

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ М. И. Гладышев
подпись

« ____ » _____ 2017 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Исследование кариотипа гольяна Чекановского *Rhynchocypris czekanowskii*
Dybowski, 1869 (Cypriniformes: Cyprinidae)
06. 04. 01. Биология
06. 04. 01. 04 Гидробиология и ихтиология

Научный руководитель	_____	доцент, канд. биол. наук	И. В. Зуев
	подпись, дата	должность, ученая степень	
Выпускник	_____		Е. В. Лазуто
	подпись, дата		
Рецензент	_____	доцент, канд. биол. наук	Т. А. Зотина
	подпись, дата	должность, ученая степень	

Красноярск 2017

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Исследование кариотипа гольяна Чекановского *Rhynchocypris czekanowskii* Dybowski, 1869 (Cypriniformes: Cyprinidae)» содержит 47 страниц текстового документа, 78 использованных источников (35 русско-, 43 англоязычных), 11 рисунков, 3 таблицы.

ГОЛЬЯН ЧЕКАНОВСКОГО, КАРИОТИП, ХРОМОСОМЫ, КАРПОВЫЕ.

Основной объект исследования - гольян Чекановского *Rhynchocypris czekanowskii* Dybowski, 1869.

Задачи исследования:

- Подбор оптимальной методики цитогенетического анализа для гольяна Чекановского;
- Определение числа, типов и размеров хромосом данного вида рыб;
- Сравнение особенностей кариотипа гольяна Чекановского с кариотипами близкородственных видов семейства карповых.

В ходе работы протестировано 6 методик изготовления препаратов хромосом гольяна Чекановского, из которых наилучшие результаты показала адаптированная для рыб методика изучения кариотипа мелких млекопитающих, разработанная в Лаборатории экологического мониторинга регионов АЭС и биоиндикации ИПЭЭ РАН.

Впервые, на примере популяции из бассейна р. Енисей, получены сведения о кариотипе гольяна Чекановского. Выявленная хромосомная формула ($14 m + 30 sm + 6 st$), соответствует общей тенденции распределения хромосом у близкородственных видов гольянов. Обнаруженные в кариотипе гольяна Чекановского хромосомы–маркеры позволяют судить о наибольшей филогенетической близости вида с гольяном озерным *Rhynchocypris percunurus* (Pallas, 1814).

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	6
1.1. Основные этапы цитогенетического анализа рыб.....	6
1.1.1. Введение ингибитора веретена делений.....	7
1.1.2. Извлечение тканей и гипотоническая обработка	7
1.1.3. Фиксация и центрифугирование	8
1.1.4. Нанесение капель клеточной суспензии на предметное стекло и виды окрашивания кариологического материала	9
1.1.5. Микроскопирование и анализ хромосомного набора	12
1.1.6. Модификации методов кариологического анализа.....	14
1.2. Современное представление об ихтиологической кариологии	16
1.3. Особенности кариотипа карповых рыб	19
Глава 2. Материалы и методы исследования	20
Глава 3. Результаты исследования	25
3.1. Подбор оптимальной методики кариологического анализа рыб. Ошибка! Загла	
3.2. Кариологический анализ гольяна Чекановского <i>Rhynchocypris czekanowskii</i> Dybowski, 1869	29
Глава 4. Обсуждение результатов	26
Заключение	26
Список использованных источников	39

ВВЕДЕНИЕ

Гольян Чекановского *Rhynchocypris czekanowskii* Dybowski, 1869 (сем. Cyprinidae) является типичным представителем фауны мелких непромысловых рыб Азии, играющим существенную роль в биоценозах как объект питания и конкурент за пищевые ресурсы ценных промысловых видов рыб (Вышегородцев, 2000; Зуев, 2007; Решетников, 2003). Сравнительно с прочими евразийскими видами гольянов (речным, озерным и Лаговского), данный вид остается наименее изученным (Зуев и др., 2016).

Появление новейших методов цитологического и генетического анализа привело к росту интереса в изучении рыб, в том числе, представителей рода *Phoxinus (Rhynchocypris)* Rafinesque, 1820, позволяя сопоставлять данные по генетической и морфологической изменчивости, уточнять таксономический статус (Boron et al., 1997; Boron, 2001; Goddard et al., 1998; Joswiak et al., 1985; Kang et al., 2000; Lee, 1987; Rab, 2008; Sakai et al., 2006; Sola et al., 1979; Song, Park, 2005; Stasiak et al., 1988; Takai, Ojima, 1984).

Вместе с тем, существующие публикации результатов цитогенетического исследования отдельных видов гольянов (Boron et al., 1997; Boron, 2001; Cataudella et al., 1977; Goddard et al., 1998; Joswiak et al., 1985; Kang et al., 2000; Lee, 1987; Sakai et al., 2006; Sola et al., 1979; Stasiak et al., 1988; Takai, Ojima, 1984) не дают полного представления о таксономической организации всего рода, что оставляет гольянов в статусе одной из наименее изученных групп рыб.

Для речного и озерного гольянов данные по кариотипам известны и могут быть применены в установлении филогенетических связей, определении систематической принадлежности вида без применения остеологического и морфологического видов анализа (Boron et al., 1997; Boron, 2001; Sakai et al., Sola et al., 1979). Для гольяна Чекановского цитогенетические данные немногочисленны (Ito et al., 2002; Sakai et al., 2006), в то же время, данные по кариотипу вида вовсе не известны.

Таким образом, научный интерес приобретает цитогенетическое исследование гольяна Чекановского, которое позволит дополнить общую базу знаний о роде *Phoxinus (Rhynchocypris)* в целом.

Цель исследования – изучение кариотипа гольяна Чекановского *Rhynchocypris czekanowskii* Dybowski, 1869 из популяций в бассейне р. Енисей.

Задачи исследования:

- Подбор оптимальной методики цитогенетического анализа для гольяна Чекановского;
- Определение числа, типов и размеров хромосом данного вида рыб;
- Сравнение особенностей кариотипа гольяна Чекановского с кариотипами близкородственных видов семейства карповых.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Основные этапы цитогенетического анализа рыб

Применение кариологии как области изучения генетической характеристики биоты достаточно велико. Характеристика кариотипа используется в ихтиологических работах по уточнению систематического положения вида (Боркин, 2013; Васильева, 2011б; Романь, 2013; Arai, 2011; Bianco, 2004; Esmaeili, 2009; Singh, 2013). По кариологическим данным возможна идентификация межвидовых гибридов (Апаликова, 2011; Васильева, 2012; Полякова, 2015; Праздников, 2013б). В селекционных работах анализ кариотипов необходим при проведении отдаленной гибридизации и разработке специальных генетических методов селекции (Левенкова, 2013). Цитогенетический контроль развивающихся эмбрионов используют при получении потомства заводским способом. Также кариология позволяет изучить различные хромосомные аберрации с последующим их устранением для предотвращения различных болезней (Vicari, 2010).

Кариология как область хромосомного анализа позвоночных развилась относительно недавно (1950-е отмечены годами прогресса в приготовлении хромосомных препаратов). Методики по изучению кариотипа подвергаются различным модификациям, зависящим от специфических характеристик объекта и целей исследования (Крысанов, 2009; Васильев, 1985; Орлов, 1976; Bertollo, 2015; Deng, 2003; Knytl, 2013; Pukhtayevych, 2014; Volker, 2015a; Volker, 2015б). Вместе с тем, стоит отметить, что основа всех модификаций следует из стандартных методик кариологического анализа.

На данный момент существует несколько стандартных методик анализа хромосом. При изучении кариотипа рыб используют 2 основных метода (Bertollo, 2015; Pukhtayevych, 2014):

- Анализ хромосом из тканей почек, жаберного эпителия и др. (см. 1.1.2 Извлечение тканей) *in vivo*;

- Анализ хромосом из тканей почек, жаберного эпителия и др. *in vitro*.

Большинство исследователей используют метод *in vivo* (Крысанов, 2009; Романь, 2013; Полякова, 2015; Vicari, 2010; Pukhtayevych, 2014; Volker, 2015a; Volker, 2015b). Основу данного метода составляют 9 стадий (с дополнительными действиями, например, гомогенизацией тканей, охлаждением стекол). Стоит отметить, что метод *in vitro* практически идентичен методу *in vivo*, отличие заключается в порядке введения ингибитора. При анализе *in vitro* введение ингибитора осуществляется не в живой объект исследования, а в извлеченную гомогенизированную ткань (Орлов, 1976).

1.1.1. Введение ингибитора веретена делений

В качестве ингибитора для блокировки сборки микротрубочек в основном применяется алкалоид колхицин. Действие данного препарата заключается в остановке деления клетки на стадии метафазы, при последующем разрушении веретена деления (Васильев, 1985; Воробьев, 1985; Назаренко, 2009; Сало, 2008; Сорочинский, 1994; Gold, 1990; Pukhtayevych, 2014).

Так же в качестве ингибиторов используются некоторые другие алкалоиды-аналоги колхицина: колхамин – вещество, синтезированное на ряду с колхицином из растений рода *Colchicum* (Сало, 2008), колцемид – синтетический аналог колхицина с менее сильным воздействием на скорость разрушения микротрубочек (Васильев, 1985).

К числу ингибиторов веретена деления можно отнести доцетаксел и винбластин, но в основном данные препараты используются в медицинских целях (Васильев, 1985).

1.1.2. Извлечение тканей и гипотоническая обработка

В кариологическом анализе, как правило, в качестве исследуемого материала используют ткань с наибольшей митотической активностью. При исследовании кариотипа рыб в большинстве случаев используют ткани почек или жаберный эпителий (или обе ткани при маленьком размере объекта исследования), но так же прибегают к анализу тканей печени, селезёнки, эпителия роговицы глаза, кишечника и плавников (Gold, 1990; Pukhtayevych, 2014).

Основываясь на некоторых свойствах клеточной мембраны, а именно полупроницаемости, необходимо в ходе анализа осуществить гипотоническую обработку гомогенизированных тканей. В большинстве работ (Алексеев, 2005; Pukhtayevych, 2014; Singh, 2013) для разрушения клеточных стенок исследователи в области кариологии используют раствор хлорида кальция.

1.1.3. Фиксация и центрифугирование

При фиксации суспензии клеток исследуемой ткани используется фиксатор Кларка. Данный раствор состоит из 70 %-ого этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1 (Васильев, 1985; Воробьев, 1985; Крысанов, 2009; Назаренко, 2009; Сало, 2008; Сорочинский, 1994; Bertollo, 2015; Fish Karyome, 2014; Gold, 1990; Pukhtayevych, 2014). Допустима замена уксусной кислоты на пропионовую с аналогичным соотношением компонентов (3:1) (Алексеев, 2005; Pukhtayevych, 2014).

Действие фиксатора заключается в следующем: при охлаждении раствор образует кристаллическую массу, которая при проникновении в ткани вызывает их набухание, способствует сохранению формы хромосом и разрушению митохондрий и аппарата Гольджи (Алексеев, 2005; Pukhtayevych, 2014).

Центрифугирование используют для разделения частиц с разной скоростью осаждения в центробежном поле. Как правило, клеточную суспензию для получения клеточного осадка подвергают центрифугированию при 1200-1500 об/мин в течение 10 мин, но время данного процесса может

варьировать (Netto, 2007; Pukhtayevych, 2014). Стоит отметить, что метод, включающий центрифугирование, является базовым, но получение качественных препаратов возможно при исключении данного этапа анализа (см. 3.1. Подбор оптимальной методики кариологического анализа рыб).

1.1.4. Нанесение капель клеточной суспензии на предметное стекло и виды окрашивания кариологического материала

Этап нанесения готовой к окрашиванию клеточной суспензии некоторые авторы относят к одному из основных, т.к. от результатов данного действия зависят результаты дальнейшего анализа (Крысанов, 2009; Орлов, 1976; Bertollo, 2015; Fish Karyome, 2014; Pukhtayevych, 2014). Существуют рекомендации по нанесению суспензии (с расстояния 30 - 40 см, на подогретых или охлажденных предметных стеклах) (Морева, 2014; Fish Karyome, 2014) для обеспечения равномерного распределения материала по всему стеклу.

Для более подробного изучения полученного материала необходимым аспектом является качественная окраска препаратов.

Исходя из цели исследования, выделяют несколько видов окрашивания. Наиболее применяемыми являются рутинный и дифференциальный виды окрашивания хромосом (Romanenko, 2015; Sember, 2015; Ozouf-Costaz et al., 2015).

1) Рутинная окраска хромосом производится при использовании красителя Романовского-Гимза (азур-эозина) (Морева, 2014; Романь, 2013; Ozouf-Costaz et al., 2015). Данный тип окрашивания хромосомных препаратов позволяет охарактеризовать число и морфологию хромосом, выявить некоторые структурные нарушения: поломки, межхромосомные обмены с образованием дицентрических хромосом, крупные транслокации (Pukhtayevych, 2014).

2) При дифференциальной окраске препараты митотических хромосом обрабатываются флуоресцентными красителями (акрихиниприт и др.). При

наблюдении во флуоресцентный микроскоп обнаруживаются специфичные для каждой хромосомы полосы (*bands*). Данная методика окраски позволяет обнаруживать места расположения генов на определенных участках хромосом (Knytl, 2013; Ozouf-Costaz et al., 2015; Pukhtayevych, 2014; Vicari, 2010).

Выделяют несколько способов дифференциальной окраски хромосом:

а. *G-окраска* (от англ. Giemsa – Гимза) осуществляется с помощью обработки хромосомных препаратов слабым раствором трипсина с последующей окраской эозином. При этом наблюдается полосатая исчерченность хромосом, где темные полосы соответствуют гетерохроматиновым районам, а светлые – эухроматиновым. На G-окрашенных метафазных хромосомах выделяется около 320 сегментов на гаплоидный геном (Ozouf-Costaz et al., 2015). Преимущество метода заключается в том, что он не требует использования флуоресцентного микроскопа, окрашенные препараты можно хранить длительное время.

б. *R-окраска* (от англ. Reverse – обратная) отличается противоположностью рисунка при G-окраске: темноокрашенные полосы – эухроматиновые участки хромосом, светлые – гетерохроматиновые. (Ozouf-Costaz et al., 2015).

в. *Q-окраска* (от англ. Quinacrine – акрихин) осуществляется с помощью окраски хромосомных препаратов производными акридина – акрихин дигидрохлорида (атебрина) или акрихин-иприта. При использовании флуоресцентной микроскопии на хромосомах наблюдается чередование ярко-флюоресцирующих и темно-флюоресцирующих полос. Ярко-флюоресцирующие участки хромосом являются областями локализации повторяющихся гетерохроматиновых последовательностей ДНК, вариабельность которых не приводит к каким-либо фенотипическим изменениям (Ozouf-Costaz et al., 2015; Knytl, 2013).

г. *C-окраска* (от англ. Constitutive heterochromatin – конститутивный гетерохроматин) хромосомных препаратов производится при помощи красителя Гимза с предварительной обработкой препаратов. При обработке

применяется щелочь с последующей двухчасовой инкубацией препаратов в двукратном стандартном солевом растворе при 65°C. На готовых окрашенных препаратах наблюдаются темноокрашенные сегменты конститутивного гетерохроматина (участки сателлитной ДНК) в прицентромерных районах хромосом и слабоокрашенные эухроматиновые участки (Knytl, 2013).

Данный метод используется для уточнения характера хромосомных перестроек (Полякова, 2015; Knytl, 2013; Ozouf-Costaz et al., 2015; Sola, 1992; Vicari, 2010).

д. *T-окраска* (от англ. Telomere – теломера) хромосомных препаратов применяется для выявления теломерных районов хромосом в коротких и длинных плечах. Метод заключается в инкубации препаратов в растворе фосфатного буфера при pH 5,1 с последующей окраской раствором Гимза (Ozouf-Costaz et al.).

е. *NOR-окраска* (от англ. Nucleolar Organizer Region – ядрышкообразующие районы - ЯОР) или *Ag-окраска* (посеребрение) осуществляется с помощью окрашивания солями серебра. Данный тип окрашивания применяется для выявления ядрышкообразующих районов, расположенных в коротких плечах хромосом. Как известно, районы ядрышковых организаторов содержат гены рибосомальной РНК (рРНК). Ряды рРНК-транскрипционных единиц располагаются тандемно вдоль ДНК и отделяются друг от друга нетранскрибируемыми последовательностями (спейсерами). В настоящее время для визуализации этих районов на метафазных хромосомах применяют метод посеребрения Хоуэлла и Блэка (Born, 2000; Howell, 1980; Knytl, 2013). С помощью этого метода хромосомы окрашиваются в желтый цвет, а на коротких плечах акроцентрических хромосом на спутничных нитях наблюдаются черные точечные образования (глыбки) восстановленного металлического серебра. Размеры глыбок, отражающие активность ядрышкообразующих районов, на разных хромосомах варьируют (Howell, 1980; Ozouf-Costaz et al.).

ж. Метод *FISH-окраски* (fluorescent in situ hybridization) применяется для фиксированных клеток. Для окрашивания используют как чистые флюорохромы (акридиновый оранжевый и др.), так и флюорохромы, ассоциированные с определенными веществами (антитела в иммуноцитохимии, одноцепочечные комплементарные ДНК и ДНК-предшественники в цитогенетике). В результате под действием возбуждающего света определенной длины волны регистрируется флюоресценция тех или иных участков исследуемого материала (Esmaili, 2009; Singh, 2013; Полякова, 2015; Vicari, 2010; Ozouf-Costaz et al., 2015; Knytl, 2013; Dai, 2013; Sember, 2015). Окраска хромосомы более чем одним цветом свидетельствует о наличии транслокации. Цвет хромосомных районов позволяет однозначно определить хромосомы, которые были вовлечены в данные хромосомные перестройки. Метод позволяет проводить быструю идентификацию значительной части внутрихромосомных и межхромосомных перестроек. Данный тип окрашивания позволяет выявлять и идентифицировать любые транслокации материала негомологичных хромосом (Боркин, 2013; Романь, 2013; Esmaili, 2009; Васильева, 2012; Полякова, 2015; Левенкова, 2013; Vicari, 2010; Ozouf-Costaz et al., 2015; Sember, 2015).

1.1.5. Микроскопирование и анализ хромосомного набора

При микроскопировании готовых препаратов хромосомный набор клетки может быть проанализирован 2 методами (Фрешни, 2010):

- Подсчет количества хромосом при помощи кабельного телевидения или камеры-люцид;
- Цифровая фотография дифференциально окрашенных препаратов с дальнейшим использованием графического редактора (Adobe Photoshop и др. программ) для сортировки хромосом.

К анализу хромосомного набора относится измерение длин плеч и их соотношение. Согласно наиболее применяемой в кариологии классификации Левана выделяют следующие типы хромосом:

- а) Метацентрические (m) – плечи примерно одной длины;
- б) Субметацентрические (sm) – плечи неодинаковы, одно немного длиннее другого;
- в) Субтелоцентрические (st) – резко отличающиеся по длине плеч хромосомы (соотношение плеч в пределах 3,0-7,0);
- г) Акроцентрические (a) – палочковидные хромосомы, с одним длинным и одним очень коротким плечом (Levan, 1964).

Так, например, итогом кариологического исследования тканей почек и жаберного эпителия *Abramis brama* Linnaeus, 1758, распространенного вида в бассейне реки Енисей, стало выяснение формулы кариотипа. Для осуществления данной цели было применено дифференциальное окрашивание С-методом (Fish Karyome, 2014). Хромосомы при этом выглядят следующим образом:

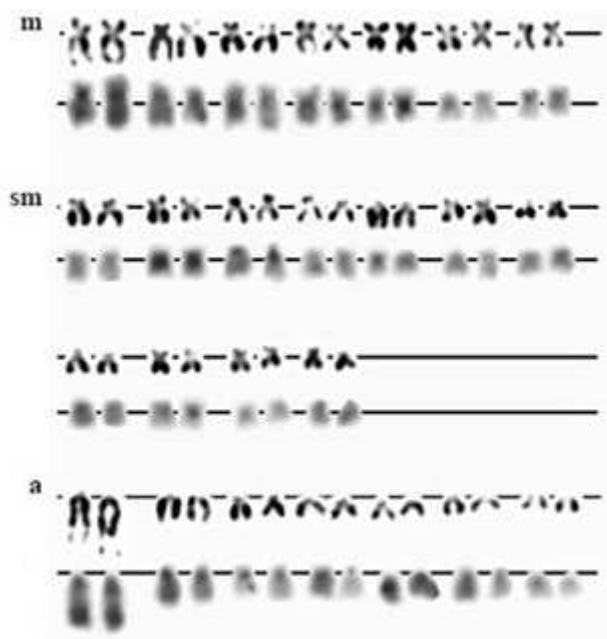


Рисунок 1 - Кариограмма *Abramis brama* Linnaeus, 1758 (Fish Karyome, 2014)

У леща диплоидный набор хромосом ($2n=50$). Исходя из данных, представленных на рисунке 1, видно, что диплоидный набор составляют 14 метацентрических, 22 субметацентрических и 14 акроцентрических хромосомы (Fish Karyome, 2014). В связи с этим следует, что формула кариотипа исследуемой рыбы: $14 m + 22 sm + 14 a$.

Согласно В. П. Природиной, 2010, кариотип леща можно считать более продвинутыми и специализированными, т. к. он состоит из нескольких морфологических групп хромосом (мета-, субмета- и акроцентрические хромосомы (Levan, 1964)) и имеют число плеч более 48 (72) (Природина, 2010).

1.1.6. Модификации методов кариологического анализа

Как говорилось ранее, в кариологии, как и в других типах анализа, существуют стандартные методы исследования объекта, которым следует большинство ученых. Но вместе с этим общепринятые методики подвергаются различным модификациям, зависящим от специфических характеристик объекта и целей исследования (Морева, 2014; Deng, 2003; Ozouf-Costaz et al., 2015; Pukhtayevych, 2014; Sember, 2015).

Одним из направлений усовершенствования стандартных методик кариологического анализа является предварительная обработка ихтиологических объектов. В рыбу вводится не только колхицин или иной ингибитор, предварительно ихтиологический материал обрабатывают (вводят внутрибрюшинно) такими веществами, как хлорид кобальта (Pukhtayevych, 2014; Pourkazemi, 2011) или фитогемагглютинин (Ozouf-Costaz et al., 2015). Далее, выдержанную некоторое время в аэрируемой емкости рыбу используют для кариологического анализа по стандартной методике *in vivo*. Ввод вышеперечисленных препаратов способствует увеличению митотической активности, в результате чего можно наблюдать наиболее репрезентативные метафазные пластинки.

Так же к дополнению методики можно отнести выдерживание зафиксированной суспензии в холодильнике (Ozouf-Costaz et al., 2015). Данная процедура необходима для более тщательной фиксации кариологического материала.

Основным этапом кариологического анализа, который наиболее подвержен дополнениям и общим изменениям является окраска препаратов (Singh, 2013; Ozouf-Costaz et al., 2015; Knytl, 2013; Pukhtayevych, 2014; Pourkazemi, 2011). Способы дифференциальной окраски (см. 1.1.4. Нанесение капель клеточной суспензии на предметное стекло и виды окрашивания кариологического материала), как правило, наиболее подвержены специфическим для определенных целей исследования изменениям.

Авторы, исходя из ранее проводимых экспериментов, дополняют анализ в зависимости от цели исследования (Vicari, 2010; Ozouf-Costaz et al., 2015; Pukhtayevych, 2014). Так, группа исследователей (Morescalchi et al., 2007) для установления темпов изменения кариотипа Каламоихта калабарского (*Erpetoichthys calabaricus*) использовала метод дифференциальной NOR-окраски в совокупности с методом FISH-окраски, ранее примененные Howell and Black, 1980 и Sola et al., 1992. В ходе своего исследования в 2006 г. М. А. Morescalchi с коллегами (Morescalchi et al., 2007) дополнили ход анализа более долгим временем экспозиции препаратов и обработкой их РНКазой. Благодаря совмещенному анализу покраски ученым удалось установить возможную эволюционную связь *Erpetoichthys calabaricus* (Osteichthyes, Polypteridae) с двоякодышащими рыбами (Dipnoi) (с помощью NOR-окраски), обнаружить робертсоновскую транслокацию (замещение одной метацентрической пары двумя телоцентрическими) (после изучения препаратов, окрашенных FISH-методом) (Morescalchi, 2007).

Так же кариологический анализ исследователи дополнили анализом Полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР с недавних пор некоторыми авторами используется как дополнение к кариологическому анализу

(Pukhtayevych, 2014; Pourkazemi, 2011; Romanenko, 2015; Singh, 2013; Vicari, 2010).

1.2. Современное представление об ихтиологической кариологии

Кариология является относительно молодым и достаточно перспективным видом анализа рыб. На сегодняшний день данный вид анализа позволил узнать кариотипы ≈ 1500 видов рыб (из них всего 250 видов, обитающих в водах России). Базы данных (FishBase, Fish Karyome, Fish Mitogenome Resource (FMiR), Fish Barcode Information System (FBIS) и др.) и некоторые публикации в специализированных журналах («Molecular Phylogenetics and Evolution», «BMC Evolutionary Biology», «Cytometry», «Chromosome Research», «Experientia», «Цитология и генетика» и др.) позволяют отслеживать информацию о хромосомных наборах рыб, которая может помочь в решении некоторых вопросов эволюции, систематики рыб и др.

Анализ литературных данных по кариологии рыб (без акцента на молекулярно – биологические и биохимические данные) за 2000-2016 гг. позволил установить, что наиболее интересующими исследователей вопросами являются: разработка систематики (Боркин, 2013; Васильева, 2011б; Природина, 2010; Arai, 2011; Esmaeili, 2009; Kovalev, 2014; Sember, 2015) и филогенетических взаимоотношений отдельных групп рыб (Апаликова, 2011; Васильева, 2012; Васильев, 2008а; Васильев, 2008б; Вехов, 2008; Природина, 2010; Праздников, 2013а; Романь, 2013; Sember, 2015), установление ploидности (Апаликова, 2011; Боркин, 2013; Васильев, 2007; Васильев, 2012; Левенкова, 2013; Полякова, 2015; Праздников, 2013б; Romanenko, 2015; Yang, 2015) (данный вопрос в настоящее время актуален при исследовании популяции серебряного карася в бассейне реки Енисей) и динамики соотношения полов некоторых видов рыб (Васильев, 2007; Васильева, 2011а; Левенкова, 2013; Полякова, 2015; Спирина, 2011; Vorn, 2000).

При решении вопроса систематики и филогенетических отношений рыб стоит заметить, что специализация кариотипа имеет следующие направления:

1. Изменение морфологии хромосом, без изменения их числа;
2. Изменение числа хромосом в сторону увеличения;
3. Изменение числа хромосом в сторону уменьшения (Природина, 2010).

Данные направления можно проследить на кариотипической специализации в подотряде Notothenioidei (Perciformes):



Рисунок 2 - Направления кариотипической специализации в подотряде Notothenioidei (Природина, 2010)

Интерпретируя рисунок 2, стоит сказать, что первое направление представляет группа видов со стабильным числом хромосом $2n=48$. Кариотипы различаются только по морфологии хромосом, выражающейся в числе их плеч. Внутри этой группы процесс кариологических преобразований (при постоянном числе хромосом) происходит в направлении увеличения числа двуплечих хромосом, а, следовательно, и числа хромосомных плеч от $NF=50$ до $NF=88$. Морфологические преобразования, вероятно, связаны с

периферическими инверсиями, при которых участки хромосом занимают инвертированное положение, или процессом накопления генетического материала (гетерохроматина) на плечах хромосом (Природина, 2010).

Второе направление кариотипической специализации в подотряде *Notothenioide* связано с процессом увеличения числа хромосом, которое наблюдается у 3 видов из семейства *Nototheniidae*: $2n=50$ (2 вида), $2n=58$ (1 вид). Увеличение числа хромосом – довольно редкое явление, отмечено у рыб некоторых семейств карпообразных (*Cypriniformes*). Это, вероятно, происходит за счет изменения хромосомной организации – центральных разделений хромосом (Природина, 2010).

Уменьшение числа хромосом в сравнении с предковым кариотипом (третье направление) наблюдается у 3-х семейств рассматриваемого подотряда.

У видов, чья эволюционная судьба связана с дальнейшим уменьшением числа хромосом путем их центрального слияния, происходит элиминация хромосом. Кариотип, которому в процессе элиминации хромосом присуще наличие двуплечих и одноплечих хромосом, называется малохромосомным несимметризованным (Природина, 2010).

Стоит отметить вклад кариологии в развитие аквакультуры и рыбного промысла в целом. Достаточное количество работ российских авторов связано с исследованием промысловых видов рыб и кормовых объектов: осетровые (Васильев, 2008а; Ковалев, 2011; Romanenko, 2015), лососевые (Макоедов, 2000), карпообразные (Апаликова, 2011; Вехов, 2008; Полякова, 2015; Романь, 2013), окунеобразные (Васильева, 2011б; Васильева, 2012; Васильев, 2012; Левенкова, 2013; Праздников, 2013а; Праздников, 2013б; Природина, 2010), вьюновые (Васильев, 2007; Васильев, 2008а; Левенкова, 2013).

Как было сказано выше, российские исследователи по большей мере заинтересованы изучением кариологии ценных рыб, в свою очередь, зарубежных авторов зачастую интересуют тропические виды рыб, используемые в аквариумистике (например, *Erpetoichthys calabaricus* и *Hoplias malabaricus*) (Morescalchi, 2007). Но, несмотря на различные объекты

исследования, цель несколько схожа: получение потомства при проведении отдаленной гибридизации и разработке специальных генетических методов селекции (Ковалев, 2011).

1.3. Особенности кариотипа карповых рыб

Карповые являются важным элементом ихтиофауны многих водоемов (Collares-Pereira, 1998). Изучение особенностей кариотипа различных групп семейства Cyprinidae представляет определенный интерес в зависимости от региона. Так, для Африканского региона типично изучение кариотипа рода *Barbus* (Rab, 1995), для Китая характерно изучение более широкого спектра представителей карповых (*Leuciscinae*, *Abramidinae*, *Xenocyprininae*, *Acheilognathinae*, *Catostomidae* и др.) (Yu, 1986), некоторых европейских (Collares-Pereira, 1998; Rab, 2005) и корейских (Song, 2005) авторов так же интересуют виды групп *Leuciscinae* и *Abramidinae* и т. д.

Для кариотипов некоторых карповых (в англоязычной литературе «*Leuciscine cyprinids*»: *Abramis brama*, *Vimba vimba*, *Alburnus alburnus*, *Rutilus rutilus*, *Phoxinus phoxinus* и др. (Rab, 2008)) характерно наличие маркера хромосом – самая большая пара субтело-, акроцентриков (Boron et al., 1997; Rab, 2008).

Но, несмотря на локальность изучения и отличительные особенности некоторых групп, для кариотипа большинства карповых рыб характерны особенности, объединяющие семейство. Все известные кариотипы представителей сем. Cyprinidae можно считать более продвинутыми и специализированными, т. к. они состоят из нескольких морфологических групп хромосом и имеют число плеч 48 и более (48-332) (Природина, 2010; Sola, 1979; Yu, 1986). Так же, кариотипы характеризуются диплоидным набором хромосом $2n$ (Sola, 1979). Триплоидные формы ($3n$) встречаются редко, в отдельных случаях у карасей (Вехов, 2008; Спирина, 2011).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В период с февраля 2016 г. по май 2017 г. на базе Кафедры водных и наземных экосистем Института фундаментальной биологии и биотехнологии СФУ были проведены подбор оптимальной методики кариологического анализа рыб и исследование кариотипа Гольяна Чекановского.

В ходе тестирования шести методик цитогенетического анализа на базе кафедры были исследованы следующие виды рыб: обыкновенный пескарь *Gobio gobio* (Linnaeus, 1758) – 6 экземпляров (далее «экз.»), елец сибирский *Leuciscus leuciscus baicalensis* Dybowski, 1874 – 11 экз., широколобка каменная *Paracottus knerii* Dybowski, 1874 – 8 экз. и одна кладка икры данного вида, гольян Чекановского *Rhynchocypris czekanowskii* Dybowski, 1869 – 34 экз.

Ихтиологический материал был отловлен с помощью ихтиологического сачка из следующих водных объектов: из озера Позитив, оз. Мелкое и оз. Дурное был выловлен гольян Чекановского; из реки Кача, в районе д. Творогово – прочие исследуемые виды.

В сентябре 2016 г. было проведено исследование кариотипа 2 экземпляров нотобранхиуса Рахова *Nothobranchius rachovii* Ahl, 1926 и 2 экз. барбуса суматранского *Barbus tetrazona* (Bleeker, 1855) в Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН в Лаборатории экологического мониторинга регионов АЭС и биоиндикации, г. Москва под руководством канд. биол. наук Крысанова Евгения Юрьевича.

Всего было исследовано 6 видов 63 экземпляра и одна кладка икры рыб.

Было протестировано 4 методики кариологического анализа, требующие жертв взрослых особей рыб и 2 методики, исключаящие гибель рыб (см. в таблице 1).

Таблица 1 – Методики кариологического анализа

Этапы анализа	Постоянные хромосомные препараты из <u>жабр</u> и <u>почек</u> пресноводных костистых рыб				V. Постоянные хромосомные препараты из <u>эмбрионов</u> и <u>личинок</u> рыб	VI. Постоянные хромосомные препараты из <u>регенерирующей ткани</u> <u>плавников</u> рыб
	I. по И. Н. Моревой-Рязанцевой	II. из базы данных Fish Karyome	III. по L.A.C. Bertollo, M.B. Cioffi и O. Moreira-Filho	IV. по Е. Ю. Крысанову	по M. Völker и P. Ráb	
	Ингибитор (раствор Колхицина)	0,3%, 1 мл / 1000 г, спинной отдел	0,05%, 1 мл на 100 г	0,025%, брюшная полость	1%, брюшная полость	0,05%, икра
Инкубация	6 ч	2 ч	4 ч	3 ч	4 ч	2 ч
Ткань	Измельченная ножницами	Измельченная в гомогенизаторе	Измельченная в гомогенизаторе	Целый орган	Измельченный эмбрион	Измельченная ножницами
Гипотонирование ²⁾	2 мл, 25 мин	6-8 мл	10 мл	Зависит от размера органа	1, 5 мл 45 мин	-
Фиксация (фиксатор Кларка ³⁾)	KCl:фиксатор 2:1	1-2 мл	7 капель	50 мл, 4 мин	1,5 мл 20 мин при 4°C	5 мл 20 мин 4 °C
Центриф. ⁴⁾	5 мин	10 мин	10 мин	-	-	-

Продолжение таблицы 1

Этапы анализа	Постоянные хромосомные препараты из <u>жабр и почек</u> пресноводных костистых рыб				V. Постоянные хромосомные препараты из <u>эмбрионов и личинок</u> рыб		VI. Постоянные хромосомные препараты из <u>регенерирующей ткани плавников</u> рыб
	I. по И. Н. Моревой-Рязанцевой	II. из базы данных Fish Karuome	III. по L.A.C. Bertollo, M.B. Cioffi и O. Moreira-Filho	IV. по Е. Ю. Крысанову	по M. Völker и P. Ráb		
Повторная фиксация (+центриф.)	3 раза через 15 мин	7 мл, через 1 час при 4°C, 3 раза	3 раза без ожидания	1,5 мл, оставить на 1 ночь без центриф.	3 раза, оставить на 1 ночь без центриф.	3 раза, оставить на 1 ночь без центриф.	Повторная фиксация (+ центриф.)
Удаление спирта из фиксатора, Иные действия	-	-	-	50%-ый водный раствор уксусной кислоты, 4 мин	50%-ый водный раствор уксусной кислоты	Раствор уксусной кислоты и этанола 1:1	50%-ый водный раствор уксусной кислоты (повторить 3 раза)
Стекла	Влажные	Влажные	Влажные	Нагретые до 100°C	Нагретые до 45 °C		Нагретые до 45 °C
Раскапывание	На расстоянии 30 см	Через 1-3 суток, на расстоянии 30 см	На расстоянии 30 см без ожидания	Не высоко, над спиртовой горелкой	На расстоянии 30 см		На расстоянии 30 см, не высоко над спиртовой горелкой

Окончание таблицы 1

Этапы анализа	Постоянные хромосомные препараты из <u>жабр и почек</u> пресноводных костистых рыб				V. Постоянные хромосомные препараты из <u>эмбрионов и личинок</u> рыб	VI. Постоянные хромосомные препараты из <u>регенерирующей ткани плавников</u> рыб
	I. по И. Н. Моревой-Рязанцевой	II. из базы данных Fish Karyome	III. по L.A.C. Bertollo, M.B. Cioffi и O. Moreira-Filho	IV. по Е. Ю. Крысанову		
						по M. Völker и P. Ráb
Удаление с препарата излишек кислоты	-	-	-	В этаноле	-	-
1)	1,281 M NaCl; 0,025 M KCl; 0,018 M CaCl ₂ ; 0,002 M NaHCO ₃ .					
2)	0,56%-й водный раствор хлорида калия (KCl).					
3)	Этанол и ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1.					
4)	Центрифугирование при 1000 об/мин.					

На первом этапе кариологического анализа рыб по каждой из применяемых методик (I-VI), как видно из таблицы 1, было произведено ингибирование веретена деления с применением водного раствора колхицина различной концентрации и места введения ингибитора, зависящих от методики. Инъецированные объекты были выдержаны в аквариуме с вариацией во времени (Крысанов, 2009; Морева, 2014; Bertollo, 2015; Fish Karyome, 2014; Volker, 2015a; Volker, 2015б).

Необходимая ткань (предпочки) рыб извлекалась по алгоритму, предложенному L.A.C. Bertollo et al. (III) (см. рисунок 3).

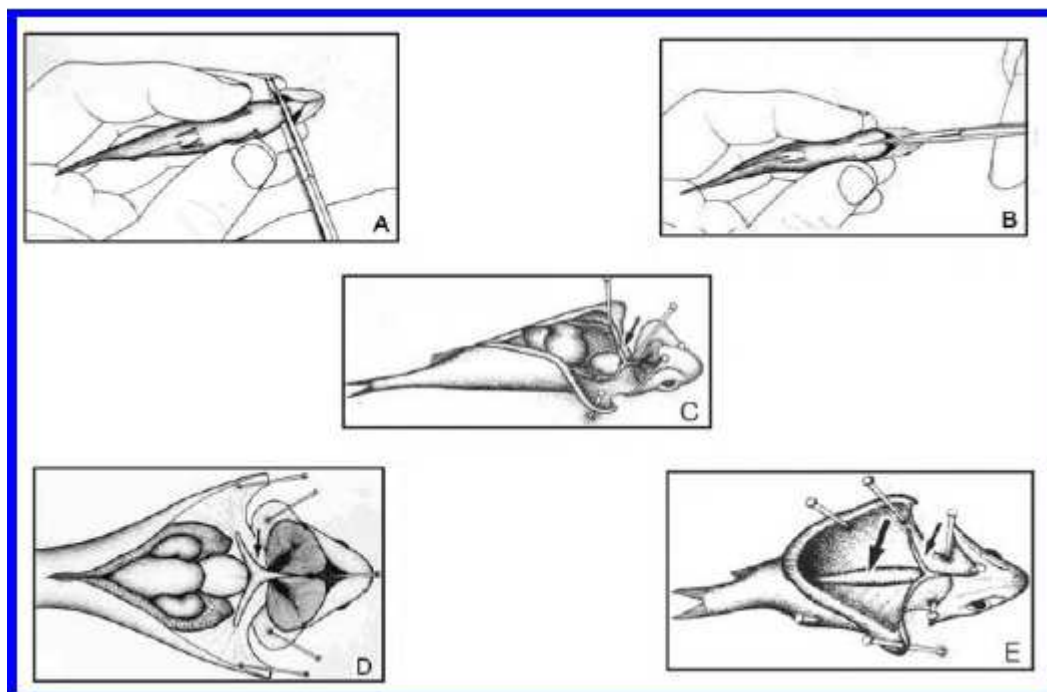


Рисунок 3 – Обнаружение и извлечение почек рыб (Bertollo, 2015)

Следующий этап анализа – гипотонирование, был проведен при использовании извлеченных почек и жабр (Крысанов, 2009; Морева, 2014; Bertollo, 2015; Fish Karyome, 2014), эмбрионов и регенерирующей ткани хвостовых плавников рыб (Volker, 2015a; Volker, 2015б), находящихся в различной степени целостности (измельченный материал/ целый орган).

Прошедший гипотонирование материал был зафиксирован свежеприготовленным охлажденным при 4°C фиксатором Кларка (см. пояснения к таблице 1) (Крысанов, 2009; Морева, 2014; Bertollo, 2015; Fish Karyome, 2014; Volker, 2015a; Volker, 2015б).

На следующем этапе кариологического анализа, следуя методикам I-III (см. таблицу 1), было проведено центрифугирование клеточной суспензии с повторной фиксацией материала. Этап повторной фиксации был проведен по методикам IV-VI, не зависимо от присутствия стадии центрифугирования.

При работе, согласно методикам IV-VI было проведено удаление спирта фиксатора из тканей при использовании водного и спиртового растворов уксусной кислоты (Крысанов, 2009; Volker, 2015a; Volker, 2015б).

Готовая клеточная суспензия была нанесена на влажные (Морева, 2014; Fish Karyome, 2014) или нагретые стекла (Крысанов, 2009; Volker, 2015a; Volker, 2015б) с определенного расстояния. Согласно методике IV, с высушенных препаратов при использовании этанола были удалены излишки уксусной кислоты.

На последнем этапе приготовления постоянных препаратов кариологического материала было произведено окрашивание рутинным способом (при использовании 5% красителя Романовского-Гимза на фосфатном буфере) (Крысанов, 2009; Морева, 2014; Bertollo, 2015; Fish Karyome, 2014; Volker, 2015a; Volker, 2015б).

Поиск метафазных пластинок был произведен при использовании светового прямого микроскопа Carl ZEISS Primo Star на увеличении 20-40X, с последующим фотографированием на цифровую камеру для лабораторного микроскопа Industrial Digital Camera на увеличении 100X с иммерсией.

Анализ проведен по 11 метафазным пластинкам при использовании программы Karuo Type 2.0, кариограмма составлена при помощи графических редакторов Paint и Adobe Photoshop CS6 Extended. Статистическая обработка данных выполнялась с использованием программы Microsoft Excel.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Методика приготовления препаратов хромосом млекопитающих (Крысанов, 2009), адаптированная для рыб, показала наилучшие результаты при изучении кариотипа голяна Чекановского.

2. Для кариотипа голяна Чекановского из бассейна р. Енисей характерен диплоидный набор хромосом ($2n$) = 50, состоящий из 7 пар метацентрических хромосом (m), 15 пар субметацентрических (sm) и 3 пар субтелоцентрических хромосом (st). Общий вид формулы кариотипа: $14 m + 30 sm + 6 st$.

3. Превалирующее число субметацентрических хромосом, относительно низкое, в сравнении с метацентриками, число субтелоцентриков (acroцентриков) в кариотипе соответствует общей тенденции распределения хромосом у рода голянов.

Наличие в кариотипе голяна Чекановского хромосом–маркеров позволяет судить о наибольшей филогенетической близости вида с голянгом озерным *Rhynchocypris percunurus* (Pallas, 1814).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Алексеев, В. И. Прикладная молекулярная биология / В. И. Алексеев, В. А. Каминский. – Москва : URSS, 2005 – 200 с.
2. Апаликова, О. В. Филогенетические отношения серебряных карасей *Carassius auratus gibelio* и *C. auratus cuvieri*, золотого карася *C. carassius* и карпа *Cyprinus carpio* на основе изменчивости митохондриальной ДНК / О. В. Апаликова [и др.] // Генетика. – 2011. – Т. 47, № 3. – С. 368–378.
3. Атлас пресноводных рыб России / Ю. С. Решетников [и др.]. - Т. 1. - Москва : «Наука», 2003. – 379 с.
4. Богуцкая, Н. Г. Каталог бесчелюстных и рыб пресных и солоноватых вод России с номенклатурными и таксономическими комментариями / Н. Г. Богуцкая, А. М. Насека. – Москва : товарищество научных изданий КМК, 2004. – 389 с.
5. Боркин, Л. Я. Гибридизация, видообразование и систематика животных / Л. Я. Боркин, С. Н. Литвинчук // Труды Зоологического института РАН. – 2013. – Приложение № 2. – С. 83–139.
6. Васильева, Е. Д. Способна ли ханкайская востробрюшка *Hemiculter lucidus* (Cyprinidae) размножаться с помощью гиногенеза? / Е. Д. Васильева, С. Г. Потапов, С. В. Шедько, В. П. Васильев // Вопросы ихтиологии. – 2011а. – Т. 51, № 2. – С. 231-238.
7. Васильева, Е. Д. Первая подтверждённая находка бычка-ширмана *Neogobius syrman* (Gobiidae, Perciformes) в озере Сасык бассейна Чёрного моря и кариологические характеристики бычка-ширмана и бычка-рыжика *N. eurcephalus* / Е. Д. Васильева, Д. В. Праздников, В. П. Васильев // Вопросы ихтиологии. – 2011б. – Т. 51, № 4. – С. 472-479.
8. Васильева, Е. Д. Морфологическая дивергенция султанок (род *Mullus*, Mullidae, Perciformes) Средиземного и Чёрного морей в связи с проблемой оценки их таксономических отношений / Е. Д. Васильева // Вопросы ихтиологии. – 2012. – Т. 52, № 5. – С. 517-524.

9. Васильев, В. П. Эволюционная кариология рыб. / В. П. Васильев. – Наука - Москва, 1985 – 304 с.
10. Васильев, В. П. Моноклональные и возникающие de novo тетраплоидные формы рыб рода *Cobitis* (Cobitidae) из различных клонально-бисексуальных комплексов / В. П. Васильев, Е. Б. Лебедева, Е. Д. Васильева, член корр. РАН А. П. Рысков // Доклады Академии наук. – 2007. – Т. 416. - №4. – С. 558-662.
11. Васильев, В. П. Кариотипы калуги, *Huso dauricus*, и сахалинского осетра, *Acipenser mikadoi* (Acipenseridae, Pisces) / В. П. Васильев, Е. Д. Васильева, С. В. Шедько, Г. В. Новомодный // Материалы конференции «Биоразнообразие и динамика генофондов». – Москва. – 2008а. – С. 19-21.
12. Васильев, В. П. Сравнительная кариология видов родов *Misgurnus* и *Cobitis* (Cobitidae) бассейна реки Амур в связи с их таксономическими отношениями и эволюцией кариотипов / В. П. Васильев, Е. Д. Васильева // Вопросы ихтиологии. – 2008б. – Т. 48. - №1. – С. 5-17.
13. Васильев, В. П. Хромосомный полиморфизм звездочёта *Uranoscopus scaber* (Uranoscoridae, Perciformes) Чёрного моря / В. П. Васильев, Д. В. Праздников, Е. Д. Васильева // Вопросы ихтиологии. – 2012. – Т. 52, № 3. – С. 386-390.
14. Вехов, Д. А. Популяция серебряного карася *Carassius auratus* (Cypriniformes, Cyprinidae) с «золотыми» особями в пруду города Волгограда / Д. А. Вехов // Вопросы ихтиологии. – 2008. – Т. 48. - №3. – С. 374-383.
15. Воробьев, И. А. Центриоли и микротрубочки в интерфазных клетках при воздействии колцемида. Эффект, зависимый от концентрации и времени действия яда / И. А. Воробьев, Ю. С. Ченцов // Цитология. – 1985. – Т. 27. – №. 10.
16. Вышегородцев, А. А. Рыбы Енисея : справочник / А. А. Вышегородцев. – Новосибирск : Изд-во «Наука», Сибирская издательская фирма РАН, 2000. – 188 с.

17. Зуев, И. В. Гольяны рода *Phoxinus* (сем. Cyprinidae) бассейнов рек Енисея и Пясины : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.08 / Зуев Иван Владимирович. – Томск, 2007. – 170 с.

18. Зуев, И. В. новые сведения о распространении гольяна Чекановского *Phoxinus czekanowskii* в бассейне реки Енисей / И.В. Зуев, К.Н. Клочан, В.Н. Урбанович // Водные экосистемы Сибири и перспективы их использования: материалы Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 85-летию со дня основания кафедры ихтиологии и гидробиологии ТГУ. – Томск. – 2016. – С. 63-64.

19. Ковалев, К. В. Система методов биологии развития для использования в программах по сохранению и восстановлению популяций и видов осетровых рыб / К. В. Ковалев, А. С. Грунина, А. В. Рекубратский, Л. И. Цветкова // Межведомственный сборник научных и научно-методических трудов «Проблемы аквакультуры». – Москва. – 2011. – С. 51-54.

20. Крысанов, Е. Ю. Простой метод приготовления препаратов хромосом мелких млекопитающих / Е. Ю. Крысанов, Т. Б. Демидова, Б. И. Шефтель // Зоологический журнал. – 2009. – Т. 88, № 2. – С. 234-238.

21. Левенкова, Е. С. Тетраплоидные формы как результат гибридизации при сосуществовании клонально-бисексуальных щиповок *Cobitis* / Е.С. Левенкова, В.П. Васильев // Вестник ТГУ. – 2013. – Т. 18, № 6. – С. 3028-3031.

22. Макоедов, А. Н. Кариология, биохимическая генетика, и популяционная фенетика лососевидных рыб Сибири и Дальнего Востока: сравнительный аспект / дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.10 / Макоедов Анатолий Николаевич. – Москва, 2000. – 25 с.

23. Морева, И. Н. Кариотип северной дальневосточной широколобки *Megalocottus platycephalus platycephalus* (Pallas, 1814) (Pisces: Cottidae) из залива Одян Охотского моря / И. Н. Морева, Б. С. Андреева // Биология моря. – 2014. – Т. 40, № 2. – С. 137-142.

24. Назаренко, С. А., Яковлева, Ю.С. Хромосомный анализ и его методы / С. А. Назаренко, Ю. С. Яковлева. – 2009.
25. Орлов, В. Н. Исследование хромосомных наборов млекопитающих : методическое руководство / В. Н. Орлов, Г. А. Чудиновская, Е. П. Крюкова. – Москва : Наука, 1976. – 36 с.
26. Полякова, Н. Е. Анализ мтДНК и ядерных маркеров свидетельствует о гомоплоидном гибридном происхождении нового вида дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae) / Н. Е. Полякова, А. В. Семина, Вл. А. Брыков // Генетика. – 2015. – Т. 51, № 11. – С. 1250–1263.
27. Правдин, И. Ф. Руководство по изучению рыб / И. Ф. Правдин; под ред. проф. П. А. Дрягина, канд. биол. наук В. В. Покровского. – Москва : Изд-во «Пищевая промышленность», 1966. – 376 с.
28. Праздников, Д. В. Хромосомная эволюция бычковых рыб семейства Gobiidae (Pisces, Perciformes) из Понто-Каспийского бассейна / Д. В. Праздников // Вестник ТГУ. – 2013а. – Т. 18, № 6. – С. 3064-3067.
29. Праздников, Д. В. Полиморфизм и межпопуляционная изменчивость кариотипа каспийского бычка-головача *Neogobius gorlap* (Gobiidae, Perciformes) / Д. В. Праздников, В. П. Васильев, Е. Д. Васильева // Вопросы ихтиологии. – 2013б. – Т. 53, № 4. – С. 459-464.
30. Природина, В. П. Кариотипическое и таксономическое разнообразие нототениоидных рыб подотряда Notothenioidei (Perciformes) из Южного океана / В.П. Природина // Труды Зоологического института РАН. – 2010. – Т. 314. - № 4. - С. 411–432.
31. Сало, В. М. Применение безвременника и колхицина / В. М. Сало. - 2008.
32. Сорочинский, Б. В. Антимитотические соединения как модификаторы лучевого поражения культивируемых клеток / Б. В. Сорочинский и др. // Цитология и генетика. - 1994. – Т. 28. – №. 1. – С. 3.

33. Спирина, Е. В. Особенности половой структуры популяций серебряного карася водоемов ульяновской области / Е. В. Спирина // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. - № 2 (76). – С. 66-70.
34. Романь, А. М. Кариотипы трех таксонов рода *Barbus* (Cypriniformes, Cyprinidae) из водоемов Украины / А. М. Романь // Збірник праць Зоологічного музею. – 2013. - № 44. – С. 70–76.
35. Фрешни, Р. Я. Культура животных клеток. Практическое руководство / Р. Я. Фрешни. – Москва : «Бином», 2010. – 714 с.
36. Электронная база данных кариотипов различных видов рыб [Электронный ресурс] Национальное бюро генетических ресурсов рыб.– Лакхнау, 2014. – Режим доступа: http://mail.nbfgr.res.in/Fish_Karyome/index.php.
37. Arai, R. Fish karyotypes : A check list / R. Arai. – Japan, 2011. – 340 p.
38. Bertollo, L.A.C. Direct chromosome preparation from freshwater Teleost fishes / L.A.C. Bertollo, M.B. Cioffi, O. Moreira-Filho // Fish cytogenetic techniques. Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans. – Taylor & Francis Group, LLC, 2015. – P. 21-26.
39. Bianco, P. G. The karyology of the cyprinid genera *Scardinius* and *Rutilus* in southern Europe / P. G. Bianco [et al.] // Ichthyological Research. – 2004. – № 51. – P. 274–278.
40. Born, G. G. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome / G. G. Born, L. A. Carlos Bertollo // Chromosome Research. – 2000. – № 8. – P. 111-118.
41. Boron, A. Chromosome study of swamp minnow *Eupallasella percnurus* (Dybowski, 1916) from Poland / A. Boron, M. Jankun, J. Kuszniierz // Caryologia. – 1997. - Vol. 50, № 1. - P. 85 – 90.
42. Boron, A. Comparative chromosomal studies on two minnow fish, *Phoxinus phoxinus* (Linnaeus, 1758) and *Eupallasella percnurus* (Pallas, 1814); an associated cytogenetic-taxonomic considerations / A. Boron // Genetica. – 2001. – № 111. – P. 387–395.

43. Cataudella, S. The chromosomes of 11 species of Cyprinidae and one Cobitidae from Italy, with some remarks on the problem of polyploidy in the Cypriniformes / S. Cataudella, L. Sola, R. A. Muratori, E. Capanna // *Genetica*. – 1977. – Vol. 47, № 3. – P. 161-171.
44. Collares-Pereira, M. J. *Leuciscus* (Pisces, Cyprinidae) karyotypes: Transect of Portuguese populations / M. J. Collares-Pereira, M.I. Próspero, R.I. Biléu, E.M. Rodrigues // *Genetics and Molecular Biology*. – 1998. – Vol. 21, № 1. – P. 16-21.
45. Dai, Y. Karyotype and evolution analysis of vulnerable fish *Onychostomalini* from China / Y. Dai // *Systems Biology (ISB)*, 2013 7th International Conference on. – IEEE, 2013. – P. 49-54.
46. Deng, W. A New Method for Improving Metaphase Chromosome Spreading / Wen Deng [et al.] // *Cytometry*. – 2003. - № 51A. - P. 46 – 51.
47. Esmaeili, H. R. First karyological analysis of an endemic fish, zagros tooth-carp, *Aphanius Vladykovi* Coad, 1988 (Actinopterygii: Cyprinodontidae) from Iran / H. R. Esmaeili, M. Ebrahimi, A. Teimori, T. Hojat Ansari // *Iranian Journal of Science & Technology*. – 2009. - Vol. 33, № A4. – P. 349 – 354.
48. Fish cytogenetic techniques. Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans / C. Ozouf-Costaz, E. Pisano, F. Foresti, L. F. de Almeida Toledo. – Taylor & Francis Group, LLC, 2015. – 206 p.
49. Goddard, K. A. Confirmation of gynogenesis in *Phoxinus eos-neogaeus* (Pisces: Cyprinidae) / K. A. Goddard, O. Megwinoff, L. L. Wessner, F. Giaimo // *Journal of Heredity*. – 1998. – № 89. – P. 151–157.
50. Gold, J. R. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding / J. R. Gold [et al.] // *Journal of Fish Biology*. – 1990. – Vol. 37, № 4. – P. 563-575.
51. Howell, W. M. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method / W. M. Howell, D. A. Black // *Experientia*. – 1980. – № 36. – P. 1014–1015.

52. Ito, Y. Genetic differentiation of the northern Far East cyprinids, *Phoxinus* and *Rhynchocypris* / Y. Ito, H. Sakai, S. Shedko, S. R. Jeon // Fisheries Science. – 2002. – Vol. 68, № 1– P. 75-78.
53. Joswiak, G. R. Diploidy and triploidy in the hybrid minnow, *Phoxinus eos* x *Phoxinus neogaeus* (Pisces: Cyprinidae) / G. R. Joswiak, R.H. Stasiak, B.F. Koop // Experientia. – 1985. – № 41. – P. 505-507.
54. Kang, Y.-J. Reproductive isolation between *Moroco oxycephalus* and *M. lagowskii* (Pisces: Cyprinidae) in Korea / Y.-J. Kang , Mi-S. Min, S.-Y. Yang // Korean Journal of Biological Sciences. – 2000. – № 4. – P. 109 – 115.
55. Knytl, M. Karyotype and chromosome banding of endangered crucian carp, *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758) (Teleostei, Cyprinidae) / M. Knytl, L. Kalous, P. Rab // Comparative Cytogenetics. – 2013. – Vol. 7, № 3. – P. 205 – 215.
56. Kovalev, K. V. The karyotype of the Amu Darya sturgeon, *Pseudoscaphirhynchus kaufmanni* (Actinopterygii: Acipenseriformes: Acipenseridae) / K. V. Kovalev [et al.] // Acta Ichthyologica et Piscatoria. – 2014. - Vol. 44, № 2. - P. 111–116.
57. Lee, G.-Y. Karyotypes of four species in genus *Moroco* (Pisces: Cyprinidae) from Korea and Japan / G.-Y. Lee [et al.] // Korean Journal of Limnology. – 1987. – Vol. 20, № 1. – P. 49-60.
58. Levan, A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes / A. Levan, K. Fredga, A. A. Sandberg // Hereditas. – 1964. – Vol. 52, № 2. – P. 201-220.
59. Morescalchi, M. A. Karyotypic characterization and genomic organization of the 5S rDNA in *Erpetoichthys calabaricus* (Osteichthyes, Polypteridae) / M. A. Morescalchi, I. Liguori, L. Rocco, V. Stingo // Genetica. – 2007. – № 131. – P. 209–216.
60. Netto, M. R. C. B. A standard protocol for obtaining fish chromosomes under post-mortem conditions / M. R. C. B. Netto, E. Pauls, P. R. A. de Mello Affonso // Micron. – 2007. – Vol. 38, № 3. – P. 214-217.
61. Pourkazemi, M. Karyology study on Bleak (*Alburnus alburnus*) from the South Caspian Sea region / M. Pourkazemi, A. Khosravanizadeh, M. R. Nowruz

Fashkhami // Caspian Journal of Environmental Sciences. – 2011. – Vol. 9, № 1. – P. 27-36

62. Pukhtayevych, P. P. Modified Method of Metaphase Plates Obtaining for Polyploid Fish Genera *Carassius* and *Cobitis* Karyotyping (Actinopterygii, Cypriniformes) / P. P. Pukhtayevych // Vestnik Zoologii. – 2014. – Vol. 48, № 4. – C. 371-376.

63. Rab, P. Karyotypes of three «small» *Barbus* species (Cyprinidae) from Republic of Guinea (Western Africa) with a review on karyology of African small *Barbus* / P. Rab, A. Machordom, A. Perdices, J.-F. Guegan // Caryologia. – 1995. – Vol. 48, № 3. – C. 299-307.

64. Rab, P. Chromosome studies of European cyprinid fishes: interspecific homology of leuciscine cytotoxic markerVthe largest subtelocentric chromosome pair as revealed by cross-species painting / P. Rab [et al.] // Chromosome Research. – 2008. – № 16. – P. 863-873.

65. Romanenko, S. A. Segmental paleotetraploidy revealed in sterlet (*Acipenser ruthenus*) genome by chromosome painting / S. A. Romanenko [et al.] // Molecular Cytogenetics. – 2015. – Vol. 8, № 90. – P. 1-13.

66. Sakai, H. Phylogenetic and taxonomic relationships of northern Far Eastern phoxinin minnows, *Phoxinus* and *Rhynchocypris* (Pisces, Cyprinidae), as inferred from allozyme and mitochondrial 16S rRNA sequence analyses / H. Sakai [et al.] // Zoological Science. – 2006. – Vol. 23, № 4. – P. 323-331.

67. Sember, A. Karyotype differentiation in 19 species of river loach fishes (Nemacheilidae, Teleostei): extensive variability associated with rDNA and heterochromatin distribution and its phylogenetic and ecological interpretation / A. Sember [et al.] // BMC Evolutionary Biology. – 2015. – Vol. 15, № 251. – P. 1-22.

68. Singh, S. S. Karyotype Analysis of the New Catfish *Mystus ngasep* (Siluriformes: Bagridae) from Manipur, India / S. S. Singh, Ch. Brajakishor Singh, G. Waikhom // Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. – 2013. – № 13. – P. 179-185.

69. Sola, L. New developments in Vertebrate cytotaxonomy III. Karyology of bony fishes: A review / L. Sola, S. Cataudella, E. Capanna // *Genetica*. – 1981. – № 54. – P. 285-328.
70. Sola, L. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia* II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A3 and silver staining / L. Sola [et al.] // *Cytogenetics and Cell Genetics*. – 1992. – № 60. – P. 229–235.
71. Song, H.-B. Karyotypes of three species of Gobiobotia (Pisces: Cyprinidae) in Korea / H.-B. Song, G.-M. Park // *Korean Journal of Ichthyology*. – 2005. – Vol. 17, № 3. – P. 159-166.
72. Stasiak, R. H. Laboratory development of the hybrid *Phoxinus eos* x *Phoxinus neogaeus* (Pisces: Cyprinidae) / R. H. Stasiak, G. R. Joswiak, K. A. Berven // *Experientia*. – 1988. – № 44. – P. 262-263.
73. Takai, A. Some Features on the nucleolus organizer regions in the chromosomes of the Cyprinid fishes / A. Takai, Y. Ojima // *Proceedings of the Japan Academy*. – 1984. – Vol. 60(B), № 10. – P. 410–413.
74. Vicari, M. R. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives / M. R. Vicari [et al.] // *Journal of Fish Biology*. – 2010. – № 76. - P. 1094–1116.
75. Volker, M. Direct chromosome preparation from regenerating fish fin tissue / M. Volker, P. Rab // *Fish cytogenetic techniques. Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans*. – Taylor & Francis Group, LLC, 2015a. – P. 37-41.
76. Volker, M. Direct chromosome preparations from embryos and larvae / M. Volker, P. Rab // *Fish cytogenetic techniques. Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans*. – Taylor & Francis Group, LLC, 2015b. – P. 42-48.
77. Yang, L. Phylogeny and polyploidy: Resolving the classification of cyprinine fishes (Teleostei: Cypriniformes) / L. Yang [et al.] // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2015. – № 85. – P. 97–116.

78. Yu, X. On the karyosystematics of cyprinid fishes and a summary of fish chromosome studies in China / Yu X [et al.] // *Genetica*. – 1987. – № 72. – P. 225-236.