МОЛЕКУЛЯРНАЯ И КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ
Оригинальное исследование / Original article
УДК 576.316.3:57.082.263

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(5):519-524
DOI 10.18699/VJ20.46-o

Получение микродиссекционных ДНК-проб из метафазных хромосом в случае невозможности идентификации целевой хромосомы методами рутинного окрашивания

К.С. Задесенец, Н.Б. Рубцов ✉

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
✉ e-mail: rubt@bionet.nsc.ru

Аннотация. При проведении многочисленных и разнообразных молекулярно-цитогенетических исследований микродиссекционные ДНК-библиотеки и ДНК-пробы зарекомендовали себя как надежный и эффективный инструмент как в диагностике и анализе хромосомных патологий человека, так и в работах, посвященных изучению реорганизации хромосом в ходе кариотипической эволюции. Важным преимуществом микродиссекционных ДНК-проб перед хромосомоспецифичными ДНК-пробами, полученными с помощью хромосомного сортинга, является возможность их приготовления из хромосомного материала индивидуальных животных без дополнительного этапа создания клеточных культур, предназначенных для производства большого числа метафазных хромосом. Одно из основных условий успешного использования микродиссекционной техники – идентификация целевой хромосомы на препаратах метафазных хромосом, что позволяет, используя микроманипуляционную технику, осуществлять сбор непосредственно ее материала с цитологических препаратов. В настоящей работе предложена технология создания ДНК-проб для индивидуальных хромосом даже в том случае, когда рутинное окрашивание не дает провести их надежную идентификацию. Представленный подход апробирован при получении наборов хромосомоспецифичных ДНК-проб для хромосом двух видов свободноживущих плоских червей рода *Macrostomum* – *M. mirumnovem* и *M. cliftonensis*. Кариотипы этих видов содержат три пары мелких, близких по размеру метацентрических хромосом, надежная идентификация которых после окрашивания красителем Гимза оказалась невозможной. Раздельный сбор всех метафазных хромосом из одной метафазной пластинки с последующей амплификацией их ДНК позволил создать ДНК-пробы, специфически окрашивающие исходные хромосомы при проведении даже частичной супрессионной гибридизации *in situ*. При анализе результатов такой супрессионной гибридизации *in situ* идентифицированы хромосомы, из которых были получены ДНК-пробы. Последующее пулирование ДНК-проб, созданных из гомологичных хромосом, способствовало увеличению интенсивности их специфического окрашивания при проведении их супрессионной гибридизации *in situ*. Это, в свою очередь, обеспечило возможность успешного применения предлагаемого подхода в экспериментах, посвященных изучению кариотипической эволюции в роде *Macrostomum*, а также при анализе хромосомных перестроек, имеющих место в лабораторных культурах *M. mirumnovem*.
Ключевые слова: микродиссекция метафазных хромосом; микродиссекционные ДНК-пробы; флуоресцентная *in situ* гибридизация; сиквенс-независимая полимеразная цепная реакция.

Для цитирования: Задесенец К.С., Рубцов Н.Б. Получение микродиссекционных ДНК-проб из метафазных хромосом в случае невозможности идентификации целевой хромосомы методами рутинного окрашивания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):519-524. DOI 10.18699/VJ20.46-o

Generation of microdissected DNA probes from metaphase chromosomes when chromosome identification by routine staining is impossible

K.S. Zadesenets, N.B. Rubtsov ✉

Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
✉ e-mail: rubt@bionet.nsc.ru

Abstract. Application of microdissected DNA libraries and DNA probes in numerous and various modern molecular cytogenetic studies showed them as an efficient and reliable tool in the analysis of chromosome reorganization during karyotypic evolution and in the diagnosis of human chromosome pathology. An important advantage of DNA probe generation by metaphase chromosome microdissection followed by sequence-independent polymerase chain reaction in comparison with the method of DNA probe generation using chromosome sorting is the possibility of DNA probe preparation from chromosomes of an individual sample without cell line establishment

© Задесенец К.С., Рубцов Н.Б., 2020
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License

for the production of a large number of metaphase chromosomes. One of the main requirements for successful application of this technique is a possibility for identification of the chromosome of interest during its dissection and collection of its material from metaphase plates spread on the coverslip. In the present study, we developed and applied a technique for generation of microdissected DNA probes in the case when chromosome identification during microdissection appeared to be impossible. The technique was used for generation of two sets of Whole Chromosome Paints (WCPs) from all chromosomes of two species of free-living flatworms in the genus *Macrostomum*, *M. mirumnovem* and *M. cliftonensis*. The single-copy chromosome technique including separate collection of all chromosomes from one metaphase plate allowed us to generate WCPs that painted specifically the original chromosome by Chromosome *In Situ* Suppression Hybridization (CISS-Hybridization). CISS-Hybridization allowed identifying the original chromosome(s) used for DNA probe generation. Pooled WCPs derived from homologous chromosomes increased the intensity and specificity of chromosome painting provided by CISS-Hybridization. In the result, the obtained DNA probes appeared to be good enough for application in our studies devoted to analysis of karyotypic evolution in the genus *Macrostomum* and for analysis of chromosome rearrangements among the worms of laboratory cultures of *M. mirumnovem*.
Key words: metaphase chromosome microdissection; Whole Chromosome Paints; FISH; sequence-independent polymerase chain reaction.

For citation: Zadesenets K.S., Rubtsov N.B. Generation of microdissected DNA probes from metaphase chromosomes when chromosome identification by routine staining is impossible. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):519-524. DOI 10.18699/VJ20.46-o

Введение

Сравнительная цитогенетика как отдельное направление в биологии возникла практически сразу после разработки методов приготовления качественных препаратов метафазных хромосом. Ее прогресс во многом обусловлен развитием методов идентификации хромосом и хромосомных районов. Начиная с 1970-х гг. для сравнительного цитогенетического анализа хромосом разных видов млекопитающих и птиц успешно использовали технику GTG-дифференциального окрашивания хромосом (Graphodatsky et al., 2000). Следующим этапом было использование локализации в хромосомах гомологичных генов в качестве маркеров гомеологических хромосом и хромосомных районов у разных видов млекопитающих. Первые исследования были основаны на результатах определения хромосомной локализации генов с помощью панелей межвидовых гибридов соматических клеток (Rubtsov et al., 1981) и сравнения паттернов GTG-окрашивания хромосом, содержащих гомеологичные гены (Rubtsov et al., 1988).

Значительный прогресс в сравнительной цитогенетике оказался связан с разработкой методов гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*, которые позволили проводить локализацию клонированных фрагментов ДНК с точностью до небольшого района хромосомы, а затем и специфически окрашивать целые хромосомы и протяженные хромосомные районы (Nesterova et al., 1991). Одним из ключевых моментов в развитии сравнительной цитогенетики оказалась разработка методов создания цельнохромосомных ДНК-проб, супрессионная гибридизация *in situ* которых полностью и специфично окрашивала исходные хромосомы и гомеологичные хромосомы и их районы в хромосомах других видов (Ferguson-Smith, Trifonov, 2007). В настоящее время такие цельнохромосомные ДНК-пробы получают либо из сортированных с помощью проточной цитометрии метафазных хромосом, либо из хромосом, собранных из распластанных на стекле метафазных пластинок, амплификацией ДНК собранных хромосом в полимеразной цепной реакции с частично вырожденным праймером MW6 или с помощью специализированных китов WGA (whole genome amplification). Качество таких цельнохромосомных ДНК-проб зависит как от эффективности амплификации собранного хромосомного материала, числа копий хромосом, ДНК которых используется на старте такой амплификации, так и от сохранности ДНК собираемого хромосомного материала. Если при применении хромосомного сортинга высокое качество цельнохромосомных ДНК-проб может быть достигнуто сбором тысяч хромосомных копий, то в случае микродиссекции их число не может быть велико из-за большой трудоемкости этой процедуры, а проблемы идентификации целевой хромосомы могут сделать использование микродиссекционной технологии еще более проблематичной.

С проблемой идентификации рутинно окрашенных хромосом мы столкнулись при молекулярно-цитогенетическом анализе хромосом свободноживущих червей рода *Macrostomum*. В соответствии с их кариотипами виды рода *Macrostomum* могут быть разделены на три группы. Описание двух групп видов с кариотипами $2n = 6$ и $2n = 12$, состоящими из мелких метацентрических хромосом, предполагает, что в их эволюции могла иметь место недавняя полная дупликация генома. Эта гипотеза хорошо согласуется с результатами молекулярно-цитогенетического анализа асимметричных кариотипов видов *M. lignano* и *M. janickei*, в кариотипах которых были выявлены четкие следы недавно прошедшей полногеномной дупликации (Zadesenets et al., 2017a, b). Кроме удвоения генома в их эволюции имели место слияния одного гаплоидного набора предковых хромосом в единую крупную метацентрическую хромосому (Zadesenets et al., 2017a, b).

Гипотеза об удвоении числа хромосом в результате полногеномной дупликации может быть проверена созданием ДНК-проб из индивидуальных хромосом вида с кариотипом $2n = 12$ и дальнейшего проведения их супрессионной гибридизации *in situ* с метафазными хромосомами этого вида. Специфическое окрашивание в таком эксперименте двух пар паралогичных хромосом цельнохромосомными ДНК-пробами свидетельствовало бы о недавнем удвоении генома предкового вида. Проб-

лемой создания необходимых для проведения такого исследования ДНК-проб является сходство морфологии всех хромосом у известных в настоящее время видов с кариотипом 2*n* = 12 (Zadesenets et al., 2020).

Нами проводятся кариотипирование новых видов рода *Macrostomum*, которые могли бы быть вовлечены в такие исследования, а также разработка методов создания ДНК-проб, специфично окрашивающих индивидуальные хромосомы видов, кариотип которых состоит из морфологически неразличимых хромосом. Настоящая работа посвящена решению этой задачи.

Материалы и методы

Лабораторные культуры свободноживущих червей. В работе использованы лабораторные культуры видов *M. cliftonensis* и *M. mirumnovem*, любезно предоставленные L. Schärer (Зоологический институт Университета Базеля, Швейцария). Кариотип *M. cliftonensis* (2*n* = 6) состоит из трех пар маленьких метацентрических хромосом, близких по размеру и морфологии (Zadesenets et al., 2020). Кариотипирование *M. mirumnovem* выявило высокое кариотипическое разнообразие, с наиболее часто встречающимся кариотипом (2*n* = 9) (Zadesenets et al., 2020). В настоящем исследовании взяты только особи с этим кариотипом.

Приготовление препаратов метафазных хромосом. При кариотипировании индивидуальных червяков (длина взрослой особи варьирует, в зависимости от вида, от 0.5 до 1 мм) препараты метафазных хромосом готовили согласно разработанному ранее протоколу кариотипирования индивидуальных особей (Zadesenets et al., 2016). Для описания кариотипа анализировали не менее 10 метафазных пластинок. Препараты для проведения микродиссекции готовили из 100 особей в соответствии со стандартным протоколом приготовления препаратов метафазных хромосом, разработанным ранее. Препараты делали на чистых влажных холодных покровных стеклах (60 мм × 24 мм × 0.17 мм) (Zadesenets et al., 2016).

Окрашивание метафазных хромосом. Метафазные хромосомы для рутинного кариотипирования окрашивали красителем DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole) (VectaShield, США) в соответствии со стандартным протоколом. Метафазные хромосомы для микродиссекции окрашивали 0.1 % красителем Гимза (Sigma) в течение трех мин при комнатной температуре, затем ополаскивали в дистиллированной воде и слегка подсушивали. После подсушивания хромосомы должны были оставаться достаточно мягкими и легко резаться оттянутой стеклянной иглой.

Микроскопический анализ. Микроскопические изображения окрашенных метафазных хромосом и результаты флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) регистрировали с помощью CCD-камеры, установленной на люминесцентном микроскопе Axioplan 2 (ZEISS, Германия). Для микроскопического анализа хромосом, окрашенных красителем DAPI, и результатов FISH использовали комплекты фильтров #49, #10 и #15 (ZEISS, Германия). Для регистрации и анализа микроскопических изображений применяли программное обеспечение AxioVision (ZEISS, Германия) или ISIS4 (METASystems GmbH, Германия). Микроскопический анализ проводили в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН в Институте цитологии и генетики (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, РФ).

Микродиссекция метафазных хромосом и получение микродиссекционных ДНК-проб. Основы техники микродиссекции метафазных хромосом видов рода *Macrostomum* и сиквенс-независимой амплификации ДНК диссектированного материала для получения ДНК-проб в основном были описаны ранее (Zadesenets et al., 2016, 2017a, b). То есть для микродиссекции использовали полные метафазные пластинки, хромосомы в которых были хорошо распластаны, отсутствовали контакты и налегания хромосом. Положение хромосом в метафазной пластинке позволяло собрать материал всех хромосом в отдельные пробирки, не касаясь других хромосом. Для микродиссекции хромосом вида *M. mirumnovem* были взяты особи с кариотипом 2*n* = 9 (одна самая крупная метафазная хромосома – MMI1, пара крупных метацентриков – MMI2 и три пары мелких метацентрических хромосом MMI3–MMI5). Материал диссектированной хромосомы под микроскопическим контролем переносили в 40 нл реакционной смеси (Zadesenets et al., 2016), помещенные в оттянутый силиконизированный носик пипетки Пастера. Микроскопический контроль гарантировал надежный и полный перенос материала. Затем материал помещали в готовую реакционную смесь объемом 10 мкл в 0.5 мл пробирке. Далее подготовку ДНК к амплификации и саму амплификацию выполняли согласно ранее описанному протоколу (Zadesenets et al., 2016, 2017a, b). После завершения полимеразной цепной реакции (ПЦР) полученный продукт метили в 20 дополнительных циклах ПЦР в присутствии дезоксинуклеотидтрифосфатов, коньюгированных с флуорохромами: Flu-12-dUTP [fluorescein-5(6)-carboxamidocaproyl-[5(3-aminoallyl)2′-deoxyuridine-5′-Triphosphate] (Biosan, Новосибирск, Россия) или TAMRA-5-dUTP (5-tetramethylrhodamine-dUTP) (Biosan), используя Whole Genome Amplification 3 Kit (WGA3, Sigma-Aldrich, США) (Zadesenets et al., 2016, 2017a, b). Пары ДНК-проб, полученных из гомологичных хромосом, определяли проведением супрессионной гибридизации *in situ* с хромосомами исходного вида.

Супрессионная гибридизация *in situ* с метафазными хромосомами *M. cliftonensis* и *M. mirumnovem*. Из-за очень небольшого размера особей *M. cliftonensis* и *M. mirumnovem* (длина взрослой особи не превышает 1.22 и 1.17 мм соответственно) (Schärer et al., 2020) получение достаточного количества Cot1/Cot2 ДНК (фракция высокоповторенной ДНК) для проведения полноценной супрессионной гибридизации *in situ* с цельнохромосомными ДНК-пробами не представляется возможным. Ранее нами была разработана модификация супрессионной гибридизации *in situ* для использования с микродиссекционными ДНК-пробами хромосом червей рода *Macrostomum* (Zadesenets et al., 2017a, b, 2020). Такой вариант супрессионной гибридизации *in situ* давал специфическое окрашивание эухроматиновых районов исходной хромосомы, более интенсивный сигнал в районах структурного гетерохроматина, обогащенных повторенными последовательностями, гомологичными ДНК, входящей в состав используемой

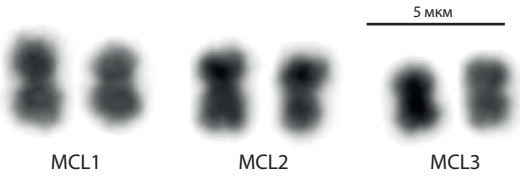

Рис. 1. Кариотип *M. cliftonensis* (2*n* = 6), состоящий из трех пар метацентрических хромосом со схожими размерами и морфологией.

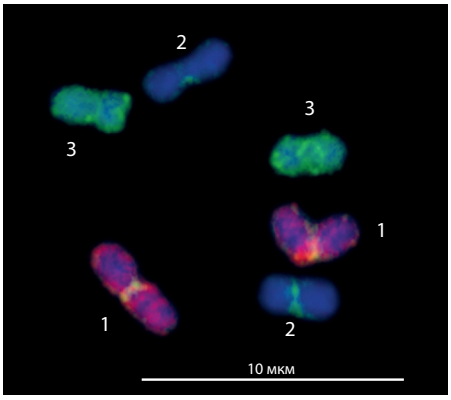

Рис. 2. Флуоресцентная гибридизация *in situ* цельнохромосомных ДНК-проб, специфичных хромосомам 1 (красный сигнал) и 3 (зеленый сигнал) *M. cliftonensis* с метафазными хромосомами *M. cliftonensis*. Цифрами указаны номера хромосом.

Рис. 3. Кариотип *M. mirumnovem* (2*n* = 9), состоящий из трех крупных хромосом MMI1–MMI2 и трех пар мелких хромосом MMI3–MMI5.

ДНК-пробы, и менее интенсивное окрашивание районов других хромосом, содержащих диспергированные повторенные последовательности.

Результаты и обсуждение

Хромосомы лабораторной аутбредной культуры червей *M. cliftonensis*. Перед проведением микродиссекции для получения цельнохромосомных ДНК-проб из хромосом *M. cliftonensis* было проведено повторное кариотипирование 100 особей лабораторной культуры, поддерживаемой в ИЦиГ СО РАН. Установлено, что все проанализированные метафазные пластинки у всех исследованных особей имели стандартный для *M. cliftonensis* кариотип 2*n* = 6, состоящий из трех пар метацентрических хромосом (рис. 1).

Создание и тестирование цельнохромосомных микродиссекционных ДНК-проб из хромосом *M. cliftonensis*. Для генерации цельнохромосомных ДНК-проб из хромосом *M. cliftonensis* на покровном стекле (60 мм × × 2 мм × 0.17 мм) был приготовлен препарат метафазных хромосом. После его высушивания он был ополоснут в фосфатном буфере (pH = 7.2) и немедленно покрашен красителем Гимза, подсушен так, чтобы метафазные хромосомы оставались мягкими, легко собирались со стекла оттянутой силиконизированной стеклянной иглой, управляемой микроманипулятором, не разваливаясь на фрагменты. Такой вариант подготовки хромосом для микродиссекции уменьшал деградацию ДНК и позволял проводить количественный сбор хромосомного материала. Поочередно все хромосомы с выбранной метафазной пластинки были собраны и перенесены в коллекционные капли в оттянутых силиконизированных кончиках пастеровских пипеток (диаметр оттянутого кончика составлял около 40 мкм). Микродиссекцию проводили на инвертированном микроскопе AxioVert10, оборудованном двумя микроманипуляторами, один из которых управлял оттянутой стеклянной иглой, а другой служил для позиционирования пастеровской пипетки с оттянутым кончиком во время переноса диссектированного материала. Для обеспечения оптимального по направлению подвода иглы к диссектируемой хромосоме на микроскопе был установлен вращающийся скользящий столик (ZEISS, Германия). После переноса диссектированного материала хромосом в пастеровские пипетки материал помещали в пробирки в 10 мкл реакционной смеси (Zadesenets et al., 2016). Для гарантии полного переноса материала оттянутый кончик пастеровской пипетки обламывали в пробирке. Далее подготовку ДНК для амплификации и саму амплификацию осуществляли согласно стандартному протоколу (Zadesenets et al., 2016, 2017a, b, 2020). Продукт ПЦР метили и проводили двухцветную супрессионную гибридизацию *in situ* для оценки качества ДНК-проб и определения ДНК-проб, полученных из гомологичных хромосом.

Все полученные ДНК-пробы при проведении супрессионной гибридизации *in situ* окрашивали хромосомы соответствующей исходной пары, а также давали сигнал в прицентромерных районах других хромосом (рис. 2), что объясняется неполной супрессией гибридизации повторенных последовательностей. ДНК-библиотеки, приготовленные из материала гомологичных хромосом, были объединены. ДНК-пробы, приготовленные на основе таких объединенных ДНК-библиотек, при проведении супрессионной гибридизации *in situ* давали более интенсивный и более специфический сигнал на исходной хромосоме. Они также продолжали более интенсивно окрашивать прицентромерные районы остальных хромосом. Интенсивность окрашивания эухроматиновых районов других хромосом не увеличилась. Проведение двухцветной супрессионной гибридизации *in situ* полученных ДНК-проб не выявило транслокаций хромосомных районов у *M. cliftonensis*, подтверждая заключение о высокой стабильности кариотипа *M. cliftonensis*, сделанное на основании результатов рутинного кариотипирования.

Создание и тестирование цельнохромосомных ДНК-проб из хромосом *M. mirumnovem*. Так как особи вида *M. mirumnovem* показали высокое кариотипическое разнообразие (Zadesenets et al., 2020), то для создания ДНК-проб были выбраны хромосомы метафазной пластинки, соответствующей наиболее часто встречающемуся кариотипу 2*n* = 9 (рис. 3). При создании микродиссекцион-

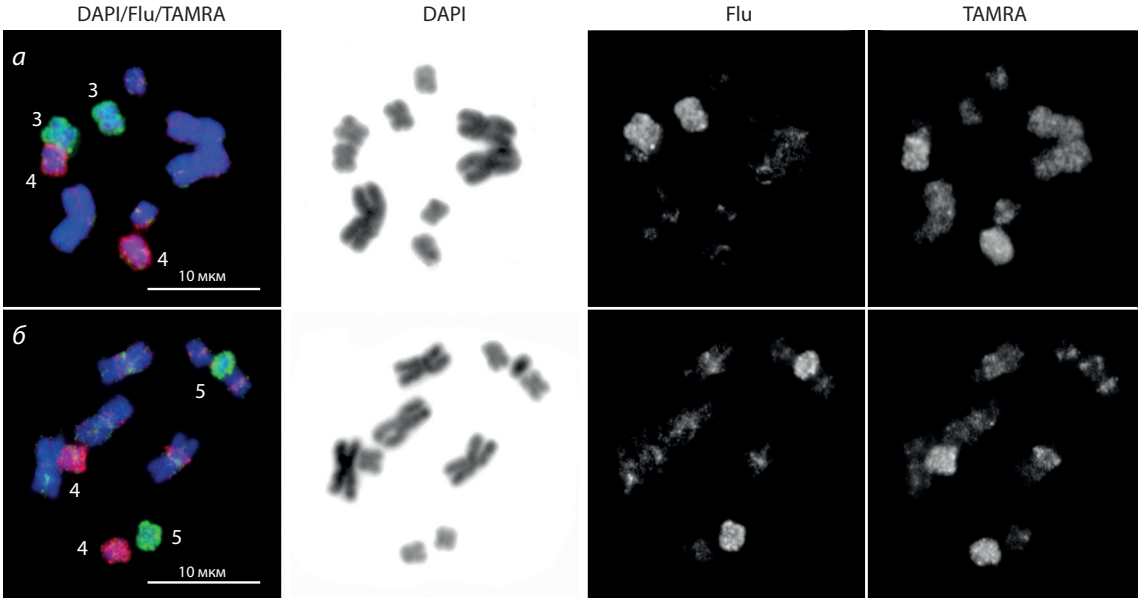

Рис. 4. Флуоресцентная гибридизация *in situ* цельнохромосомных ДНК-проб с метафазными хромосомами *M. mirumnovem*. *а* – ДНК-пробы, полученные из пар хромосом MMI3 (зеленый сигнал) и MMI4 (красный сигнал); *б* – ДНК-пробы, полученные из пар хромосом MMI4 (красный сигнал) и MMI5 (зеленый сигнал). Цифрами указаны номера хромосом.

ных ДНК-проб были соблюдены те же принципы и технические решения, которые были реализованы при получении цельнохромосомных ДНК-проб из хромосом *M. cliftonensis*. Отдельно был собран материал всех девяти хромосом метафазной пластинки, амплификацией их ДНК получены ДНК-пробы, проведена FISH с метафазными хромосомами *M. mirumnovem* и определены пары ДНК-проб, специфичные гомологичным хромосомам. Такие микродиссекционные ДНК-библиотеки были объединены и в дальнейшем использованы для производства цельнохромосомных ДНК-проб. В результате комплект ДНК-проб включал четыре цельнохромосомные ДНК-пробы из пар хромосом MMI2–MMI5 и ДНК-пробу из одной копии хромосомы MMI1.

Цельнохромосомные ДНК-пробы, полученные из маленьких метацентрических хромосом MMI3–MMI5, интенсивно и специфически окрашивали исходные хромосомы, давали сигнал в прицентромерных районах других хромосом, слабо неспецифически окрашивали эухроматиновые районы других маленьких метацентриков. Однако паттерн окрашивания крупных хромосом оказался более сложным. Супрессионная *in situ* гибридизация ДНК-проб из хромосом MMI3–MMI5 неравномерно и менее интенсивно окрашивала разные районы хромосомы MMI2, и еще менее интенсивно и равномерно – разные районы хромосомы MMI1 (рис. 4).

Супрессионная гибридизация *in situ* ДНК-проб, полученных из хромосом MMI1 и MMI2, интенсивно окрашивала исходные хромосомы. Однако окрашивание хромосом было неравномерным. На слабоконденсированных хромосомах участки интенсивной флуоресценции чередовались с менее интенсивно окрашенными районами. Неожиданным результатом является очень слабый флуоресцентный сигнал, который супрессионная гибридизация *in situ* микродиссекционных ДНК-проб, происходящих из крупных метацентрических хромосом, дала на мелких метацентрических хромосомах. Мы полагаем, что полученные паттерны окрашивания хромосом *M. mirumnovem* указывают на имевшую место в эволюционном сценарии этого вида полногеномную дупликацию с последующей реорганизацией генома, возможно, ведущей к его редиплоидизации. Сходный сценарий геномной и кариотипической эволюции ранее описан для другой филогенетической линии этого рода, включающей виды *M. lignano* и *M. janickei* (Schärer et al., 2020; Zadesenets et al., 2020).

Заключение

Предложенный и опробованный подход получения цельнохромосомных ДНК-проб позволил создать ДНК-пробы, эффективно выявляющие материал исходных хромосом, а также паралогичные районы хромосом, возникшие в результате недавней полногеномной дупликации и последующей реорганизации хромосом.

Список литературы / References

Ferguson-Smith M.A., Trifonov V. Mammalian karyotype evolution. *Nat. Rev. Genet.* 2007;8(12):950-962. DOI 10.1038/nrg2199.

Graphodatsky A.S., Yang F., O'Brien P.C.M., Serdukova N., Milne B.S., Trifonov V., Ferguson-Smith M.A. A comparative chromosome map of the Arctic fox, Red fox and dog defined by chromosome painting and high resolution G-banding. *Chromosome Res.* 2000;8(3):253-263. DOI 10.1023/A:1009217400140.

Nesterova T., Rubtsov N., Zakian S., Matveeva V., Graphodatsky A. Mapping of the silver fox genes: assignments of the genes for ME1, ADK, PP, PEPA, GSR, MPI, and GOT1. *Cytogenet. Cell Genet.* 1991;56(2):125-127. DOI 10.1159/000133065.

Rubtsov N., Graphodatsky A., Matveeva V., Radjabli S., Nesterova T., Kulbakina N., Zakian S. Silver fox gene mapping: conserved chromosome regions in the order Carnivora. *Cytogenet. Cell Genet.* 1988;48(2):95-98. DOI 10.1159/000132598.

Rubtsov N., Radjabli S., Gradov A., Serov O. Chinese hamster × American mink somatic cell hybrids: characterization of clone panel and

assignment of the genes for malate dehydrogenase-NADP-1 and malate dehydrogenase-NAD-1. *Theor. Appl. Genet.* 1981;60:99. DOI 10.1007/BF00282425.

Schärer L., Brand J.N., Singh P., Zadesenets K.S., Stelzer C.-P., Viktorin G.A phylogenetically informed search for an alternative Macrostomum model species, with notes on taxonomy, mating behavior, karyology, and genome size. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 2020;58:41-65. DOI 10.1111/jzs.12344.

Zadesenets K.S., Ershov N.I., Berezikov E., Rubtsov N.B. Chromosome evolution in the free-living flatworms: first evidence of intrachromosomal rearrangements in karyotype evolution of *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes, Macrostomida). *Genes.* 2017a;8:298. DOI 10.3390/genes8110298.

Zadesenets K., Jetybayev I., Schärer L., Rubtsov N. Genome and karyotype reorganization after whole genome duplication in free-living flatworms of the genus *Macrostomum*. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21:680. DOI 10.3390/ijms21020680.

Zadesenets K.S., Schärer L., Rubtsov N.B. New insights into the karyotype evolution of the free-living flatworm *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes, Turbellaria). *Sci. Rep.* 2017b;7:6066. DOI 10.1038/s41598-017-06498-0.

Zadesenets K.S., Vizoso D.B., Schlatter A., Konopatskaia I.D., Berezikov E., Schärer L., Rubtsov N.B. Evidence for karyotype polymorphism in the free-living flatworm, *Macrostomum lignano*, a model organism for evolutionary and developmental biology. *PLoS One.* 2016;11:e0164915. DOI 10.1371/journal.pone.0164915.

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-14-00211).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 11.12.2019. После доработки 17.03.2020. Принята к публикации 21.03.2020. Опубликована онлайн 20.05.2020.