экспрессию α - и β -генов CENH3 в процессах отдаленной гибридизации, мы использовали модель ржано-пшеничных амфилоидов секалотритикум двух видов (секалотритикум Верасень \times Михась и Верасень \times Дубрава), которые являются гибридами между тетраплоидной рожью сорта Верасень (RRRR, $2n=4x=28$) и гексаплоидными тритикале сортов Михась и Дубрава (AABBRR, $2n=6x=42$). Результаты цитогенетического анализа показали, что кариотипы используемых в исследовании секалотритикум являются стабильными (RRAABB, $2n = 6x = 42$) и не содержат мини-хромосом с делетированными плечами или участками плеч (Липихина и др., 2018).

В первую очередь, для определения степени участия родительских форм α и β CENH3 в рассматриваемых случаях отдаленной гибридизации, необходимо определить индивидуальные видовые особенности кодирующих нуклеотидных последовательностей α и β CENH3 для всех исследуемых видов. Последовательности α CENH3 для всех перечисленных видов ранее были секвенированы и проанализированы Липихиной Ю. А.

(Липихина и др., 2016). Для осуществления задач исследования, в данной работе было выполнено определение кодирующих нуклеотидных последовательностей *βCENH3* родительских форм, использованных при создании секалотритикум — ржи Верасень и тритикале Михась и Дубрава. Для этого с использованием суммарной РНК, выделенной из молодых листьев нескольких растений каждой из родительских форм, была синтезирована кДНК, и с использованием метода клонирования было выполнено по 8 индивидуальных сиквенсов *βCENH3*.

Анализ кодирующих нуклеотидных последовательностей *βCENH3* выявил высокий уровень нуклеотидной идентичности кодирующих последовательностей этого гена у родительских форм секалотритикум (Рисунок 4).

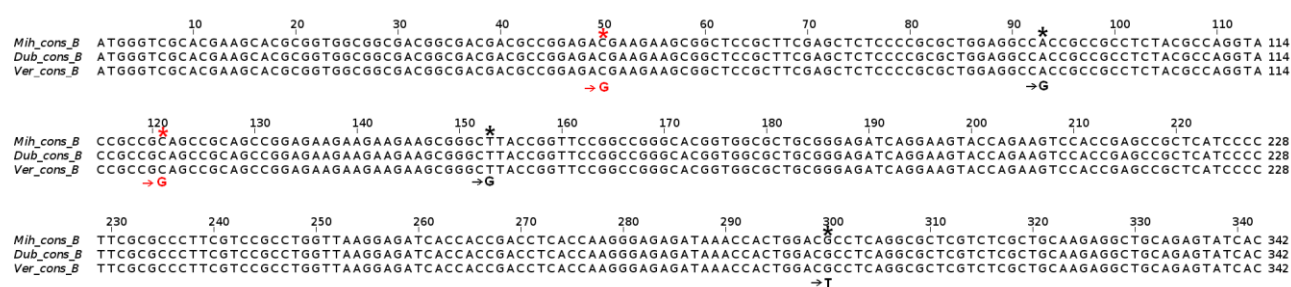


Рисунок 4. Выравнивание консенсусных нуклеотидных последовательностей *βCENH3* родительских видов секалотритикум — тетраплоидной ржи Верасень и тритикале Михась и Дубрава. Звездочками отмечены вариабельные позиции, в которых неоднократно встречались замены нуклеотидов, красным цветом выделены замены, ведущие к смене аминокислоты

Таблица 4. Нуклеотидный полиморфизм в последовательностях *βCENH3* (количество SNP на позиции в % от числа секвенированных клонов).

Образец	Позиция в нуклеотидной последовательности				
	50*	93	121*	153	300
Рожь Верасень (RRRR, 2n = 28)	25	38	13	17	13
Тритикале Михась (AABBRR, 2n = 42)	25	17	33	33	25
Тритикале Дубрава (AABBRR, 2n = 42)	13	13	25	25	25

* - несинонимичные замены

Регулярные замены нуклеотидов были обнаружены всего на пяти позициях, которые совпадали у всех исследованных видов. Две из них являются несинонимичными — нуклеотидная замена на 50 позиции ORF ведет к смене аминокислоты треонина на лизин, а замена на 121 позиции ORF приводит к смене аминокислотного остатка глутамина на глутаминовую кислоту. Частота замен в % соотношении указана в Таблице 4. Такие же замены на тех же позициях встречаются и у видов ржи (Evtushenko et al., 2017), хотя в данном случае именно последовательности с несинонимичными заменами соответствуют преобладающему большинству ржаных форм *βCENH3*. Все секвенированные последовательности *βCENH3* можно отнести к варианту *βCENH3-v1*, последовательности, соответствующие второму варианту этого гена, не были обнаружены. Исходя из проведенного анализа нуклеотидных последовательностей, можно заключить, что из-за большой степени нуклеотидной идентичности последовательностей и совпадения сайтов однонуклеотидного полиморфизма, выявить отличительные признаки в молекулярной структуре *βCENH3* для отнесения β-формы к тому или другому родительскому виду не представляется возможным.

Выявление транскрипционного профиля различных форм *CENH3* в вегетативных и генеративных тканях ржано-пшеничных амфиплоидов *Secalotriticum* и их родительских видов

Для определения профилей экспрессии *αCENH3* и *βCENH3* в различных тканях двух форм ржано-пшеничных гибридов секалотритикум Верасень × Михась и Верасень × Дубрава, их материнской формы — ржи Верасень, и отцовских растений — тритикале Михась и Дубрава, был использован метод RT-PCR с интеркалирующим красителем SYBR Green I. Программа и условия проведения реакций в ходе данной части исследования использовались те же, что были подобраны для определения уровней относительной экспрессии *αCENH3* и *βCENH3* в различных тканях ржи Imperial. Нуклеотидное выравнивание последовательностей праймеров, используемых для амплификации различных вариантов *CENH3* ржи, с сиквенсами последовательностей *αCENH3* и *βCENH3* секалотритикум и их родительских видов показало, что данные праймеры полностью соответствуют определяемым последовательностям и могут быть использованы для амплификации *αCENH3* и *βCENH3* на данном этапе исследования. Для каждой пары праймеров индивидуально для каждого исследуемого вида, на сериях пятикратных разведений кДНК была определена эффективность реакции, которая затем использовалась в расчетах.

На образцах тетраплоидной ржи Верасень было проведено сравнение результатов RT-PCR анализа относительной экспрессии α CENH3 и β CENH3 с использованием нормализации к уровню экспрессии одного референсного гена (*Ta2776*) или среднему геометрическому от уровней транскрипции трех (*Ta2776*, *Ta54227*, *Ta53967*) референсных генов. Сравнение показало, что относительные уровни экспрессии α CENH3 и β CENH3 имеют практически идентичный профиль во всех тканях (Рисунок 5). Исходя из этого, для оптимизации дальнейшей работы в расчетах использовалась нормализация уровней транскрипции генов α CENH3 и β CENH3 к уровню транскрипции референсного гена *Ta2776*.

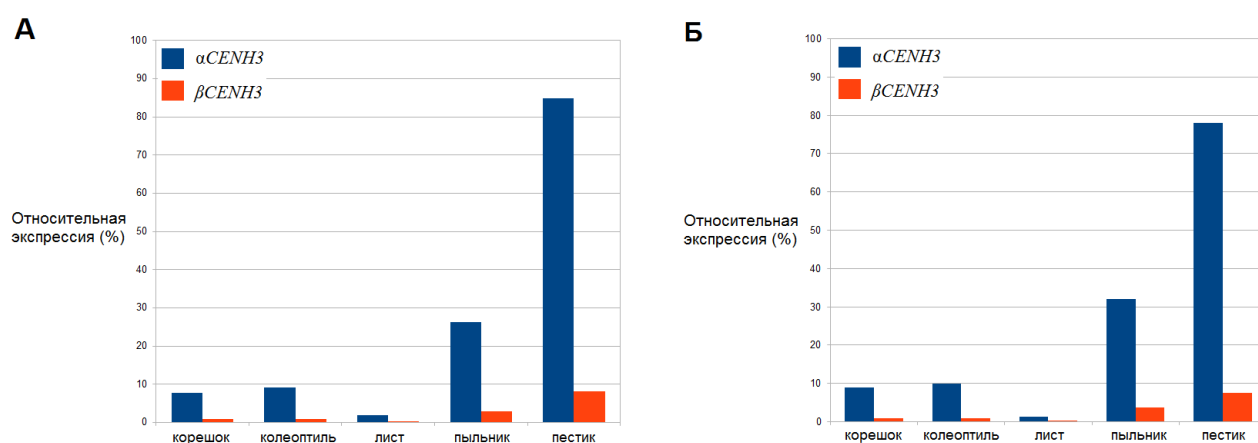


Рисунок 5. Сравнение уровней транскрипции α CENH3 и β CENH3 в тканях корешков проростков, coleoptилей, молодых листьев, пыльников и пестиков тетраплоидной ржи Верасень. Уровни транскрипции α CENH3 и β CENH3 нормализованы к среднему геометрическому от уровней транскрипции трех референсных генов - *Ta2776*, *Ta54227*, *Ta53967* (А) и к уровню экспрессии одного референсного гена - *Ta2776* (Б)

Для гибридов секалотритикум и их родительских видов уровни транскрипции были определены в следующих вегетативных тканях: корешках проростков (на 3 день прорастания), coleoptилях (на 4-5 день прорастания), молодых листьях (на стадии третьего листа), и в генеративных тканях: пыльниках (на стадии между мейозом и развитием зрелой пыльцы) и пестиках. Для каждого из исследуемых видов было получено от 3 до 6 биологических образцов каждой ткани. В каждом биологическом образце был объединен материал от 5 разных растений. Результаты измерений уровней относительной экспрессии приведены в таблице 5.

В результате проведенных экспериментов было показано, что оба варианта гена центрального гистона H3, α CENH3 и β CENH3, экспрессируются в тканях корешков проростков, coleoptилей и листьев (вегетативных тканях), пыльников и пестиков (генеративных тканях) как у двух вариантов секалотритикум Верасень \times Михась и Верасень \times Дубрава, так и у их родительских видов (рожь Верасень, тритикале Михась и

Дубрава), причем профили транскрипции генов $\alpha CENH3$ и $\beta CENH3$ в различных тканях практически идентичны при сравнении двух вариантов секалотритикум (Рисунок 6). Значительных отличий в уровнях экспрессии $\alpha CENH3$ и $\beta CENH3$ между родительскими видами и гибридами секалотритикум не выявлено. Как отражено на диаграммах, в вегетативных тканях после прорастания наблюдается значительное снижение уровней экспрессии обеих форм $CENH3$ в ткани листьев по сравнению с тканью корешков проростков и колеоптилей (в среднем в 8 раз). В тканях корешков проростков и колеоптилей как $\alpha CENH3$, так и $\beta CENH3$ транскрибируются примерно на одном уровне во всех видах. Уровни экспрессии обеих форм многократно увеличиваются в генеративной ткани по сравнению с вегетативной: максимальные уровни транскрипции у всех видов наблюдаются в ткани пестиков, а минимальные — в ткани листьев. В ткани пестиков экспрессия обеих форм в 2-3 раза выше, чем в ткани пыльников.

Важным результатом является то, что во всех исследованных тканях, как у родительских видов, так и у видов секалотритикум, уровень экспрессии $\alpha CENH3$, как правило, на порядок превышает уровень экспрессии $\beta CENH3$. В целом, полученные значения уровней относительной экспрессии соответствуют результатам, полученным для разных тканей ржи 'Imperial'. Однако, во всех тканях ржи Империял относительная экспрессия $\beta CENH3$ выше, чем у секалотритикум. Можно предположить, что такой результат связан с экспрессией $\beta CENH3-v2$ варианта, который описан для ржи Империял, но не был обнаружен у ржи Верасень и тритикале Михась и Дубрава.

Исходя из полученных результатов можно заключить, что в геноме стабильных гибридов секалотритикум активность генов $CENH3$ сохраняется на том же уровне, что и у родительских видов, то есть гибридная цитоплазма не оказывает влияния на данный показатель.

Таблица 5. Уровни относительной экспрессии α CENH3 и β CENH3 нормализованные к уровню транскрипции референсного гена Ta2776 и отношение транскрипции α CENH3 и β CENH3 в вегетативных и генеративных тканях растений секалотритикум Верасень \times Михась (Str V \times M) и родительских видов (рожь Верасень, тритикале Михась) (**А**) и растений секалотритикум Верасень \times Дубрава и родительских видов (рожь Верасень, тритикале Дубрава) (**Б**).

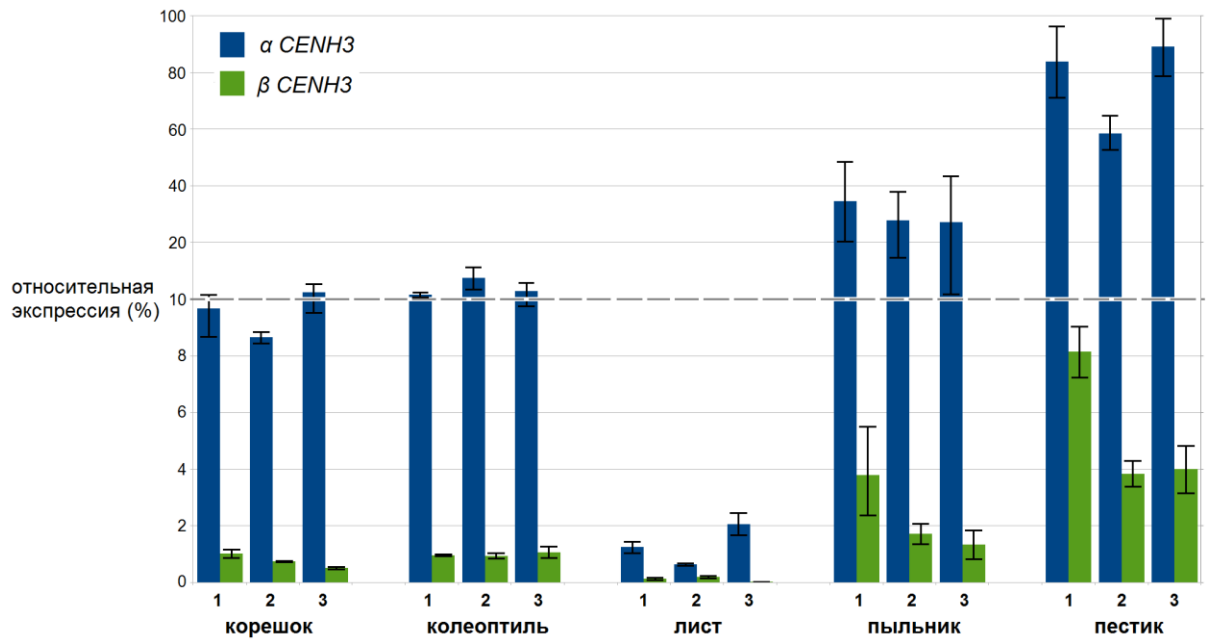
А

ткань	растение	экспрессия α CENH3 (%)	экспрессия β CENH3 (%)	α CENH3/ β CENH3
корешки проростков	рожь Верасень	9,68	1,04	9,3
	тритикале Михась	8,64	0,74	11,6
	секалотритикум В \times М	11,1	0,52	21,4
колеоптиль	рожь Верасень	10,67	0,97	11,0
	тритикале Михась	13,64	0,94	14,6
	секалотритикум В \times М	11,27	1,12	10,1
лист	рожь Верасень	1,29	0,15	8,7
	тритикале Михась	0,64	0,21	3,1
	секалотритикум В \times М	2,03	0,04	57,8
пыльник	рожь Верасень	34,48	3,92	8,8
	тритикале Михась	27,81	1,72	16,1
	секалотритикум В \times М	27,05	1,35	20,0
пестик	рожь Верасень	83,94	8,16	10,3
	тритикале Михась	58,75	3,86	15,2
	секалотритикум В \times М	89,20	4,01	22,2

Б

ткань	растение	экспрессия α CENH3 (%)	экспрессия β CENH3 (%)	α CENH3/ β CENH3
корешки проростков	рожь Верасень	9,68	1,04	9,3
	тритикале Дубрава	12,50	1,22	10,2
	секалотритикум В \times Д	12,20	0,65	18,6
колеоптиль	рожь Верасень	10,67	0,97	11,0
	тритикале Дубрава	15,69	1,10	14,3
	секалотритикум В \times Д	21,10	0,65	32,2
лист	рожь Верасень	1,29	0,15	8,7
	тритикале Дубрава	2,14	0,22	9,9
	секалотритикум В \times Д	1,59	0,11	14,8
пыльник	рожь Верасень	34,48	3,92	8,8
	тритикале Дубрава	29,38	1,78	16,5
	секалотритикум В \times Д	46,24	2,57	18,0
пестик	рожь Верасень	83,94	8,16	10,3
	тритикале Дубрава	77,21	4,56	16,9
	секалотритикум В \times Д	89,93	4,27	21,1

А



Б

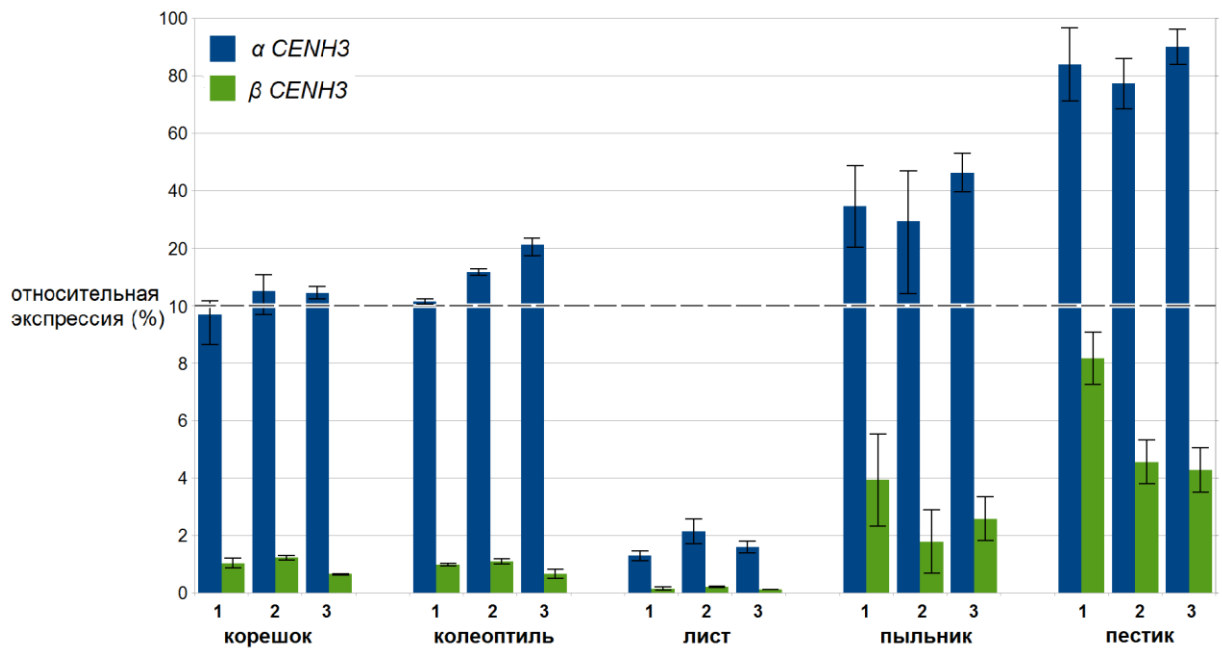


Рисунок 6. Нормализованные уровни транскрипции α CENH3 и β CENH3 в тканях корешков проростков, coleoptилей, молодых листьев, пыльников и пестиков растений секалотритикум Верасень \times Михась (3) и его родительских видов - ржи Верасень (1) и тритикале Михась (2) (А) и растений секалотритикум Верасень \times Дубрава (3) и его родительских видов - ржи Верасень (1) и тритикале Дубрава (2) (Б). За 100% взято максимальное значение экспрессии α CENH3 полученное для в образца ткани пестиков ржи Верасень

Выводы

1. Проведена оптимизация системы RT-PCR для оценки уровней относительной экспрессии генов α CENH3 и β CENH3 ржи. Выбраны подходящие для объекта референсные гены, подобраны праймеры для двух форм CENH3, оптимизированы концентрации матрицы и праймеров, условия реакции.

2. Определены профили относительной экспрессии α и β форм центромерного гистона H3 на отдельных стадиях развития культивируемой ржи *S. cereale* сорта Imperial. Показано, что обе формы экспрессируются во всех исследованных вегетативных и генеративных тканях ржи (тканях корешков проростков, колеоптилей, листьев, стеблей, пыльников, пестиков, развивающегося зерна).

3. Профили экспрессии α CENH3 и β CENH3 схожи в ходе онтогенеза ржи Империял. После прорастания наблюдается снижение уровней экспрессии и α CENH3, и β CENH3, минимальные значения уровней экспрессии наблюдаются в вегетативной ткани листьев кустящихся растений. Уровни экспрессии обеих форм резко возрастают в генеративной ткани, и достигают максимума в ткани пестиков, а затем в процессе развития зерна снова начинают снижаться.

4. Во всех тканях ржи Империял экспрессия α CENH3 превышает экспрессию β CENH3 в несколько раз, но это отношение варьирует в зависимости от типа ткани (от 1,7 раза в ткани стеблей до 17,6 раза в ткани листьев кустящихся растений), что может отражать тканеспецифичные потребности в этих формах.

5. Определены нуклеотидные последовательности β CENH3 родительских форм гибридов секалотритикум — тетраплоидной ржи Верасень и гексаплоидных тритикале Михась и Дубрава. Анализ нуклеотидных последовательностей выявил высокую степень идентичности структуры β CENH3 у этих злаков. Определено 5 сайтов однонуклеотидного полиморфизма, которые присутствуют в последовательностях β CENH3 у всех родительских видов. Все секвенированные последовательности можно отнести к варианту β CENH3-v1.

6. Определены профили транскрипции α CENH3 и β CENH3 в вегетативных и генеративных тканях двух ржано-пшеничных амфиплоидов секалотритикум (Верасень × Михась и Верасень × Дубрава), их материнской формы (ржи Верасень) и отцовских форм (тритикале Михась и Дубрава). Профили транскрипционной активности α CENH3 и β CENH3 идентичны у родительских видов и гибридов секалотритикум. В вегетативных тканях после прорастания уровни транскрипции как α CENH3, так и β CENH3, значительно снижаются, а затем многократно увеличиваются в генеративных тканях по сравнению с вегетативными. Во всех исследованных тканях уровень экспрессии α CENH3, как правило,

на порядок превышает уровень экспрессии β CENH3. Активность обоих генов CENH3 стабильных гибридов секалотритикум сохраняется на том же уровне, что и у родительских видов, то есть гибридная цитоплазма не оказывает влияния на данный показатель.

Список публикаций по теме работы

Статьи в журналах из перечня ВАК

1. Евтушенко Е.В., Гаськов Д.Ю., Гацкая С.С., Вершинин А.В. Вариабельность структуры центромерного гистона H3 и филогения рода *Secale*. *Цитология*. 2016; 58(4):320-323.

2. Липихина Ю.А., Евтушенко Е.В., Гацкая С.С., Стёпочкин П.И., Люсиков О.М., Гордей И. А., Вершинин А.В. Проявление активности гена центромерного гистона H3 у аллополиплоидных гибридов пшеницы и ржи. *Цитология*. 2016; 58(4): 324-329.

3. Evtushenko E.V., Elisafenko E.A., Gatzkaya S.S., Lipikhina Y.A., Houben A., Vershinin A.V. Conserved molecular structure of the centromeric histone CENH3 in *Secale* and its phylogenetic relationships. *Scientific Reports* 2017; 7(1): 17628.

4. Gatzkaya S.S., Evtushenko E.V. Patterns of nucleotide diversity for different domains of centromeric histone H3 (CENH3) gene in *Secale L.* *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019; 23(2):135-139

Статьи в других рецензируемых научных изданиях

5. Gatzkaya S.S., Evtushenko E.V., Vershinin A.V. Expression profile of two CENH3 genes in different tissues of the *Secale Cereale* Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology Proceedings of the Fifth International Scientific Conference PlantGen2019. 2019; 238-240.

Тезисы конференций

1. Липихина Ю.А., Гацкая С.С. Сравнительный анализ молекулярной структуры центромерного варианта гистона H3 (CENH3) у тритикале различного происхождения и уровня плоидности // Международная конференция Хромосома 2015. Новосибирск, 2015. С. 116-118.

2. Evtushenko E.V., Gatskaya S.S., Lipikhina Yu.A., Houben A., and Vershinin A.V. The molecular structure and interspecies variation of CENH3 genes in the *Secale* genus // International conference Chromosome 2015. Novosibirsk, 2015. P. 20-21.

3. Вершинин А.В., Евтушенко Е.В., Липихина Ю.А., Гацкая С.С., Гордей И.А., Люсиков О.М., Степочкин П.И., Емцева М.В. Молекулярные особенности структуры центромерных белков у аллополиплоидных гибридов злаков // II Международная научная

конференция "Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы". Минск, 2015. С. 22.

4. Evtushenko E.V., Elisafenko E.A., Gatzkaya S.S., Lipikhina Y.A., Houben A., Vershinin A.V. Characterization of the centromeric histone H3 (CENH3) in genus *Secale* and its phylogenetic relationships // Международная конференция «Беляевские чтения». Новосибирск, 2017. С 214.

5. Evtushenko E.V., Elisafenko E.A., Gatzkaya S.S., Lipikhina Y.A., Shubert V., Houben A., Vershinin A.V. Evolutionary dynamics of the centromeric histone CENH3 within the tribe Triticeae // Международная конференция Хромосома 2018. Новосибирск, 2018. С. 20-21.

6. Gatzkaya S.S., Evtushenko E.V., Vershinin A.V. Tissue-dependent transcription of the rye centromeric histone CENH3 variants // Международная конференция Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2019). Новосибирск, 2019. С. 76

Список литературы

1. Allshire RC, Karpen GH. Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks?. *Nat Rev Genet.* 2008; 9(12):923-937.
2. Cheeseman IM, Desai A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(1):33-46.
3. Evtushenko EV, Elisafenko EA, Gatzkaya SS, Lipikhina YA, Houben A, Vershinin AV. Conserved molecular structure of the centromeric histone CENH3 in *Secale* and its phylogenetic relationships. *Sci Rep.* 2017;7(1):17628.
4. Henikoff S, Ahmad K, Malik HS. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science.* 2001;293(5532):1098-1102.
5. Ishii T, Karimi-Ashtiyani R, Banaei-Moghaddam AM, Schubert V, Fuchs J, Houben A. The differential loading of two barley CENH3 variants into distinct centromeric substructures is cell type- and development-specific. *Chromosome Res.* 2015;23(2):277-284.
6. Lermontova I, Schubert V, Fuchs J, Klatte S, Macas J, Schubert I. Loading of *Arabidopsis* centromeric histone CENH3 occurs mainly during G2 and requires the presence of the histone fold domain. *Plant Cell.* 2006;18(10):2443-2451.
7. Maheshwari S, Ishii T, Brown CT, Houben A, Comai L. Centromere location in *Arabidopsis* is unaltered by extreme divergence in CENH3 protein sequence. *Genome Res.* 2017;27(3):471-478.
8. Malik HS, Henikoff S. Adaptive evolution of Cid, a centromere-specific histone in *Drosophila*. *Genetics.* 2001;157(3):1293-1298.
9. Malik HS, Henikoff S. Major evolutionary transitions in centromere complexity. *Cell.* 2009;138(6):1067-1082.
10. Moraes IC, Lermontova I, Schubert I. Recognition of *A. thaliana* centromeres by heterologous CENH3 requires high similarity to the endogenous protein. *Plant Mol Biol.* 2011;75(3):253-261.
11. Nagaki K, Cheng Z, Ouyang S, et al. Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nat Genet.* 2004;36(2):138-145.
12. Paolacci A.R., Tanzarella O.A., Porceddu E., Ciaffi M. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology.* 2009; 10:11.
13. Sanei M, Pickering R, Kumke K, Nasuda S, Houben A. Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(33):E498-E505.
14. Talbert PB, Bryson TD, Henikoff S. Adaptive evolution of centromere proteins in plants and animals. *J Biol.* 2004;3(4):18.
15. Talbert PB, Masuelli R, Tyagi AP, Comai L, Henikoff S. Centromeric localization and adaptive evolution of an *Arabidopsis* histone H3 variant. *Plant Cell.* 2002;14(5):1053-1066.
16. Yuan J, Guo X, Hu J, Lv Z, Han F. Characterization of two CENH3 genes and their roles in wheat evolution. *New Phytol.* 2015;206(2):839-851.
17. Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research.* 1974;14:415 – 421.
18. Zhong CX, Marshall JB, Topp C, et al. Centromeric retroelements and satellites interact with maize kinetochore protein CENH3. *Plant Cell.* 2002;14(11):2825-2836.
19. Липихина Ю.А., Евтушенко Е.В., Гацкая С.С., Стёпочкин П.И., Люсиков О.М., Гордей И. А., Вершинин А.В. Проявление активности гена центромерного гистона H3 у аллополиплоидных гибридов пшеницы и ржи. *Цитология.* 2016; 58.(4):324-329.
20. Липихина Ю.А., Евтушенко Е.В., Люсиков О.М., Гордей И.С., Гордей И.А., Вершинин А.В. Ржано-пшеничные амфилоиды секалотритикум — новая модель для изучения активности генов центромерного белка CENH3. *Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр.* 2018; 25:15-22.

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Гацкая Сима Сергеевна

Проверяющий: Новопашина Дарья Сергеевна (danov@niboch.nsc.ru / ID: 7007712)

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <https://users.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 10
 Начало загрузки: 10.09.2020 07:03:57
 Длительность загрузки: 00:00:08
 Имя исходного файла: научный доклад Гацкой СС.pdf
 Название документа: научный доклад Гацкой СС
 Размер текста: 1 кБ
 Символов в тексте: 41835
 Слов в тексте: 5330
 Число предложений: 387

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
 Начало проверки: 10.09.2020 07:04:06
 Длительность проверки: 00:00:02
 Комментарии: не указано
 Модули поиска: Цитирование, Модуль поиска Интернет



ЗАИМСТВОВАНИЯ

9,55%

САМОЦИТИРОВАНИЯ

0%

ЦИТИРОВАНИЯ

0%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

90,45%

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
 Самоцитирования — доля фрагментов текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа, по отношению к общему объему документа.
 Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
 Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
 Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
 Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
 Заимствования, самоцитирования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.
 Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска
[01]	0,02%	Duplication and Adaptive Evolution of a Key Centromeric Protein in <i>Mimulus</i> , a Genus ...	https://doi.org	24 Июл 2019	Модуль поиска Интернет
[02]	0,87%	Статья	http://tsitologiya.cytspb.rssi.ru	03 Ноя 2018	Модуль поиска Интернет
[03]	0%	Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chro...	https://doi.org	02 Сен 2018	Модуль поиска Интернет
[04]	1,01%	Plant centromeres	https://doi.org	11 Мая 2018	Модуль поиска Интернет
[05]	0,3%	https://eprints.ucm.es/54602/1/5329974699.pdf	https://eprints.ucm.es	12 Мар 2020	Модуль поиска Интернет
[06]	1,14%	С.С. Гацкая, Е.В. Евтушенко Паттерны нуклеотидного разнообразия различных до...	http://bionet.nsc.ru	21 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[07]	0,87%	The differential loading of two barley CENH3 variants into distinct centromeric substruc...	https://doi.org	02 Сен 2018	Модуль поиска Интернет
[08]	0,26%	Total centromere size and genome size are strongly correlated in ten grass species	https://doi.org	08 Фев 2020	Модуль поиска Интернет
[09]	0,42%	не указано	https://doi.org	18 Окт 2019	Модуль поиска Интернет
[10]	1,58%	Публикации и материалы конференций Лаборатории молекулярной генетики И...	http://mcb.nsc.ru	22 Янв 2020	Модуль поиска Интернет
[11]	1,12%	Maize NDC80 is a constitutive feature of the central kinetochore	https://doi.org	28 Июл 2018	Модуль поиска Интернет
[12]	0,3%	The Kinetochore: Volume 6 Evolution of Centromeres and Kinetochores: A Two-Part ...	https://doi.org	08 Фев 2020	Модуль поиска Интернет
[13]	0%	Frontiers CenH3: An Emerging Player in Haploid Induction Technology Plant Science	https://frontiersin.org	17 Мар 2020	Модуль поиска Интернет
[14]	0,64%	Alpha satellite DNA variation and function of the human centromere	https://doi.org	11 Мая 2018	Модуль поиска Интернет
[15]	0,75%	Полный текст (1/2)	https://istina.msu.ru	19 Мая 2020	Модуль поиска Интернет
[16]	0,26%	https://eprints.ucm.es/58483/1/Pecinka,%20A.%20et%20al.%202019.%20Chromatin%20...	https://eprints.ucm.es	12 Мар 2020	Модуль поиска Интернет
[17]	0%	historical and modern perspective on plant cytogenetics Briefings in Functional Geno...	https://academic.oup.com	19 Апр 2020	Модуль поиска Интернет
[18]	0%	Fertilization and Uniparental Chromosome Elimination during Crosses with Maize Hapl...	https://ncbi.nlm.nih.gov	17 Мар 2020	Модуль поиска Интернет

[19]	0%	PDF Full-text	http://mdpi.com	17 Ноя 2017	Модуль поиска Интернет
[20]	0%	Genetic diversity and population structure of Musa accessions in ex situ conservation ...	https://bmcpantbiol.biomedcent	23 Апр 2020	Модуль поиска Интернет

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

Отчет о проверке текста научно-квалификационной работы на
объем заимствования

Гацкая Сима Сергеевна

«Структура и экспрессия основных форм центромерного гистона CENH3 у
ржи, пшеницы и их гибридов»

Оригинальность работы составляет ___90.45___ %, что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.х.н. Д.С. Новопашина