

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

ЗІМІНА ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 576.353:576.316:57.088:57.044:575.113

**СТВОРЕННЯ МОДЕЛЬНИХ СИСТЕМ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСІВ
СЕГРЕГАЦІЇ І РЕКОМБІНАЦІЇ ГОМОЛОГІЧНИХ ХРОМОСОМ НА
РОСЛИНАХ *ARABIDOPSIS THALIANA* ТА *SECALE CEREALE***

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано у відділах регуляторних механізмів клітини і молекулярної генетики Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, м. Київ.

Науковий керівник: кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Алхімова Олена Георгіївна
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
старший науковий співробітник відділу молекулярної біології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Дубровна Оксана Василівна
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
старший науковий співробітник відділу генетичного поліпшення рослин

кандидат біологічних наук,
Банникова Марія Олександрівна
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН
України, старший науковий співробітник відділу
молекулярної генетики

Захист дисертації відбудеться « 1 » лютого 2018 року об 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 26.202.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: вул. Академіка Заболотного, 148, м. Київ – 143, Україна, 03143.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148.

Автореферат розіслано « ____ » _____ 2017 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради К 26.202.01
кандидат біологічних наук

К.В. Листван

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Рівномірний розподіл генетичного матеріалу під час мітозу і мейозу є найбільш важливим моментом клітинного циклу. Правильне розходження хромосом необхідне для підтримання належного хромосомного набору від клітини до клітини, від покоління до покоління. Помилки під час сегрегації хромосом можуть призводити до хромосомної нестабільності, в результаті чого можуть виникати анеуплоїдні клітини, а також клітини з втратою гетерозиготності, що є характерними рисами раку у ссавців (Cheslock, 2005; Thompson, Compton, 2011). У рослинах геном відрізняється пластичністю, тому життєздатність генетично змінених клітин значно вища, ніж у тваринних організмів. До того ж, соматична клітина рослини зі спадковими генетичними змінами в змозі дати початок новому організму, як в природі, так і в умовах культури *in vitro*. Дослідження мінливості і стабільності геному у рослин представляє особливий інтерес як для фундаментальних, так і прикладних цілей. Наприклад, заміна мейозу мітозом може бути ключовим моментом клонального розмноження через насіння, яке має потенційне революційне застосування в поліпшенні сільськогосподарських культур (Erfurth, 2009). Пригнічення гомологічної рекомбінації під час мейозу відкриває можливість до зворотної селекції, нового методу, що дозволяє отримати гомозиготні лінії від гетерозиготних форм рослин (Dirks et al., 2009).

Поряд з основними існує ряд змінених та атипових форм поділу клітин, серед яких особливу увагу привертає соматична редукція та/або соматичний мейоз. Спільною ознакою даних атипових поділів є розходження гомологічних хромосом або поділ їх на дві гаплоїдні групи в соматичних клітинах (Sybenga, 2000; Nuti Ronchi et al., 1992a/b). Багато авторів роблять різні припущення щодо ролі цього явища в природі, наприклад, контролюючи рівень плоїдності, воно може спричинити мозаїчність. Випадки соматичної редукції хромосом можуть бути складовими етапами процесів дедиференціації клітин або соматичного ембріогенезу, а також ознакою еволюційних функцій в культурах *in vivo* та *in vitro* у рослин (Chen, 2001; Giorgetti, 1995). Але до сьогодні немає чіткої інформації про поведінку гомологічних хромосом в процесі соматичної сегрегації, генетичні наслідки і долю клітин, що виникають в результаті цієї події. Щоб відповісти на ці запитання, постає необхідність створення адекватної модельної системи для вивчення даного явища. Особливо важливим є пошук і створення маркерів для дискримінації гомологічних хромосом, що дало б можливість дослідити розподіл хромосом материнського та батьківського геномів під час соматичної редукції, визначити наявність рекомбінації між гомологічними хромосомами, а також з'ясувати внесок даного явища в процес формування анеуплоїдних клітин і оцінити можливість його використання в селекції для отримання гомозиготних батьківських ліній з гетерозиготної форми рослин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконувалась у відділах регуляторних механізмів клітини і молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України в рамках цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАНУ “Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій”

“Молекулярна організація та еволюція субтеломерного гетерохроматину жита *Secale cereale* L.: стратегія використання окремих хромосом” (2010-2011), міжнародної рамкової програми FP7-212019 TriticiceaeGenome from the European Union Commission (2011-2013); а також в рамках державних бюджетних тем “Вплив амітозину і ізатізону та їх похідних на резистентність організму” (№ держреєстрації 0106U005433, 2007-2011), “Розробити комплексні препарати на основі ізатізону і вивчити молекулярно-клітинні основи їх дії” (№ держреєстрації 011U007699, 2012-2016), і частково в рамках теми “Вивчення молекулярно-генетичних змін при мієлопроліферативних захворюваннях і їх використання у клітинній діагностиці” (№ держреєстрації 0110U006129, 2010-2014).

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було створення експериментальних моделей рослин і дослідження процесів сегрегації і рекомбінації гомологічних хромосом в нормі та за індукції порушень під час поділу за допомогою цитогенетичних та молекулярно-генетичних маркерів. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Створення трансгенних рослин двох різних екотипів *A. thaliana* з векторами, що містять послідовності селективних та репортерних генів, визначення і вибір ДНК-маркерів для ідентифікації хромосом кожного з екотипів.
2. Створення гібридів *A. thaliana* і розроблення ефективної системи регенерації рослин в культурі *in vitro*.
3. Індукція соматичної редукції в культурі *in vitro* *A. thaliana* та отримання регенерантів.
4. Аналіз регенерантів за допомогою системи ДНК-маркерів і цитогенетичний аналіз калюсних клітин.
5. Ідентифікація хромосом *S. cereale* за допомогою цитогенетичних маркерів і проточного каріотипування.
6. Визначення сортів *S. cereale* та послідовностей ДНК для дослідження механізмів сегрегації і рекомбінації хромосом.

Об'єкт дослідження – сегрегація і рекомбінація хромосом рослин в культурі *in vitro* та *in vivo*.

Предмет дослідження – атипові поділи, що призводять до втрати гетерозиготності в клітинах *in vitro* та *in vivo*.

Методи дослідження: культура тканин *in vitro*, генетична трансформація рослин за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*, молекулярно-біологічні методи (виділення тотальної ДНК, ПЛР і SSLP – аналіз), біохімічний метод (тест визначення активності β -глюкоронідази), цитогенетичний аналіз (визначення мітотичного індексу та відсотку хромосомних аберацій), флуоресцентна гібридизація *in situ* на метафазних хромосомах, метод проточної цитометрії, методи біологічної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше запропоновано і створено рослинні модельні системи на основі *A. thaliana* та *S. cereale*, що мають систему молекулярно-генетичних і цитогенетичних маркерів, за допомогою яких можливо проводити широкий аналіз поведінки геномів і гомологічних хромосом в культурі *in vitro* та *in vivo* під час поділу та візуалізувати процеси сегрегації і рекомбінації хромосом.

Вперше отримано рослини-регенеранти *A. thaliana* зі втратою гетерозиготності при культивуванні *in vitro* гетерозиготного модельного гібриду на середовищі з ПФФА (18 мг/л), що свідчить про індукцію мітотичної рекомбінації гомологічних хромосом за допомогою ПФФА.

Вперше вдалося відсортувати хромосому 1R за допомогою проточної цитометрії у сорту “Життєдайне” *S. cereale*, що створює передумови для пошуку нових житоспецифічних та хромосом-специфічних маркерів.

Визначено сорти *S. cereale*, в яких FISH аналіз із використанням житоспецифічних тандемних повторів (pSc200, pSc250, pSc119.2.), послідовностей рибосомної та мікросателітної ДНК дозволяє розрізнити індивідуальні хромосоми та їхні плечі.

Розглянуто питання можливості використання явища соматичної редукції гомологічних хромосом у гетерозисній селекції для отримання гомозиготних ліній.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблена модельна система на основі гібридів *A. thaliana* може бути використана для вивчення поведінки і успадкування окремих хромосом материнського і батьківського геномів із використанням хромосом-специфічних ПЛР-маркерів в експериментальних дослідженнях механізмів та шляхів регуляції процесів сегрегації та рекомбінації хромосом. Розробка системи FISH-маркерів індивідуальних хромосом для ряду сортів *S. cereale* створює певне підґрунтя для використання цих сортів в дослідженнях процесів сегрегації та рекомбінації гомологічних хромосом на моделі жита посівного. Виділення індивідуальних хромосом жита методом флуоресцентного сортигу відкриває можливості для створення геномних бібліотек окремих хромосом, які в подальшому можуть бути використані для геномного аналізу та вирішення практичних завдань селекції.

Особистий внесок здобувача.

Написання огляду літературних джерел та експериментальної частини роботи було здійснено особисто здобувачем. Особистий внесок здобувача полягає у проведенні інформаційного пошуку та аналізу літературних даних за темою дисертації, виконанні експериментальної частини, здійсненні статистичної обробки результатів, обговоренні і аналізі результатів, формулюванні висновків та підготовці рукописів статей спільно з науковим керівником та співавторами.

Також висловлюю подяку к.б.н. М.Ф. Парію, в лабораторії якого було виконано частину роботи зі створення трансгенних рослин *A. thaliana* та розроблено систему регенерації рослин в культурі *in vitro*.

Апробація результатів дисертації.

Результати досліджень були представлені на звітних наукових конференціях молодих вчених ІМБіГ “5th-6th International IMBG Conference of Young Scientists” (Київ, 2011-2012), міжнародних конференціях “Green Plant Breeding Technologies” (Відень, 2010), “Plant Gene Discovery Technologies” (Відень, 2011), міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів і молодих вчених “ЛОМОНОСОВ” (Москва, 2011), “22th Wilhelm Bernhard Workshop on Cell Nucleus” (Pira, 2011), “18th International Chromosome Conference” (Манчестер, 2011), “7th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding” (Гент, 2011), 2-й

міжнародної наукової конференції молодих вчених “Генетика и селекция растений, основанная на совр. генетич. знаниях и технологиях” (Звенигород, 2011), на міжнародному конгресі з клітинної біології “Exploring cellular structure and function”, (Прага, 2016); пленарна доповідь представлена на “24th Wilhelm Bernhard Workshop on Cell Nucleus” (Відень, 2015).

Публікації.

За результатами дисертаційної роботи опубліковано 18 робіт, що включають 7 статей (з яких 5 у фахових виданнях, що входять до переліку ДАК/ МОН України, 3 включені до міжнародних наукометричних баз даних) та 11 тез доповідей у збірниках матеріалів конференцій.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 209 джерел, з них англomовних 195. Робота викладена на 135 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстрована 21 рисунком та містить 10 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У розділі розглянуто загальні відомості про процес сегрегації хромосом, сучасні уявлення про його молекулярні механізми, а також описане явище соматичної редукції і наведені його приклади. Розглянуто методологію для дослідження поведінки геномів та перебудов хромосом рослин. Наведено сучасні методичні підходи аналізу рослинних геномів, можливості маркування і ідентифікації окремих хромосом за допомогою різних типів ДНК- та білкових маркерів, FISH-аналізу. Основну увагу зосереджено на використанні рослинних моделей, культурі *in vitro*, індукції, молекулярних механізмах та генетичних наслідках соматичної редукції, наявності генетичних детермінант, зовнішніх факторів і внутрішніх агентів, що обумовлюють виникнення атипових поділів. Висвітлено можливість реалізації концепції застосування соматичної редукції в отриманні гомозиготних ліній.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Система Arabidopsis thaliana: В якості вихідного матеріалу в експериментах з *A. thaliana* використовували насіння екотипів Columbia (№1093) і Landsberg erecta (№1298) з Нотінгемського центру зразків (NASC, Nottingham, UK). Рослини екотипу Columbia трансформували конструкцією, яка містила у своєму складі кодуючі послідовності селективного гена стійкості до канаміцину (*nptII*) і репортерного гену *gusA*; екотип Landsberg erecta - конструкцією з геном стійкості до фосфінотрицину (*bar*) і геном зеленого флуоресцентного білка *gfp*. Для трансформації екотипів використовували штам *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 з бінарними векторами pCambia 2301 і pICH5290 відповідно (вектори

надані к.б.н. Симоненко Ю.В., Інститут Клітинної Біології та Генетичної Інженерії НАН України). Рослини трансформували згідно методу (Zhang X. et al., 2006). Аналіз експресії гена *gusA* визначали за допомогою гістохімічної реакції згідно Jefferson (1987). Детекція експресії гена *gfp* проводилась ультрафіолетовим випромінюванням (395 нм) за допомогою мікроскопа Zeiss AxioStar Plus, фільтр Filter Set 44 (Carl Zeiss). Для стабільної експресії трансгенів у поколіннях і отримання рослин, гомозиготних по вставках, було проведено 3 цикли самозапилення і пророщування насіння на селективних середовищах. Гібрид між трансгенними лініями отримували шляхом кастрації та примусовий реципрокний гібридизації за допомогою біокулярного мікроскопу.

З метою отримання високої частоти калусоутворення і регенерації рослин було перевірено дві системи: за методикою Chen Yihua et. al. (2000) та Miho Ikeda-Iwai et al. (2003). Ефективність системи визначали за частотою регенерації рослин та часом отримання зрілих рослин. Частоту регенерації рослин визначали як співвідношення кількості отриманих регенерантів до загальної кількості висаджених експлантів *A. thaliana* (Загричук та ін., 2013). Для визначення оптимальної концентрації індуктора атипових поділів ПФФА перевірили діапазон концентрацій від 1 мг/л до 50 мг/л.

Підбір SSLP-маркерів та праймерів до їх послідовностей проводили за допомогою бази даних на веб-сайті TAIR (<https://www.arabidopsis.org>).

Тотальну ДНК для проведення реакції ПЛР виділяли з рослинних тканин методом СТАВ (Sambrook, Fritsch, Maniatis, 2012). Якість і концентрацію ДНК визначали на спектрофотометрі SPECTRA max PLUS384. Суміш ПЛР на одну реакцію (15 мкл) містила: 1,5 мкл 10x реакційного буфера (SibEnzyme), 2,5 мМ MgCl₂, 0,4 мкМ кожного праймера, суміш дНТП (250 мкМ кожного), 0,2 U Taq-полімерази (SibEnzyme) і 30-40 нг геномної ДНК. Температуру гібридизації праймерів встановлювали експериментальним шляхом для кожної пари праймерів окремо, а потім в мультиплексній комбінації. Електрофорез проводили за стандартною процедурою в 4% агарозному гелі (Sambrook, Fritsch, Maniatis, 2012).

Отримані трансгенні гібриди вводились в культуру за протоколом Chen Yihua et. al. (2000) з власними модифікаціями і з додаванням ПФФА та без нього. Отримані регенеранти аналізували за допомогою підібраних SSLP-маркерів. Для цитогенетичного аналізу культивованих клітин готували тимчасові давлені препарати меристеми коренів та калюсних клітин за загальновизнаними методиками (Пухальський, 2007). Давлені препарати переглядали під флуоресцентним мікроскопом Carl Zeiss Axio Scope A.1 з фільтром для DAPI.

Система Secale cereale. Матеріал для аналізу складався з п'яти сортів жита *Secale cereale*: Petkus і Imperial (John Innes Centre, Norwich, UK), Selgo (IEB, Czech Republic), Онохойская, Життедайне (ІМБГ колекція, Київ).

Збір, фіксація матеріалу, приготування давлених препаратів та FISH-аналіз були адаптовані за протоколами, розробленими Schwarzacher та Heslop-Harrison (2000). В якості проб використовували високоповторювані послідовності pSc200, pSc250 та pSc119, мікросателітний повтор GAA і повтори ДНК 45S рДНК (pTa71) та 5S рДНК (pTa794) (Vershinin et al., 1995). Проби мітили digoxigenin-11-dUTP

(Roche Molecular Biochemicals) та biotin-16-dUTP (Roche Molecular Biochemicals) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з використанням M13 праймерів.

Препарати досліджували за допомогою мікроскопу Olympus BX60, обладнаного наборами оптичних флуоресцентних фільтрів. Зображення отримували окремо за допомогою чорно-білої CCD-камери та ПК з програмою Metasystems ISIS v.5.2.8 software («Metasystems», «Altussheim», Німеччина).

Синхронізацію клітинного циклу та акумулювання метафаз в кінчиках корінців проводили за методом (Dolezel, 2007). Суспензію хромосом із синхронізованих кореневих меристем готували за методикою Vrana et al. (Vrana et al., 2000; Vrána et al., 2016). Аналіз суспензії хромосом методом проточної цитометрії і ідентифікація відсортованих хромосом проводилась згідно протоколу (Kubalakova, 2003).

Статистична обробка результатів. В клітинах калюсу та меристеми коренів визначали мітотичний індекс (MI) та частоту мейозоподібних поділів (ЧМПП). Достовірність відмінностей між дослідними варіантами і контролем для мітотичного індексу (MI) визначали за методом χ^2 , а для частоти мейозоподібних поділів (ЧМПП) за точним критерієм Фішера (McDonald, 2014). Графік залежності частоти калюсоутворення від концентрацій ПФФА будували за допомогою пакету програм Excel та PAST3, використовуючи поліноміальний регресійний аналіз. Надійність регресійної моделі визначали за коефіцієнтом кореляції R та критерієм Фішера (McDonald, 2014; McCleery, Watt, Hart, 2007), достовірність отриманих результатів вважали статистично значимими за $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Система *A. thaliana*. Створення трансгенних ліній та їх схрещування.

Для дослідження соматичної сегрегації та рекомбінації гомологічних хромосом необхідна відповідна модельна система, яка має характеризуватися сукупністю певних ознак. Ключові моменти дослідження – це процес рекомбінації гомологічних хромосом і закономірності їх розподілу між дочірніми клітинами. Для цього в ідеалі система повинна мати невелику кількість хромосом, які можливо відрізнити за допомогою відповідних маркерів на цитогенетичному рівні, а також молекулярні (фенотипові) маркери, за допомогою яких можна простежити наслідування ознак, що належать до різних геномів. Модельний гібрид між екотипами Columbia і Landsberg erecta *A. thaliana*, маркованими трансгенами, за допомогою ДНК-маркерів дозволить ідентифікувати генотип культивованих клітин та/або рослин-регенерантів, отриманих з клітин, що утворилися в результаті соматичної сегрегації. Вивчення генетичних наслідків даного явища також передбачає спостереження поведінки гомологічних хромосом методом цитогенетичного аналізу в культивованих клітинах і у регенерантів модельного гібрида. Для здійснення поставлених цілей виконувались наступні етапи роботи (рис. 1).

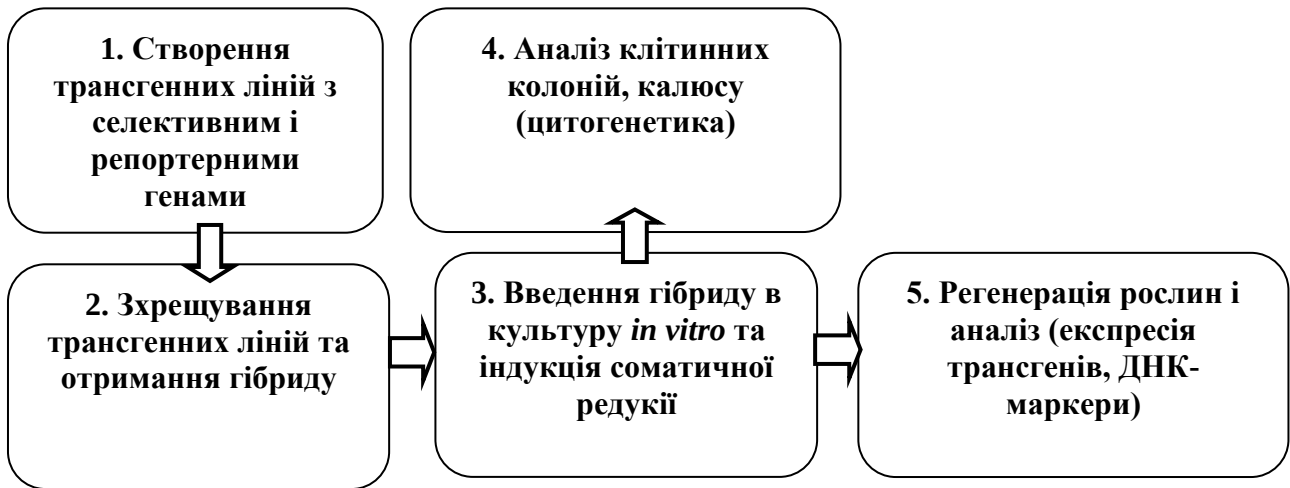


Рис. 1. Схема експериментів з вивчення явища соматичної редукції хромосом

Для отримання гібриду між екотипами *Columbia* і *L. erecta* необхідні фенотипові маркери, які б дозволяли легко і зручно визначати і відбирати гібридне насіння під час примусової гібридизації, виключаючи таким чином насіння, що виникло внаслідок самозапилення. З цією метою отримано лінії *A. thaliana* екотипу *Columbia*, що містять селективний ген стійкості до канаміцину (*nptII*) і репортерний ген β -глюкоронідази *gusA*, і лінії екотипу *L. erecta* з трансгенами стійкості до фосфінотрицину (*bar*) і репортерним геном *gfp*. Для перевірки стабільної експресії трансгенів у поколіннях і отримання рослин, гомозиготних за вставками, було проведено три цикли самозапилення і пророщування насіння на селективних середовищах. Проростки і дорослі рослини отриманих трансформованих ліній відрізнялися за рівнем експресії *gusA* (рис. 2). GUS-активність була виявлена в клітинах листів і меристеми коренів. Для створення гібридів відбирали лінії з інтенсивним забарвленням. Всього отримано 6 гомозиготних ліній з високим рівнем експресії гена *gusA*. Продукти експресії гена *gfp* виявляли в тканинах листка трансформованих рослин при опроміненні ультрафіолетовим світлом (рис. 3). Одна з трансформованих рослин виявилась із сильною експресією гена *gfp*.

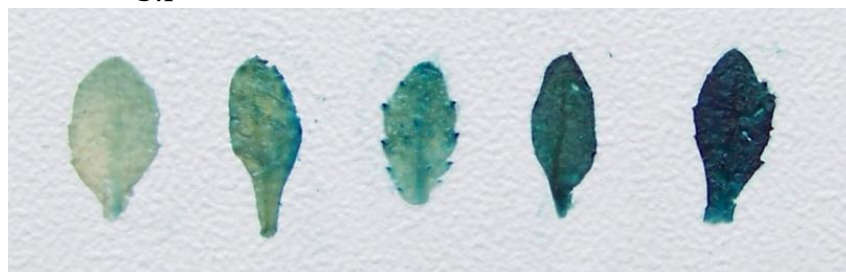


Рис. 2. Гістохімічний аналіз експресії гена *gusA*. 1-й лист зліва - дикий тип, 2 - 5-й - трансформанти, інтенсивність забарвлення свідчить про силу експресії гена *gusA*.

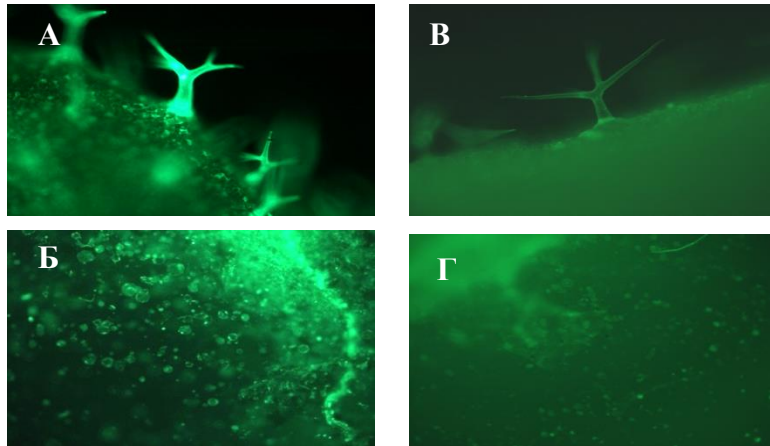


Рис. 3. Аналіз експресії гена *gfp* в тканинах листа рослин під мікроскопом Zeiss Axiostar Plus, збільшення 100 ×. Зліва (А, Б) - трансформована рослина, справа (В, Г)- дикий тип.

Оптимізація умов культивування клітин *in vitro* та отримання регенерантів. Під час вивчення поділу клітин в культурі рослин, Chen (2001) і Giorgetti (1995) припустили, що випадки соматичної сегрегації хромосом пов'язані з клітинним дедиференціюванням та соматичним ембріогенезом. Вивчали різні аспекти як спонтанної та індукованої соматичної сегрегації хромосом в рослинах *in vitro*. На цьому етапі ми оптимізували склад живильного середовища для *A. thaliana*, щоб підвищити частоту калусоутворення і регенерації рослин. Для цього було апробовано дві методики культивування *in vitro* для отримання рослин-регенерантів: I) Chen Yihua et. al., 2000; II) Miho Ikeda-Iwai et al., 2003. Головними чинниками калусоутворення і регенерації в першій системі були фітогормони, в другій – дія осмотичного стресу, створена шляхом додавання в середовище 0,3 М NaCl (рис. 4).

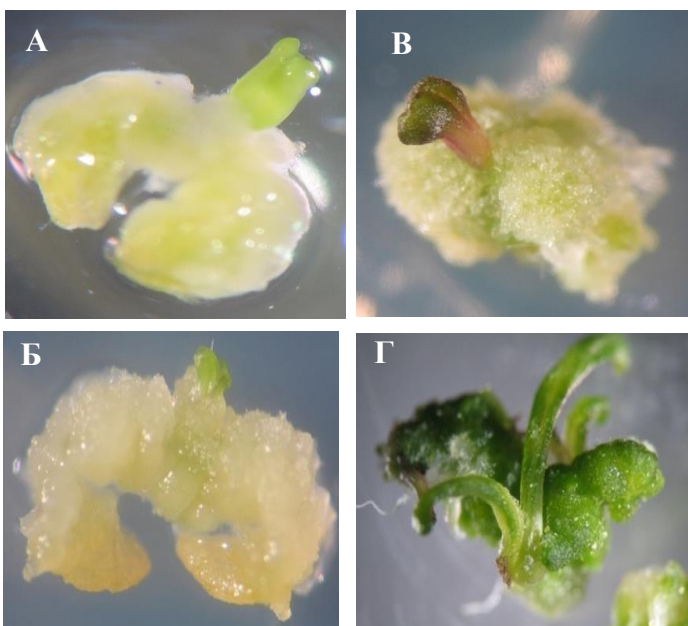


Рис. 4. Регенерація рослин *A. thaliana* з калусної тканини в культурі *in vitro*. А, Б - Калус з соматичними ембріодами формувалася на експлантах, які культивували на твердому середовищі В5 без фітогормонів з 0,3 М NaCl протягом 4 годин, а потім протягом 20 днів - на твердому середовищі В5, до якого додавали 1мг/л 2,4-Д без NaCl. Columbia і Landsberg erecta відповідно. В, Г - Калус з регенерантами на експлантах, які культивували 7 днів на твердому середовищі С-1 з фітогормонами для ініціації калусогенезу за системою I, а потім пересаджували на М-2 для ініціації регенерації.

Перша система регенерації була обрана для подальшої роботи, оскільки вона мала вищу частоту регенерації пагонів. Крім того, велике значення мала техніка отримання експлантів. Як виявилось, робота з кореневими експлантами (I система) була простішою і забирала менше часу. Також, екотипи *A. thaliana* відрізнялися за частотою регенерації, яка в обох випадках для Columbia була нижчою, ніж для *L. erecta*. Однак, відмінності виявились статистично незначимі (табл. 1).

Таблиця 1

Частота утворення калюсу та регенерації пагонів двох екотипів *A. thaliana**

Еко-тип	Кількість експлантів, шт.	Кількість експлантів з калюсом, шт.	Частота утворення калюсу		Кількість експлантів з пагонами, шт.	Кількість пагонів, шт.	Частота регенерації	
			%	± Sp			%	± Sp
			I система					
Col	320	320	100	0,0	112	245	35	2,6
Ler	320	320	100	0,0	120	296	37,5	2,7
II система								
Col	120	120	100	0,0	15	15	12,5	3.0
Ler	120	120	100	0,0	18	18	15	3,2

*Таблиця містить узагальнені дані трьох незалежних експериментів, Sp-похибка частки. 1) при порівнянні частоти регенерації I-ї та II-ї систем для екотипу Col (Columbia) $\chi^2=21.51$, $P<0.01$; при порівнянні частоти регенерації I-ї та II-ї систем для екотипу Ler (Landsberg erecta) $\chi^2= 20.52$ $P<0.01$; при порівнянні частоти регенерації між екотипами Col і Ler для I-ї системи $\chi^2= 0.316$, $P>0.05$; при порівнянні частоти регенерації між екотипами Col і Ler для II-ї системи $\chi^2= 0.433$, $P>0.05$.

Підбір SSLP-маркерів і умови ПЛР. Для вивчення соматичної сегрегації хромосом важливим було простежити розподіл кожної хромосоми батьківського і материнського геномів гібриду *A. thaliana* між дочірніми клітинами. Тому ми підібрали SSLP-маркери таким чином, щоб вони розташовувалися на кожному плечі кожної хромосоми. Для 5-ї хромосоми було обрано по два маркери на кожне плече. Інформацію про послідовності праймерів, розмірів фрагментів та їхню локалізацію отримали з даних, опублікованих Bell та Ecker (1994) і бази даних TAIR. Для зіставлення фізичного розташування поліморфних маркерів даних екотипів була використана також функція «карта хромосом», доступна в базі даних TAIR (<http://www.Arabidopsis.org/JSP/ChromosomeMap/tool.jsp>) (рис. 5).

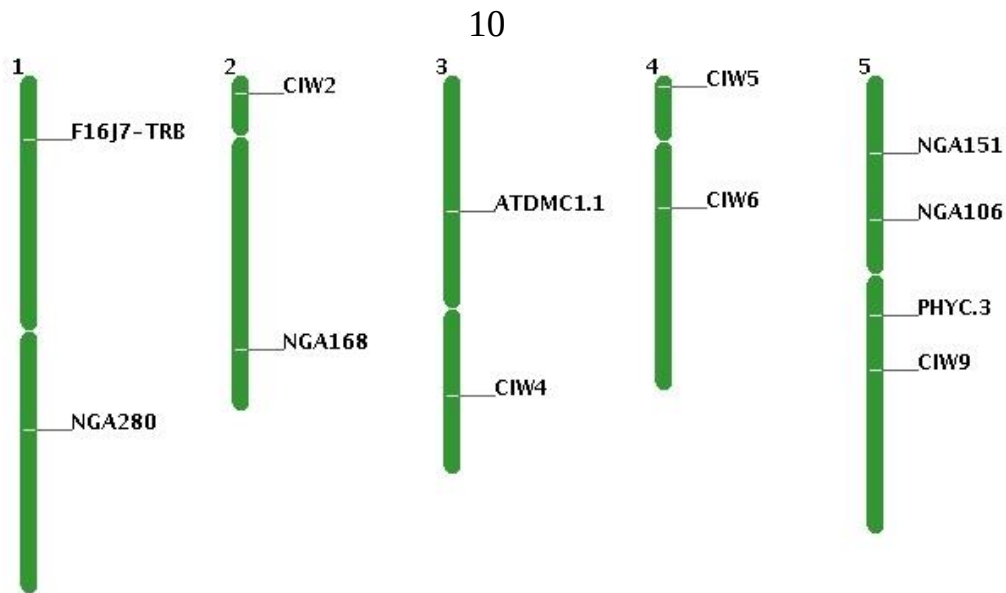


Рис. 5. Генетична карта, що показує розташування мікросателітів на хромосомах *A. thaliana*.

В результаті проведених експериментів з підбору умов ПЛР було встановлено, що двостадійна ПЛР з використанням двох температур гібридизації праймерів в кожному циклі, 45° С і 60° С, дозволяє ефективно ампліфікувати всі цільові фрагменти одночасно. Для одного з мікросателітів (5-й маркер, ATDMC1.1) як в екотипі *Columbia*, так і в гібриді не ампліфікується фрагмент розміром 2,2 тис. п. н., що може бути пов'язано з делецією ділянки хромосоми, що містить цей маркер, у даного екотипу. У подальшому передбачалось використання цього маркера в якості нуль-алеля. Оскільки різниця в розмірах фрагментів ДНК складала не менше 15 п.н., електрофорез продуктів ампліфікації в 4%-му агарозному гелі дозволяв чітко їх розрізняти. Нами були розроблені мультиплексні реакції для семи маркерів: дві - для двох маркерів кожна (F16J7-TRB + NGA280; PHYC.3 + CIW9) і одна - для трьох (ATDMC1.1+CIW4+ CIW6). Ця система мультиплексів дозволила мінімізувати витрати реактивів, кількість інформаційно-цінних смуг при аналізі в агарозному гелі, необхідних для візуалізації продуктів ПЛР, а також скоротити час досліджень. Результати роботи дали можливість прискорити та здешевити проведення масового генотипування рослин *A. thaliana*, екотипів *Columbia* і *L. erecta*.

Визначення концентрації ПФФА для індукції калюсоутворення та регенерації. Відомо, що однією з хімічних речовин, яка може впливати на мітоз та призводити до редукції числа хромосом, є пара-фтор-фенілаланін (ПФФА) (Banks, 1982; Захленюк, Костенюк, 1991; Ruvalcaba-Ruiz et al., 2012). На даному етапі вивчали вплив ПФФА на утворення калюсу в культурі клітин *A. thaliana*, культивованих *in vitro* на живильних середовищах, що сприяють регенерації рослин, а також на регенеративну здатність калюсу в присутності різних концентрацій ПФФА. Перевірили спектр концентрацій від 1 мг/л до 50 мг/л. Результати представлені на рис.6.

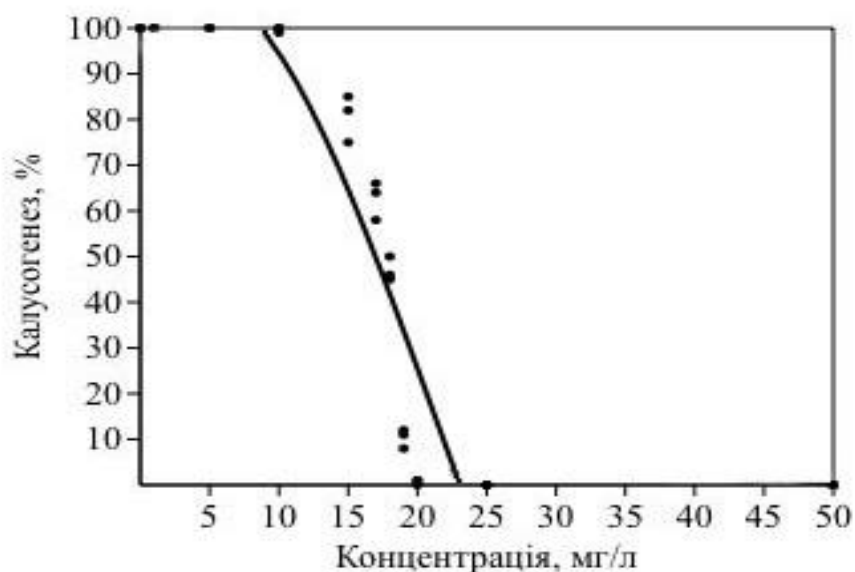


Рис. 6. Вплив ПФФА на частоту утворення калюсу корневих експлантів *A. thaliana* (поліноміальна крива 3-го порядку, $R^2 = 0.89$, $F=86.5$, $P < 0.01$).

На 7-й день в контролі без ПФФА на всіх експлантах утворився жовтуватий калюс. На середовищі з низькими концентраціями ПФФА 1 мг/л, 5 мг/л, 10 мг/л, не спостерігали помітного пригнічення росту калюсу і розвитку пагонів. Частота утворення калюсу в цих зразках не відрізнялась від контролю і дорівнювала 100%, проте, при вищих концентраціях ПФФА (20 мг/л, 25 мг/л, 50 мг/л), експланти біліли, калюс майже не утворювався і, як наслідок, не відбувалась регенерація. На середовищі з 15 мг/л ПФФА калюс утворювався повільніше, ніж на контрольному середовищі, з частотою близько 80% (рис.6).

Таблиця 2

Вплив ПФФА на частоту утворення калюсу та регенерацію пагонів*

Концентрація ПФФА, мг/л	Кіль-ть експлантів, шт.	Кіль-ть експлантів з калюсом, шт.	Частота утворення калюсу		Кіль-ть експлантів з пагонами, шт.	Кіль-ть пагонів, шт.	Частота регенерації	
			%	$\pm$ Sp			%	$\pm$ Sp
15	300	241	80,3	2,29	130	219	43,3	2,86
17	300	180	60,0	2,83	76	112	25,3	2,51
18	300	141	47,0	2,88	34	46	11,3	1,83
19	300	31	10,3	1,76	0	0	0,0	0,00
20	300	2	0,6	0,03	0	0	0,0	0,00
контроль	300	300	100,0	0,0	174	377	58,0	2,85

*В таблиці наведено дані, що узагальнюють результати трьох незалежних експериментів, Sp-похибка частки.

Виходячи з отриманих даних, ми перевірили ще три концентрації між 15 та 20 мг/л, щоб визначити максимальну дозу ПФФА, яка має помітний ефект на поділ клітин, але при якій можлива регенерація рослин. На середовищі з ПФФА в концентраціях 17 мг/л та 18 мг/л частота калюсоутворення була на рівні 60% та 47% (табл. 2).

Таким чином, ПФФА у концентраціях 15-19 мг/л помітно інгібує поділ клітин і утворення калюсу, однак здатність до морфогенезу частково зберігається. При концентрації ПФФА 19 мг/л і вище ріст калюсу різко уповільнюється або припиняється, що не дає можливості розвитку пагонів. Для подальших дослідів була вибрана концентрація 18 мг/л, оскільки за такої концентрації дія ПФФА на поділ клітин була достатньо помітною, проте не відбувалося повного пригнічення росту калюсу і регенерації рослин.

Створення гібридів та отримання регенерантів. Отримане гібридне насіння *A. thaliana* використовували для культивування клітин *in vitro* і отримання рослин-регенерантів на середовищі з ПФФА. Щоб відсіяти насіння, яке могло утворитися шляхом самозапилення, для гібридизації використали трансгенні лінії: Columbia і *L. erecta* (Зими́на и др., 2011). Після індукції регенерації з калюсу, що утворився на кореневих експлантах, було отримано 20 регенерантів на середовищі з ПФФА в концентрації 18 мг/л та 20 – з контрольного середовища, які в подальшому аналізували за допомогою SSLP маркерів.

Аналіз регенерантів за допомогою SSLP маркерів та цитологічний аналіз калюсних клітин. Генотипування рослин за допомогою 12-ти SSLP маркерів дало наступні результати (табл. 3.). Для всіх рослин-регенерантів, отриманих на контрольному середовищі, ампліфікувались фрагменти, характерні для обох батьківських ліній, тобто спостерігалась гетерозиготність за всіма досліджуваними локусами. 17 з 20 рослин, отриманих на середовищі з ПФФА, виявились також гібридними по всім маркерам.

Таблиця 3

Генотипування регенерантів за допомогою SSLP маркерів

Варіант	1 хромосома		2 хромосома		3 хромосома		4 хромосома		5 хромосома коротке плече		5 хромосома довге плече	
	маркер		маркер		Маркер		маркер		маркер		маркер	
	1	2	3	4	5(н/а)	6	7	8	9	10	11	12
Конт- роль 20 рослин	Col / Ler	Col / Ler	Col / Ler	Col / Ler	Ler	Col / Ler	Col / Ler	Col / Ler	Col/ Ler	Col / Ler	Col / Ler	Col / Ler
ПФФА 18 мг/л 3 рослини	Col	Ler	Col	Col	Ler	Col / Ler	Col / Ler	Col / Ler	Col / Ler	Col / Ler	Col	Col

Примітка: н/а - нуль алель, Col - алель від екотипу Columbia, Ler - алель від

екотипу *Landsberg erecta*.

Однак, для інших трьох рослин SSLP-аналіз по шести локусах з 12-ти показав ознаки, характерні тільки для материнської або тільки для батьківської ліній. Для всіх трьох рослин відбулася втрата гетерозиготності за одними і тими ж локусами, причому за маркерами 1-м, 3-м, 4-м, 11-м і 12-м зазначається однакова належність локусу до батьківського екотипу *Columbia*, а за 2-м – до материнського, *L. erecta* (рис.7). Цей збіг можна пояснити тим, що клони виникли з однієї клітини-попередника, яка за даними молекулярно-генетичного аналізу, набула іншу генотипову конституцію, відмінну від вихідних рослин, гібридних за всіма локусами.

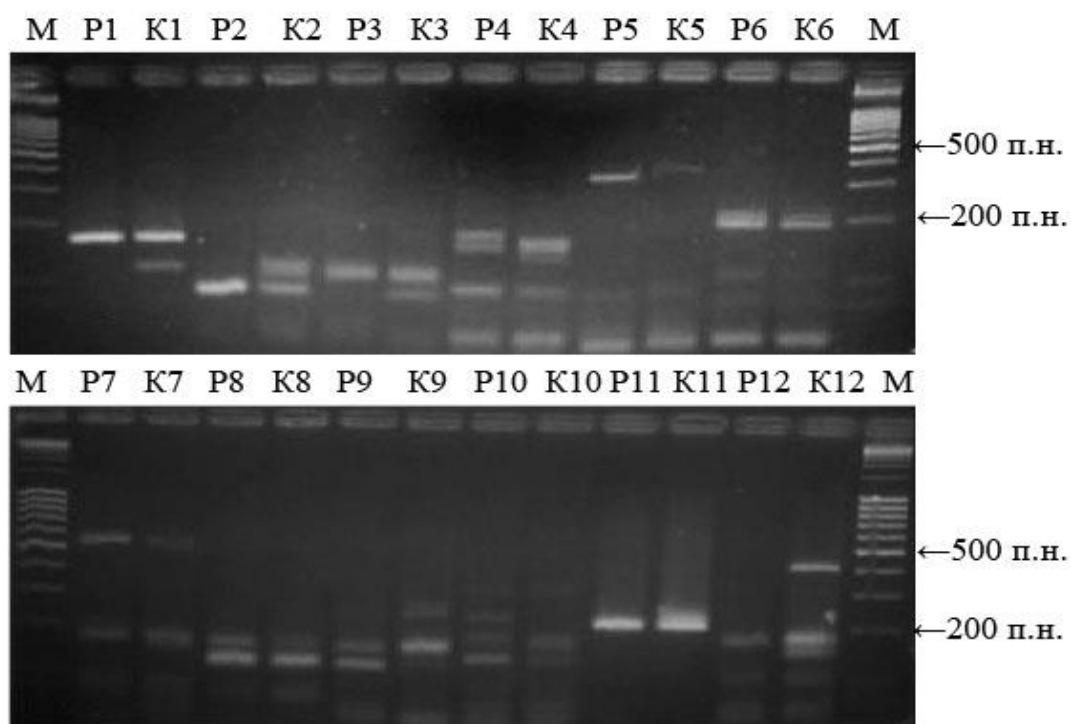


Рис. 7. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК з праймерами до послідовностей маркерних локусів. М-маркер MassRuler™ #SM0304, Р – регенерант, К – контроль, 1-12 – маркерні локуси.

Цитологічний аналіз клітин *A. thaliana*, культивованих на середовищі С-1 без ПФФА, виявив 1,9 % клітин та 2% на середовищі з ПФФА, які можна віднести до явища соматичної редукції (табл. 4). Зростання МІ в калюсних клітинах порівняно з інтактними рослинами слід було очікувати внаслідок дії фітогормонів і постійної проліферації клітин. Із додаванням ПФФА в концентрації 18 мг/л зменшувалася кількість проаналізованих анафаз у зв'язку із значним зниженням кількості мітозів в клітинах. Зниження МІ під впливом ПФФА скоріше відбувалось внаслідок його цитостатичної дії на клітини. Спостерігали бівалент-подібні структури, число яких дорівнювало п'яти, що відповідає числу бівалентів в мейозі у *A. thaliana* ($n = 5$), а також анафазні клітини з групами, в яких можна припустити розходження хромосом по 5, а не по 10, як має бути в мітозі у *A.*

thaliana ($2n = 10$) (рис. 8).

Таблиця 4

Результати порівняльного цитологічного аналізу калюсних клітин на середовищі з додаванням і без ПФФА

Тканина	Вивчено клітин	Вивчено поділів	Мітотичний індекс		Кількість клітин з МПП	ЧМПП	
			%	$\pm$ Sp		%	$\pm$ Sp
кінчики корінців (контроль)	3235	250	7,73	0,46	0	0	
калюс	3356	314	9,36*	0,50	6	1,9**	0,8
калюс з ПФФА	3600	200	5,56*	0,38	4	2**	0,9

Примітка: ЧМПП - частота мейозоподібних поділів, Sp - похибка частки, *- за критерієм χ^2 $P < 0.05$; ** - за точним критерієм Фішера $P < 0.05$.

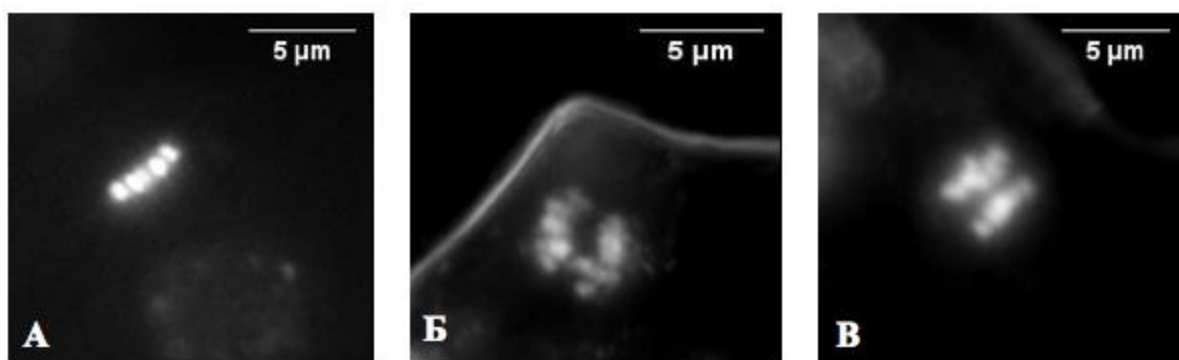


Рис. 8. Препарати хромосом калюсних клітин, культивованих на середовищі з ПФФА, на різних стадіях мітозу. А - метафаза з бівалент-подібними структурами і числом хромосом $n=5$; Б, В - клітини на стадії анафази з вдвічі зменшеним числом хромосом.

На основі отриманих нами даних неможливо однозначно сказати про те, яким чином поділилася клітина-попередник: чи відбувся в ній мейозоподібний поділ з розходженням гомологічних хромосом, або ж пройшов звичайний мітоз з розподілом хроматид по дочірнім клітинам. На нашу думку, в обох випадках наявність у регенерантів такого розподілу ознак, отриманих від гомозиготних батьківських ліній, може пояснити рекомбінація між двома гомологічними хромосомами. Явище мітотичної рекомбінації (МР) досліджено у багатьох живих організмів (LaFave, Sekelsky, 2009; Lee, et al., 2009), зокрема у вищих рослин (Puchta, Hohn, 2012), його пов'язують з важливими аспектами щодо стабільності геному: репарацією ДНК, хромосомними перебудовами, втратою

гетерозиготності. МР забезпечує механізм обміну гомологічними ділянками, які можуть бути розташовані як на сестринських хроматидах, так і на гомологічних хромосомах (Molinier et al., 2004). Відомо, що головною причиною спонтанних кросинговерів є подвійні розриви в ланцюзі ДНК (Lee et al., 2009; Gisler, Salomon, Puchta, 2002). Рекомбінаційна репарація розриву потребує матрицю-зразок, якою може стати гомологічна хромосома. Внаслідок такої події можуть виникати клітини, де відбулася генна конверсія або втрата однієї з алельних послідовностей в тих локусах, які беруть участь в соматичному кросинговері (Lee et al., 2009). Наші дані підтверджують таке припущення.

Гетерозиготність локусів 6-10 свідчить про одночасну наявність генетичного матеріалу від материнської та батьківської ліній. Отже, якщо припустити випадок мейозоподібного поділу з розходженням гомологів, то цей факт може свідчити про рекомбінацію між хромосомами. У випадку ж мітозу втрата одного алеля в локусах 1-4 та 11, 12 із одночасною наявністю алелів від обох батьків в інших локусах, очевидно, також потребує перебудов в хроматидах, які може забезпечити рекомбінація хроматид гомологічних хромосом. В результаті рекомбінаційних перебудов при розходженні хроматид гарантований неоднаковий розподіл генетичного матеріалу між дочірніми клітинами.

На контрольному середовищі без ПФФА на цитологічних препаратах спостерігали випадки аномального поділу соматичних клітин, проте нам не вдалося отримати рослини, в яких було б виявлено зміни генотипу, які свідчили б про розходження гомологічних хромосом по типу мейозу під час анафази (Zimina et al., 2016). Дані цитологічного аналізу (1,9%) говорять, що ймовірність отримати рослини, які утворились з відповідних клітин, дуже мала. Така різниця між контролем та експериментом може бути зумовлена саме дією ПФФА, який пригнічує поділ клітин та може збільшувати частоту аномальних мітозів в калюсі. Наші дані підтверджують гіпотезу, висловлену ще в 70-х роках Константиновим, який на основі власних досліджень впливу різних хімічних реагентів на мітоз у рослин припускав, що практично будь-який фактор, що затримує репродукцію (реплікацію) хромосом, а також мітотичну інтерфазу або профазу, може обумовлювати аномальні мітози: соматичну кон'югацію, хромосомну редукцію, мейозоподібні поділи. Однак, на його думку, важко виділити фактори, які б стабільно забезпечували значну частоту цих процесів.

Система *Secale cereale*. *A.thaliana* як модельна система показала свою привабливість в досліджуваному явищі хромосомної редукції як така, що має невеликий розмір геному, достатньо різноманітну структуру молекулярно-генетичних маркерів, можливість маніпулювати з різними екотипами, розвинуту технологію культивування *in vitro* і отримання регенерантів, та генно-інженерні методи маніпуляції з геномом. Суттєвим недоліком *A.thaliana* як модельної системи для цитогенетичного дослідження хромосом є дуже малий їхній розмір, що суттєво обмежує візуалізацію і таким чином фізичну доказовість феномену.

Навпаки, рослини роду *S. cereale* мають чудову цитогенетичну складову, а саме великий розмір хромосом та невелике число хромосом ($2n=14$) і наявність великих тяжів тандемних повторів та їх значний поліморфізм у сортів, що є перевагою для FISH експериментів і можливості дискримінації гомологічних

хромосом.

Хромосомна локалізація повторюваних послідовностей pSc119, pSc200 та pSc250. В результаті проведення флуоресцентної гібридизації *in situ* з клонами pSc119.2, pSc200 та pSc250 (рис. 9) отримані сильні гібридизаційні сигнали у місці розташування субтеломер, які відповідають позитивній флуоресценції гетерохроматину С-бендів при забарвленні DAPI. Гібридизація з повтором pSc119.2 виявляє велику кількість сайтів в інтеркалярному гетерохроматині і численні сайти біля кінців (але ніколи на самих кінцях) всіх коротких і багатьох довгих плечей хромосом. Навпаки, послідовності, гомологічні pSc200 та pSc250, були локалізовані головним чином як поодинокі значні за розміром бенди близько до кінця відповідних плечей хромосом і майже не гібридизувалися в інтеркалярному положенні (рис. 9). Одночасна гібридизація двох послідовностей завжди виявляла їх разом майже на всіх хромосомах, де ці послідовності були присутніми, за виключенням тих плечей, де тільки pSc200 мала чіткий гібридизаційний сигнал.

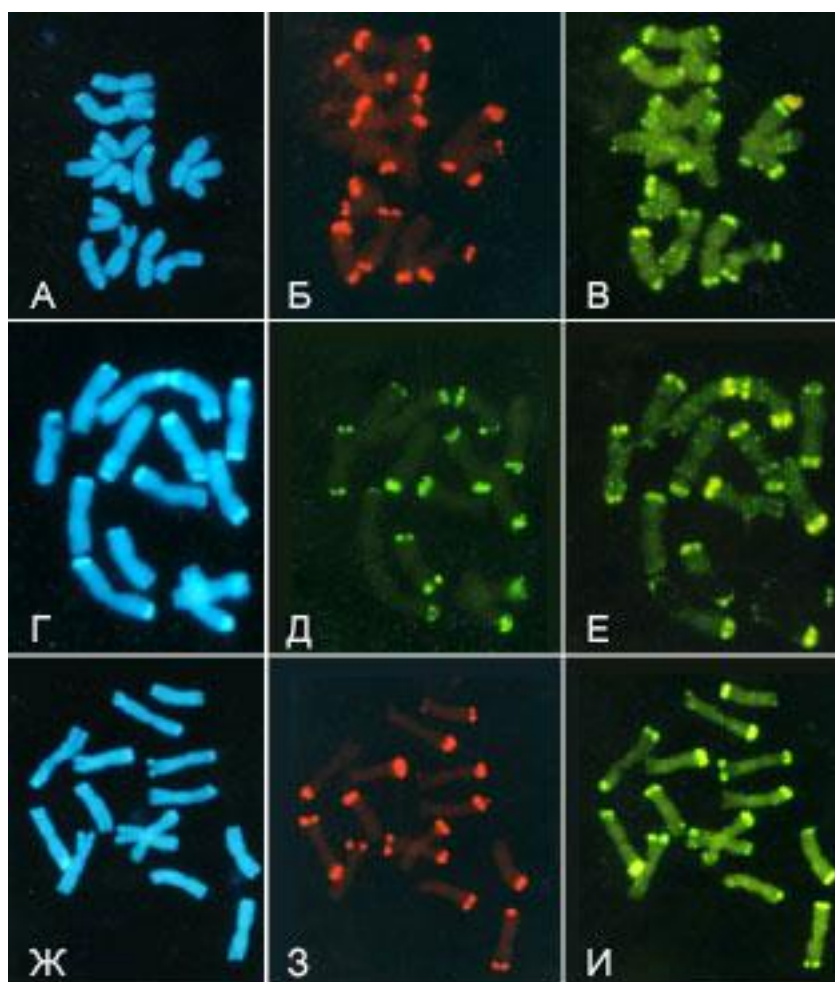


Рис. 9. Флуоресцентна гібридизація *in situ* повторюваних послідовностей ДНК, pSc119.2 (В, Е, И) та pSc250 (Б, Д, З) на хромосомах трьох сортів жита, Imperial (А, Б, В), Petkus (Г, Д, Е) та Онохойская (Ж, З, И). А, Г, Ж – забарвлення DAPI.

Міжсортний поліморфізм хромосом жита. Гібридизація *in situ* двох негомологічних високоповторюваних послідовностей ДНК, pSc200 та pSc250, показала хромосомоспецифічну локалізацію цих повторів, що дало можливість ідентифікувати більшість плечей хромосом жита. Посилаючись на номенклатуру хромосом жита (Sybenga, 1983), ми порівняли каріотиби трьох сортів Petkus, Imperial та Онохойская (рис. 10). FISH з pSc200 показує сильний сигнал різної інтенсивності на кінцях обох плечей хромосом відповідно до розміру гетерохроматинових блоків. Не виявлено відмінностей між трьома сортами у локалізації та кількості сайтів pSc200 на всіх хромосомах, окрім хромосоми 4R сорту Imperial. Хромосоми 5R та 6R мали помітний сигнал гібридизації в області інтеркалярного гетерохроматину при гібридизації з pSc200. Також було виявлено незначний міжсортний поліморфізм щодо розподілу сигналу pSc200 на хромосомах 2R та 7R. В той час, коли всі плечі хромосом Petkus мали гібридизаційний сигнал з pSc200, у Imperial він був відсутній на довгих плечах хромосоми 4R.

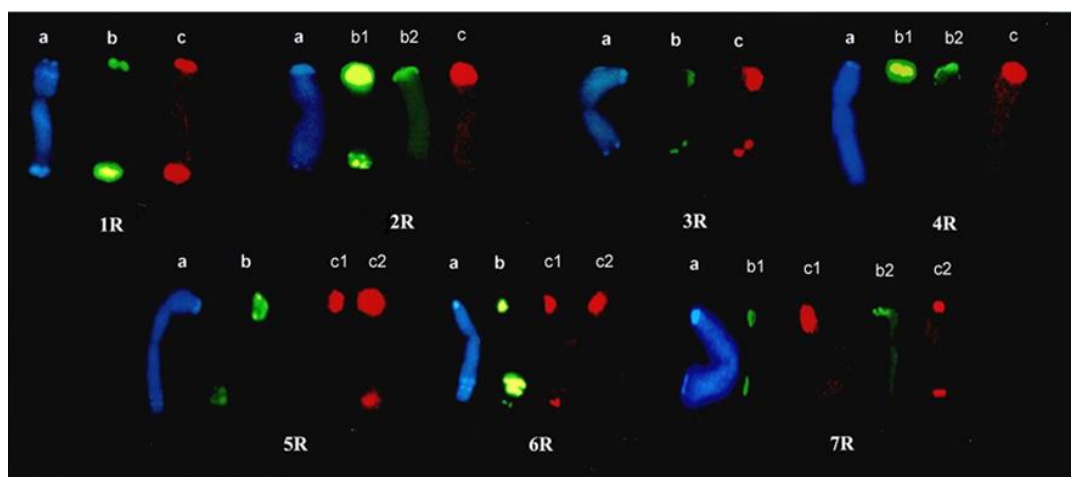


Рис. 10. FISH аналіз розподілу субтеломерних послідовностей ДНК, pSc200 та pSc250, на індивідуальних хромосомах жита (синій колір - DAPI забарвлення, зелений - pSc200, червоний - pSc250, 1- Petkus, 2 - Imperial).

Сайти гібридизації з послідовністю pSc250 були виявлені на кінцях коротких плечей всіх хромосом у всіх сортів, в той час коли поліморфізм спостерігали у розподілі сигналу на довгих плечах хромосом 5R, 6R та 7R. У сорту Petkus гібридизаційний сигнал з pSc250 спостерігали на обох плечах хромосом 1R та 3R, але він був відсутній на довгих плечах хромосом 2R, 4R, 5R, 6R, 7R. У сорту Онохойская сигнал присутній на обох плечах хромосом 1R, 3R, 6R, відсутній – на довгих плечах хромосом 2R, 4R, 5R та 7R. Щодо сорту Imperial, то гібридизаційний сигнал спостерігали на коротких плечах усіх хромосом, а також на довгих плечах хромосом 1R, 3R, 5R, 7R, сигнал був відсутнім на довгих плечах 2R, 4R, 6R хромосом.

Ідентифікація всіх хромосом жита *Secale cereale*. Із використанням у якості зондів мікросателітної послідовності GAA і проби pTA794 (фрагмент гена 5S рРНК), було ідентифіковано хромосоми жита *S. cereale* сорту Selgo та

Життєдайне (рис. 11). З рисунка видно, що три хромосоми, а саме 1R, 3R та 5R мають чіткий сигнал рибосомної 5S рДНК на короткому плечі, а гібридизація разом із мікросателітним повтором та одним із субтеломерних зондів дає можливість виділити всі сім пар хромосом жита *S. cereale*. Поліморфізм виявився при розподілі повторів GAA на довгому плечі хромосоми 5 між двома сортами Selgo та Життєдайне (рис.11), таким чином дозволяє відрізнити гомологічні хромосоми даних сортів.

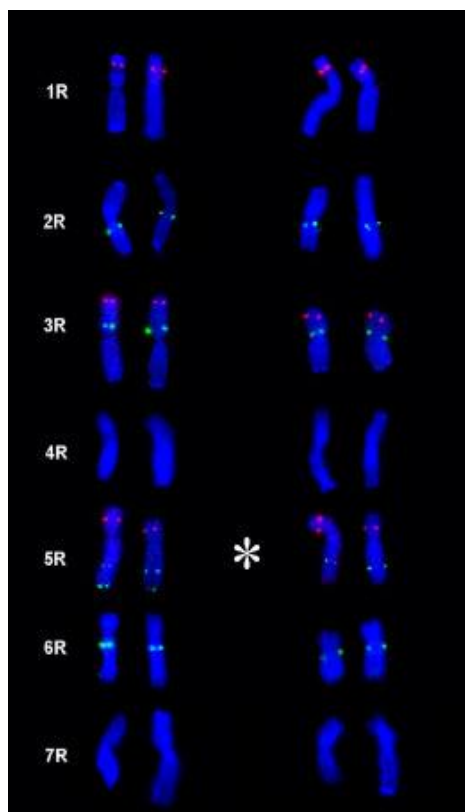


Рис. 11. Флуоресцентна гібридизація *in situ* мікросателітної послідовності GAA (зелений колір) та проби 5S рДНК (червоний колір) на хромосомах *S. cereale* сортів Selgo (зліва) та Життєдайне (справа). * - відмінності сигналу GAA на хромосомі 5R.

Проточна флуоресцентна цитометрія двох сортів *S. cereale*. Аналіз методом проточної цитометрії метафазних хромосом, виділених з жита Життєдайне, показав, що проточний каріотип цього сорту також складається з двох піків як і у сорту Imperial. На рисунку представлено гістограма відносної інтенсивності флуоресценції (рис. 12), де більший, композиційний, пік репрезентує хромосоми 2R-7R, а менший пік – хромосому 1R. Хромосома 1R, будучи найменшою з набору хромосом Imperial, вважається єдиною, що можна відсортувати індивідуально. Ми вперше визначили другий сорт, Життєдайне, хромосоми якого можуть бути відсортовані і дозволяють дискримінацію хромосоми 1 в каріотипі жита. Розроблена процедура сортування великої кількості інтактних індивідуальних хромосом 1R жита дозволяє послідовне фізичне картування цієї хромосоми.

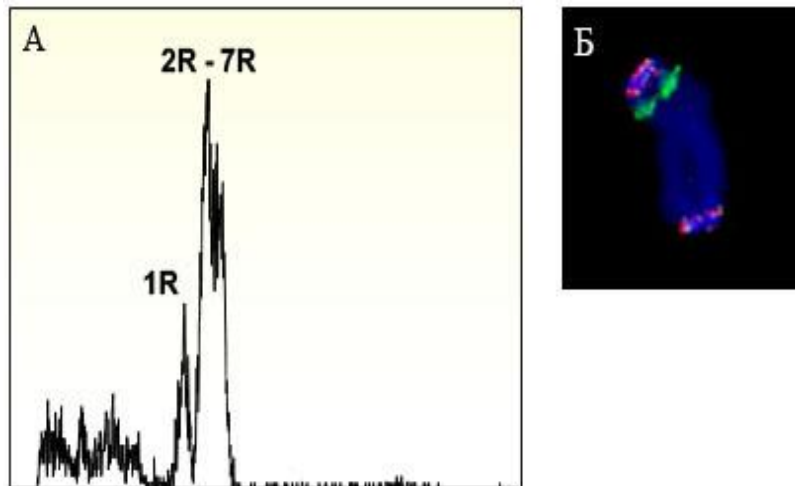


Рис. 12. А - Проточний каріотип, одержаний в результаті аналізу суспензії хромосом *S. cereale* сорту Життєдайне, забарвлених DAPI. Пік, що репрезентує хромосому 1R можна легко розрізнити, і це дозволяє сортинг хромосом у великій кількості з чистотою більше 90%. Другий пік проточного каріотипу репрезентує групу житніх хромосом 2R-7R. X: відносна флуоресценція DAPI, Y: число випадків. Б – Хромосома 1R після сортингу і FISH з міченою FITC пробою для 45S рДНК (зонд висвітлює NOR у зелений колір) та міченою Cy3 жито-специфічною пробою pSc250 (червоний колір). Хромосоми забарвлені DAPI (бакитний колір).

ВИСНОВКИ

На основі вивчення явища соматичної редукції та дослідження міжсортового поліморфізму гомологічних хромосом створено дві модельні системи, які дозволяють візуалізувати поведінку батьківських геномів та сегрегацію і рекомбінацію гомологічних хромосом.

1. Створено трансгенні лінії *A. thaliana* екотипів Columbia і Landsberg *erecta* та систему молекулярних SSLP-маркерів для ідентифікації хромосом кожного з екотипів, призначених для подальшого схрещування і створення модельного гібриду для дослідження процесів сегрегації та рекомбінації гомологічних хромосом.
2. Перевірено дві методики культивування *in vitro* *A. thaliana* для отримання регенерантів і визначено оптимальні умови ефективної індукції калусоутворення і регенерації рослин.
3. Встановлено максимальну концентрацію ПФФА для індукції соматичної редукції в культивованих *in vitro* клітинах *A. thaliana* (18 мг/л), за якої відбувається калусоутворення та регенерація рослин.
4. Показано, що в культивованих *in vitro* клітинах модельного гібриду *A. thaliana* за дії ПФФА відбувається соматична редукція. Це підтверджують результати цитогенетичного аналізу, за даними якого в контрольних та оброблених ПФФА калюсних клітинах виявлено біваленти і хромосомні угруповання,

частота яких становить 1,9 та 2 %, відповідно, на відміну від клітин інтактних корінців проростків, де їх не спостерігали. Водночас, аналіз отриманих регенерантів за допомогою системи SSLP-маркерів виявив втрату гетерозиготності в шести локусах у трьох рослин, що утворилися на середовищі з ПФФА, яка ймовірно є наслідком соматичної рекомбінації.

5. Показано можливість ідентифікації індивідуальних хромосом *Secale cereale* методом флуоресцентної гібридизації *in situ* із використанням зондів повторюваних послідовностей ДНК pSc200, pSc250, pSc119.2, 45SpДНК, 5SpДНК, (GAA)_n, а також продемонстровано можливість сортування хромосоми 1R у сорту Життедайне, що створює умови отримання субгеномної ВАС бібліотеки окремо однієї хромосоми *S. cereale*.
6. Досліджено поліморфізм хромосомної локалізації повторюваних послідовностей (pSc200, pSc250, 5SpДНК, GAA) у сортів жита Petkus, Imperial, Selgo, Онохойская, Життедайне, що підтверджує можливість створення на їх основі міжсортівних гібридів *S. cereale*, які будуть використані як модельні об'єкти для вивчення розподілу хромосом батьківського і материнського геномів.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. Loss of heterozygosity at individual loci in *Arabidopsis thaliana* regenerants cultured with para-fluorophenylalanine / **Zimina O.**, Parii M. and Alkhimova O. // Cytology and Genetics. – 2016. – Т. 50, №5. – 278–284. (*Особистий внесок здобувача: вирощування рослин для досліджень, схрещування рослин та селекція гібридів, підбір концентрацій ПФФА, ПЛР аналіз, цитогенетичний аналіз, аналіз отриманих результатів, написання статті*).
2. Identification of Rye Chromosomes by Flow Cytogenetics / Alkhimova O.G., **Zimina O.V.** // Biopolym. Cell. – 2017. – Т. 33, №2. – Р. 116-123. (*Особистий внесок здобувача: взято участь в експериментах з FISH-аналізу, обговоренні, аналізі отриманих результатів, написанні статті*).
3. Somatic segregation: genetic evidences, consequences and applications / Sytnyk K., Vdovychenko Z., Spyrydonov V., Melnychuk M., Parii M. and **Zimina O.** // Acta Hort. 961. – 2012. Р. 495– 502. (DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.961.65) (*Особистий внесок здобувача: пошук, опрацювання та аналіз літературних джерел, визначення стратегій відбору і створення модельних об'єктів рослин, взято участь у написанні статті*).
4. Мультиплексная полимеразная цепная реакция для генотипирования экотипов *Arabidopsis thaliana* с помощью SSLP-маркеров / **Зимина О.В.**, Сытник Е.С., Парий М.Ф., Алхимова, Е.Г. // Biotechnol.Acta. – 2014. – Т. 7, №4. – С. 80-84. (*Особистий внесок здобувача: вирощування рослин для досліджень, підбір SSLP-*

маркерів, ПЛР, розробка та оптимізація умов мультиплексної ПЛР, аналіз отриманих результатів, написання статті).

5. Аланін як індуктор соматичної сегрегації у клітинах апікальної меристеми корінців *Allium sera* L. / Савінський С., Вдовиченко Ж., Ситник К., **Зіміна О.**, Спиридонов В., Парій М. // Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2012. – Т. 10, № 2. – С. 303-310. (Особистий внесок здобувача: взято участь в експериментах по вивченню впливу аланіна на поділ клітин, обговоренні та аналізі отриманих результатів).

6. DMSO and izatizon contribute to plant immunity / **Zimina O.**, Vorobiova I., Voloshchuk T., Zaika L. and Alkhimova O. // Mater. online XVI Intern. Sci. Pract. Conf. 'Problems and ways of modern public health development'. – 2012. – P. 187-188. (Особистий внесок здобувача: проведено основну частину експериментальних досліджень, взято участь в обговоренні результатів експерименту, написання статті).

7. Создание трансгенных линий *Arabidopsis thaliana* для изучения явления соматической сегрегации / **Зимина О.**, Сытник Е., Вдовиченко Ж., Парий М., Алхимова О. // Збірник наукових праць 'Фактори експериментальної еволюції організмів'. – 2011. – Т. 11, – С. 263-268. (Особистий внесок здобувача: вирощування рослин для досліджень, генетична трансформація рослин *A. thaliana* екотипу *Landsberg erecta* *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованим методом, розмноження та аналіз трансгенних рослин, опрацювання результатів, написання статті).

Тези наукових доповідей:

1. Approaches to Reverse Breeding / Sytnyk E., Tabaka P., **Zimina O.**, Vdovychenko Z., Spyrydonov V. and Parii M. // Abstr. Intern. Conf. Green Plant Breed. Techn., 2-5 February, 2010. – Vienna, 2010. – P.58.

2. Хромосомные метки ржи (*Secale cereale* L.) / Портова П., **Зимина О.В.**, Алхимова О. // Тезисы докл. 2-й Между-нар. конф. молод. ученых 'Генетика и селекция растений, основанная на совр. генетич. знаниях и технологиях', 5-10 декабря 2011г. – Звенигород, 2011. – С. 61.

3. Создание модельной системы на примере *Arabidopsis thaliana* для изучения явления соматической сегрегации / **Зимина О. В.**, Сытник Е.С., Парий, М.Ф. // Тезисы докладов XVIII-й Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых 'ЛОМОНОСОВ', 11-15 апреля, 2011 г. – Москва, 2011. – С. 78-79.

4. Molecular Cytogenetic Mapping of Chromosomal Fragments in Rye / **Zimina O.**, Portova P., Alkhimova O. // Abstr. Intern. Conf. Plant Gene Discov. Techn., 23-26 February, 2011. – Vienna, 2011. – P. 39.

5. Study of somatic segregation in *Arabidopsis* cells cultured *in vitro* / **Zimina O.**, Sytnik E., Parii M., Alkhimova, O. G. // Biopolym. Cell. – 2011. – Т. 27, №4. – P. 327.

6. Subtelomeric sites of chromosomes, their sequences and their importance / Alkhimova O., **Zimina O.** / Abstr. The 22nd Wilhelm Bernhard Workshop 'The Cell Nucleus', 24-30 August, 2011. – Riga, 2011. – P.125.
7. Creation of model systems for somatic chromosome segregation evidence / Alkhimova O., **Zimina O.**, Parii M. // Abstr. The 18th Intern. Chromosome Conf., 29 August - 2 September, 2011. – Manchester, 2011. – P. 20.
8. Plant model systems for somatic segregation study / Sytnyk K., **Zimina O.**, Vdovychenko Zh., Spyrydonov V, Parii M. // Abstr. 7th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 18-22 September, 2011. – Ghent, 2011. – P.32.
9. Epigenetic profile of satellite DNA / **Zimina O.**, Gurianov D., Alkhimova O.// Abstr. The 23th Wilhelm Bernhard Workshop 'Cell Nucleus', 19-24 August, 2013. – Debrecen, 2013. – P. 125.
10. Using the DNA markers for somatic chromosome segregation study in plants / **Zimina O.**, Parii M., Alkhimova O. // Abstr. The 24th Wilhelm Bernhard Workshop 'Cell Nucleus', 17-22 August, 2015. – Vienna, 2015. – P.44-45.
11. Some aspects of somatic chromosome reduction phenomenon to unravel the mechanisms / **Zimina O.V.**, Parii M.F., Alkhimova O.G. // 12th International Congress of Cell Biology, 21-25 July, 2016. – Prague, 2016. – P.192.

АНОТАЦІЯ

Зіміна О.В. Створення модельних систем для дослідження процесів сегрегації і рекомбінації гомологічних хромосом на рослинах *Arabidopsis thaliana* та *Secale cereale*. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика. – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2017.

Робота присвячена вивченню явища соматичної редукції та дослідженню міжсортового поліморфізму гомологічних хромосом у рослин *A. thaliana* та *S. cereale*, на основі яких створено дві модельні системи, що дозволяють візуалізувати поведінку батьківських геномів та сегрегацію і рекомбінацію гомологічних хромосом в культурі *in vivo* та *in vitro*.

Для створення модельного гібриду *A. thaliana* отримано трансгенні лінії екотипів Columbia і Landsberg *erecta* з репортерними генами *gusA* і *gfp* і селективними генами *nptII* і *bar*, відповідно, що надає можливість для селекції гібридних рослин і дозволяє розрізняти батьківські геноми. Підібрано систему молекулярних SSLP-маркерів для ідентифікації хромосом кожного з екотипів. Перевірено дві методики культивування *in vitro* *A. thaliana* для отримання регенерантів і визначено оптимальні умови ефективної індукції калюсоутворення і регенерації рослин. Встановлено максимальну концентрацію ПФФА (пара-фтор-*L*-фенілаланін) для індукції соматичної редукції в культивованих *in vitro* клітинах *A. thaliana*, за якої відбувається калюсоутворення та регенерація рослин, і отримано рослини-регенеранти, аналіз яких за допомогою системи SSLP-маркерів

виявив втрату гетерозиготності в шести локусах у трьох рослин. Проведено цитогенетичний аналіз, за даними якого в оброблених ПФФА калюсних клітинах виявлено біваленти і хромосомні угруповання.

Показана можливість ідентифікації індивідуальних хромосом у *Secale cereale* методом флуоресцентної гібридизації *in situ* із використанням зондів повторюваних послідовностей ДНК, pSc200, pSc250, pSc119.2, 45SpДНК, 5SpДНК, (GAA)_n, а також продемонстровано можливість сортигу хромосоми 1R у сорту Життедайне, що створює умови отримання субгеномної ВАС бібліотеки окремо однієї хромосоми *S. cereale*. Встановлений поліморфізм хромосомної локалізації повторюваних послідовностей (pSc200, pSc250, 5SpДНК, GAA) у сортів жита Petkus, Imperial, Selgo, Онохойская та Життедайне підтверджує можливість створення на їх основі міжсортівих гібридів *S. cereale*, які будуть використані як модельні об'єкти для вивчення розподілу хромосом батьківського і материнського геномів.

Ключові слова: екотипи *A. thaliana*, *S. cereale*, соматична редукція і рекомбінація, втрата гетерозиготності, SSLP-маркери, пара-фтор-L-фенілаланін, сателітні повтори, сортинг хромосом, флуоресцентна гібридизація *in situ*.

АННОТАЦИЯ

Зими́на О.В. Создание модельных систем для исследования процессов сегрегации и рекомбинации гомологичных хромосом на растениях *Arabidopsis thaliana* и *Secale cereale*. - Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.15 – генетика. – Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 2017.

Работа посвящена изучению явления соматической редукции и исследованию межсортного полиморфизма гомологичных хромосом у растений *A. thaliana* и *S. cereale*, на основе которых созданы две модельные системы, позволяющие визуализировать поведение родительских геномов, сегрегацию и рекомбинацию гомологичных хромосом в культуре *in vivo* и *in vitro*.

Для создания модельного гибрида *A. thaliana* получены трансгенные линии экотипов Columbia и Landsberg erecta с репортерными генами *gusA* и *gfp* и селективными генами *nptII* и *bar*, соответственно, что дает возможность селекции гибридных растений и позволяет различать родительские геномы. Подобрана система молекулярных SSLP-маркеров для идентификации хромосом каждого из экотипов. Проверено две методики культивирования *in vitro* *A. thaliana* для получения регенерантов и определены оптимальные условия эффективной индукции каллусообразования и регенерации растений. Установлено максимальную концентрацию ПФФА (пара-фтор-L-фенилаланин) для индукции соматической редукции в культивируемых *in vitro* клетках *A. thaliana*, при которой происходит каллусообразование и регенерация растений, и получены растения-регенеранты, анализ которых с помощью системы SSLP-маркеров обнаружил потерю гетерозиготности в шести локусах у трех растений. Проведен

цитогенетический анализ, по данным которого в обработанных ПФФА каллусных клетках обнаружены биваленты и хромосомные группирования.

Показана возможность идентификации индивидуальных хромосом у *Secale cereale* методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием зондов повторяющихся последовательностей ДНК, pSc200, pSc250, pSc119.2, 45SpДНК, 5SpДНК, (GAA)_n, а также продемонстрирована возможность сортировки хромосомы 1R у сорта Життедаине, что создает условия получения субгеномной ВАС библиотеки отдельно одной хромосомы *S. cereale*. Установлено существование полиморфизма хромосомной локализации повторяющихся последовательностей (pSc200, pSc250, 5SpДНК, GAA) у сортов ржи Petkus, Imperial, Selgo, Онохойская и Життедаине, что подтверждает возможность создания на их основе межсортовых гибридов *S. cereale*, которые будут использованы в качестве модельных объектов для изучения распределения хромосом отцовского и материнского геномов.

Ключевые слова: экотипы *A. thaliana*, *S. cereale*, соматическая редукция и рекомбинация, потеря гетерозиготности, SSLP-маркеры, пара-фтор-L-фенилаланин, сателлитные повторы, сортировка хромосом, флуоресцентная гибридизация *in situ*.

SUMMARY

Zimina O.V. Creation of model systems for homologous chromosome segregation and recombination study in *Arabidopsis thaliana* and *Secale cereale* plants. – Manuscript.

Thesis for Philosophy Doctor (PhD) degree in Biology, speciality 03.00.15. – genetics. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017.

The thesis is devoted to the study of the phenomenon of somatic reduction and intervarietal polymorphism of homologous chromosomes in *A. thaliana* and *S. cereale* plants, on the basis of which two model systems were created to visualize the behavior of parental genomes and the segregation and recombination of homologous chromosomes *in vivo* and *in vitro* culture. The research focused on the use of plant models, *in vitro* culture; induction, molecular mechanisms and genetic effects of somatic reduction; the presence of genetic determinants, external factors and internal agents that cause the occurrence of atypical cell divisions. The possibility to implement the concept of applying somatic reduction phenomenon in homozygous lines obtaining is highlighted.

To create the *A. thaliana* model hybrid, the transgenic lines of Columbia and Landsberg erecta ecotypes with *gusA* and *gfp* reporter genes and *nptII* and *bar* selective genes have been obtained, respectively, which provide an opportunity for selection of hybrid plants and allow to distinguish between parental genomes.

A system of molecular SSLP markers has been developed to identify the chromosomes of each ecotype. The SSLP DNA sequences are highly polymorphic in *Arabidopsis*, have a codominant type of inheritance and are easy to apply. Using the

TAIR database a total of 12 SSLP markers were selected performing one marker on each arm of chromosomes 1st to 4th and two markers on each arm of chromosome 5th. Two methods of *A. thaliana* *in vitro* cultivation have been tested and optimal conditions for efficient induction of callus and regenerants formation have been determined.

The maximum concentration of PFPA (para-fluoro-L-phenylalanine) was established for induction of somatic reduction *in vitro* cultured *A. thaliana* cells, which allows both the callus formation and plant regeneration. As a result, the regenerants were obtained, whose analysis with SSLP marker system showed a loss of heterozygosity in six loci in three plants. A cytogenetic analysis showed the bivalents formation and chromosomal grouping in PFPA treated cells.

Essentially small size of *A. thaliana* chromosomes for cytogenetic research significantly impairs the visualization and thus the physical evidence of the phenomenon. Unlike *A. thaliana*, subtelomeric heterochromatin of all rye chromosomes contains several families of tandemly organized DNA sequences, which are characterized by the heterogeneity of the internal organization specific for each monomer of a higher order structure. Monomers of different families have their distinct origin and coexist with the copies of various retroelements families.

Thus, *Secale cereale* have a great cytogenetic component, namely, large chromosomes and a small number of chromosomes ($2n = 14$), the presence of large tracks of tandem repeats in subtelomeric heterochromatin and their significant polymorphism in varieties. All these has an advantage for fluorescence *in situ* hybridization experiments and the ability to discriminate homologous chromosomes. The possibility of identifying individual chromosomes in *S. cereale* by FISH using probes of different DNA repeats, pSc200, pSc250, pSc119.2, 45SrDNAs, 5SrDNAs (GAA)_n, and also the potential for sorting 1R chromosome create powerful tool for obtaining the subgenomic BAC library of a single chromosome. The established polymorphism of the chromosomal localization of repeats (pSc200, pSc250, pSc119.2, 5SrDNA, GAA) in rye varieties Petkus, Imperial, Selgo, Onohoiskaya and Zhyttedaine confirms the possibility of creating on their basis the *S. cereale* hybrids that would be used as a model system for investigation of the chromosome segregation and recombination and regularity of parental and maternal genomes distribution.

Keywords: *A. thaliana* ecotypes, *S. cereale*, somatic reduction and recombination, loss of heterozygosity, SSLP markers, para-fluoro-L-phenylalanine, satellite repeats, chromosome sorting, fluorescence *in situ* hybridization.