

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЗІМІНА ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 576.353:576.316:57.088:57.044:575.113

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.15- генетика

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Науковий керівник
Алхімова Олена Георгіївна,
кандидат біологічних наук

Київ - 2017

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 молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2017.

Зміст анотації

У дисертаційній роботі розглянуто загальні відомості про процес сегрегації хромосом, сучасні уявлення про його молекулярні механізми, а також описано явище соматичної редукції і наведені його приклади. Розглянуто методологію для дослідження поведінки геномів та хромосом рослин. Наведено сучасні методичні підходи до 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.

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 маркерів для ідентифікації хромосом кожного з екотипів *Columbia* і *Landsberg erecta*. Для ідентифікації екотипів *A. thaliana* і їхнього гібрида в якості ДНК-маркерів використовували послідовності SSLP, які у *A. thaliana* є високополіморфними, мають кодомінантний тип успадкування і прості в застосуванні. Підбір ДНК-маркерів проводили за допомогою пошукового ресурсу веб-сайту TAIR таким чином, щоб на кожному плечі з 1-ї по 4-у хромосому знаходилося по одному маркеру і на обох плечах 5-ї хромосоми - по два маркера. Всього було підібрано 12 маркерів SSLP. В результаті проведених експериментів з оптимізації умов ПЛР було встановлено, що двустадійна ПЛР з використанням двох температур відпалу праймерів в кожному циклі дозволяє ефективно ампліфікувати всі розглянуті в роботі фрагменти. Визначено умови для проведення двох ПЛР-мультиплексів, кожен з яких дозволяє ампліфікувати по два фрагмента, і одного ПЛР-мультиплексу - для ампліфікації трьох маркерів. Розроблена система ДНК-маркерів може бути використана для вивчення поведінки і успадкування кожної хромосоми материнського і батьківського геномів гібридів *A. thaliana*, а також дає можливість швидко і ефективно проводити генетичний аналіз.

Перевірено дві методики культивування *in vitro* *A. thaliana* для отримання регенерантів і визначено оптимальні умови ефективної індукції калюсоутворення і регенерації рослин. Головними чинниками калюсоутворення і регенерації в першій системі були фітогормони, в другій – дія осмотичного стресу, створена шляхом додавання в середовище 0,3 М NaCl. Оскільки в першій системі була вище частота регенерації пагонів, вона була обрана для подальшої роботи. Крім того велике значення мала техніка отримання експлантів. Як виявилось, робота з корневими експлантами (І система) була простішою і забирала менше часу.

Встановлено максимальну концентрацію ПФФА (пара-фтор-L-

фенілаланін) для індукції соматичної редукції в культивованих *in vitro* клітинах *A. thaliana*, за якої відбувається калусоутворення та регенерація рослин. Отримано рослини-регенеранти на середовищі з ПФФА, 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 калусних клітинах виявлено біваленти і хромосомні угруповання.

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 працювати з різними екотипами, розвинуту технологію культивування *in vitro* і отримання регенерантів та генно-інженерні методи маніпуляції з геномом. Значно малий розмір хромосом *A.thaliana* як модельної системи для цитогенетичного дослідження хромосом суттєво обмежує візуалізацію і таким чином фізичну доказовість феномену.

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

На відміну від *A. thaliana* у складі субтеломерного гетерохроматину всіх хромосом жита, *Secale cereale*, присутні по декілька сімейств тандемно організованих послідовностей ДНК. Ці ланцюги повторів характеризуються гетерогенністю внутрішньої організації, зі специфічною для кожного організацією мономерів у структури більш високого порядку. Мономери різних сімейств мають відмінні шляхи походження, а оточуюча послідовності тандемних повторів геномна ДНК представлена копіями сімейств різноманітних класів ретроелементів, які присутні також в геномах найближчих родичів жита, пшениці і ячменю. Враховуючи вибуховий

характер формування субтеломерного гетерохроматину жита (*Secale cereale*) впродовж еволюції кількома сімействами тандемних повторів та інтенсивністю рекомбінаційних подій, створено досконалу модель для вивчення сегрегації гомологічних хромосом та соматичної редукції.

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, ми порівняли каріотиби трьох сортів Petkus, Imperial та Онохойская за цими маркерами.

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 (англ. Bacterial Artificial Chromosome) 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*.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. Зими́на, О., Сытник, Е., Вдовиченко, Ж., Парий, М., Алхимова, О. (2011). Создание трансгенных линий *Arabidopsis thaliana* для изучения явления соматической сегрегации. *Збірник наукових праць 'Фактори експериментальної еволюції організмів', 11*, 263-268.
2. Sytnyk, K., Zimina, O., Vdovychenko, Z., Spyrydonov, V., Melnychuk, M., Parii, M. (2012). Somatic segregation: genetic evidences, consequences and applications. *Acta Hort.*, 961, 495– 502 (DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.961.65)
3. Савінський, С., Вдовиченко, Ж., Ситник, К., Зіміна, О., Спиридонов, В., Парій, М. (2012). Аланін як індуктор соматичної сегрегації у клітинах апікальної меристеми корінців *Allium sera L.* *Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів, 10(2)*, 303-310.
4. Zimina, O., Vorobiova, I., Voloshchuk, T., Zaika, L., Alkhimova, O. (2012). DMSO and izatizon contribute to plant immunity. *Mater. online XVI Intern. Sci. Pract. Conf. 'Problems and ways of modern public health development'*, 187-188.
5. Зими́на, О. В., Сытник, Е. С., Парий, М. Ф., Алхимова, Е. Г. (2014). Мультиплексная полимеразная цепная реакция для генотипирования экотипов *Arabidopsis thaliana* с помощью SSLP-маркеров. *Biotechnologia Acta*, 7(4), 80-84.
6. Zimina, O., Parii, M., Alkhimova, O. (2016). Loss of heterozygosity at individual loci in *Arabidopsis thaliana* regenerants cultured with para-fluorophenylalanine. *Cytology and Genetics*, 50(5), 278–284.
7. Alkhimova, O., Zimina O. (2017). Identification of Rye Chromosomes by Flow Cytogenetics. *Biopolym. and Cell*, 33(2), 116-123.

Тези наукових доповідей:

1. Sytnyk E., Tabaka P., Zimina O., Vdovychenko Z., Spyrydonov V. and Parii M. (2010, February) Approaches to Reverse Breeding. Proceedings of the International Conference Green Plant Breeding Technologies, Vienna University of Economics, Vienna, p. 58.
2. Портова П., Зими́на О.В., Алхимова О. (2011, декабрь) Хромосомные метки ржи (*Secale cereale* L.). Тезисы докл. 2-й Между-нар. конф. молод. ученых 'Генетика и селекция растений, основанная на совр. генетич. знаниях и технологиях', Звенигород, с. 61.
3. Зими́на О. В., Сытник Е.С., Парий, М.Ф. (2011, апрель) Создание модельной системы на примере *Arabidopsis thaliana* для изучения явления соматической сегрегации. Тезисы докладов XVIII-й Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых 'ЛОМОНОСОВ', Москва, с. 78-79.
4. Zimina O., Portova P., Alkhimova O. (2011, февраль) Molecular Cytogenetic Mapping of Chromosomal Fragments in Rye. Abstr. Intern.Conf. Plant Gene Discov. Techn., Vienna, p. 39.
5. Zimina O., Sytnik E., Parii M., Alkhimova, O. G. (2011) Study of somatic segregation in *Arabidopsis* cells cultured *in vitro*. *Biopolym. Cell*, 27(4), p. 327.
6. Alkhimova O., Zimina O. (2011, August) Subtelomeric sites of chromosomes, their sequences and their importance. Proceedings of the 22nd Wilhelm Bernhard Workshop 'The Cell Nucleus', Riga, p. 125.
7. Alkhimova O., Zimina O., Parii M. (2011, September) Creation of model systems for somatic chromosome segregation evidence. Proceedings of the 18th Intern. Chromosome Conf, Manchester, p. 20.

8. Sytnyk K., Zimina O., Vdovychenko Zh., Spyrydonov V., Parii M. (2011, September) Plant model systems for somatic segregation study. Proceedings of the 7th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, Ghent, p. 32.
9. Zimina O., Gurianov D., Alkhimova O. (2013, August) Epigenetic profile of satellite DNA. Proceedings of the 23th Wilhelm Bernhard Workshop 'Cell Nucleus', Debrecen, p. 125.
10. Zimina O., Parii M., Alkhimova O. (2015, August) Using the DNA markers for somatic chromosome segregation study in plants. Proceedings of the 24th Wilhelm Bernhard Workshop 'Cell Nucleus', Vienna, p. 44-45.
11. Zimina O.V., Parii M.F., Alkhimova O.G. (2016, July) Some aspects of somatic chromosome reduction phenomenon to unravel the mechanisms. Proceedings of the 12th International Congress of Cell Biology, Prague, p. 192.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	11
ВСТУП	13
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	19
1.1. Сегрегація хромосом, як важливе біологічне явище, та сучасні уявлення про механізми процесу	19
1.1.1. Механізми контролю поділу клітини.....	20
1.1.2. Головні відмінності мітозу і мейозу.	24
1.1.3. Соматична редукція хромосом як порушення мітозу.	26
1.1.4. Приклади соматичної редукції гомологічних хромосом.	28
1.2. Методологія дослідження геномів та поведінки хромосом.....	35
1.2.1. ДНК маркери.	36
1.2.2. Флуоресцентна гібридизація <i>in situ</i>	38
1.2.3. Білкові маркери. Селективні і репортерні гени.	41
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	46
2.1. Система <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
2.1.1. Рослинний матеріал.	46
2.1.2. Бактеріальні штами та вектори.....	46
2.1.3. Генетична трансформація рослин.	47
2.1.4. Селекція трансформованих рослин.....	47
2.1.5. Аналіз експресії трансгенів.....	47
2.1.6. Схрещування трансформованих ліній та отримання гібридів.	48
2.1.7. Введення <i>Arabidopsis thaliana</i> в культуру <i>in vitro</i> та підбір умов для ефективною регенерації рослин.	48
2.1.8. Визначення концентрації пара-фтор-L-фенілаланіну (ПФФА), оптимальної для регенерації і калусоутворення.	51
2.1.9. Культивування <i>in vitro</i> та отримання регенерантів.	52
2.1.10. Приготування препаратів хромосом.	53
2.1.11. Підбір SSLP ДНК-маркерів.....	53
2.1.12. Виділення ДНК та умови ПЛР.	53
2.2. Система <i>Secale cereale</i>	54

	10
2.2.1. Рослинний матеріал.	54
2.2.2. Збір та фіксація матеріалу.	54
2.2.3. Приготування давлених препаратів.	55
2.2.4. Проби та їх мічення.	55
2.2.5. Флуоресцентна гібридизація <i>in situ</i>	56
2.2.6. Проточна цитометрія і сортинг хромосом.	57
2.3. Статистична обробка результатів.	59
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ	61
3.1. Модельні системи для дослідження механізмів сегрегації хромосом.	61
3.2. Система <i>A. thaliana</i>	66
3.2.1. Створення трансгенних ліній та їх схрещування.	66
3.2.2. Оптимізація умов культивування клітин <i>in vitro</i> та отримання регенерантів.	69
3.2.3. Підбір SSLP-маркерів і умови ПЛР.	73
3.2.4. Вивчення впливу різних концентрацій ПФФА на калусоутворення та регенераційну здатність.	78
3.2.5. Створення гібридів та отримання регенерантів.	82
3.2.6. Аналіз регенерантів за допомогою SSLP маркерів та цитологічний аналіз калусних клітин.	83
3.3. Система <i>Secale cereale</i>	93
3.3.1. Хромосомна локалізація повторюваних послідовностей pSc119.2, pSc200 та pSc250.	93
3.3.2. Міжсортний поліморфізм хромосом жита.	95
3.3.3 Ідентифікація всіх хромосом жита <i>Secale cereale</i>	97
3.3.4. Проточна цитофлуориметрія хромосом двох сортів <i>S. cereale</i>	98
УЗАГАЛЬНЕННЯ	105
ВИСНОВКИ	113
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	115

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

МІ – мітотичний індекс

МР – мітотична рекомбінація

п.н. – пара нуклеотидів

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ПФФА – пара-фтор-L-фенілаланін

Т-ДНК – ділянка ДНК бінарного вектора, яка переноситься та вбудовується в рослинний геном при трансформації (від англ. Transferred DNA)

ЧМПП – частота мейозоподібних поділів

2-ір – 6-(γ,γ - диметил-алліл-аміно)- пурин

2,4-D – 2,4 - дихлорфеноксіоцтова кислота

35S prom – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти

B5 – живильне середовище Гамборга (Gamborg et al 1968)

BAC – бактеріальна штучна хромосома (від англ. bacterial artificial chromosome)

BAR – 6-бензиламінопурин

bar – ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази

DAPI – 4',6-діамідино-2-феніліндол

gfp – ген зеленого флуоресцентного білка

GFP – зелений флуоресцентний білок

GUS – білок β -глюкуронідази

gus, *uidA* – ген β -глюкуронідази

ІОК – β -індолілоцтова кислота

ІМК – індоліл-3-масляна кислота

Km – канаміцин

LB, RB – лівий і правий повтори, які обмежують Т-ДНК

LOH – втрата гетерозиготності (від англ. loss of heterozygosity)

MS – живильне середовище Мурасіге-Скуга (Murashige and Skoog 1962)

НОК – α -нафтилоцтова кислота

nos – термінатор нопалінсинтази

nptII – ген неоміцинофосфотрансферази

PPT – фосфінотрицин

RFLP – маркери – маркери, які базуються на поліморфізмі довжини рестрикційних фрагментів (від англ. Restriction Fragment Length Polymorphism)

SSC – цитратно-сольовий буфер (від англ. Sodium Salt Citrate)

SSLP – маркери – маркери, які базуються на поліморфізмі довжини простих повторюваних послідовностей (від англ. Simple Sequence Length Polymorphisms)

Tris – трис-(гідроксиметил)-амінометан

X-Gluc – 5-бром-4-хлор-3-індоліл-глюкуронід

ВСТУП

Актуальність теми. Поділ клітин представляє собою процес, який безперервно відбувається у всіх живих організмах. Зазвичай розрізняють два види поділу: мітоз і мейоз. У еукаріотів можна спостерігати обидві форми ядерного поділу. Клітини соматичних тканин діляться шляхом мітозу, при цьому кожна хромосома розділяється на дві хроматиди, однакові за кількісним і якісним складом. На противагу цьому, мейоз відбувається в статевих клітинах, внаслідок чого утворюються ядра з гаплоїдним числом хромосом. Обидва типи клітинного поділу відіграють важливу роль в розвитку і спадковому відтворенні організму.

Рівномірний розподіл генетичного матеріалу під час мітозу і мейозу є найбільш важливим моментом клітинного циклу. Правильне хромосомне розходження необхідне для підтримання належного хромосомного набору від клітини до клітини, від покоління до покоління. Помилки під час хромосомної сегрегації можуть призводити до хромосомної нестабільності, в результаті чого можуть виникати анеуплоїдні клітини, клітини з втратою гетерозиготності, що у ссавців є характерними рисами раку (Cheslock et al. 2005; Thompson and Compton 2011). У рослин геном відрізняється пластичністю, тому життєздатність генетично змінених клітин значно вище, ніж у тваринних організмів. До того ж, соматична клітина рослини спадковими генетичними змінами в змозі дати початок новому організму, як в природі, так і в умовах культури *in vitro*. Дослідження мінливості і нестабільності 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 (d'Erfurth et al. 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; Ronchi et al. 1992a/b). Багато авторів роблять різні припущення щодо ролі цього явища в природі, наприклад, що внаслідок контролю рівня плоїдності, воно може спричиняти 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 et al. 2001; Giorgetti et al. 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 для зворотної селекції.

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 TriticeaeGenome 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* за допомогою векторних конструкцій, 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, ПЛП 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* гетерозиготних модельних гібридів 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 жито-специфічних 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. Створений модельний гібрид на основі трансгенних ліній *A. thaliana* та розроблена система ДНК-маркерів можуть бути використані для вивчення поведінки і успадкування кожної хромосоми материнського і батьківського геномів гібридів *A. thaliana*, а також дає можливість швидко і ефективно проводити генетичний аналіз. Можливість сортигу окремих хромосом відкриває шлях до створення геномних ВАС бібліотек індивідуальних хромосом, які можуть стати потужним інструментом для селекції при створенні цінних культур, секвенування і детального аналізу геномів. Такий підхід є особливо важливим для сертифікації певного генотипу жита посівного при створенні нових сортів та перевірки чистоти елітного матеріалу насіння.

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), на міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів і молодих вчених “ЛОМОНОСОВ” (Москва, 2011), міжнародній науковій конференції “22th Wilhelm Bernhard Workshop on Cell Nucleus” (Ріга, 2011), міжнародній науковій конференції “18th International Chromosome Conference” (Манчестер, 2011), міжнародному

науковому конгресі “7th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding” (Гент, 2011), на 2-й міжнародній науковій конференції молодих вчених “Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических 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 англомовних 195. Робота викладена на 135 сторінках комп’ютерного тексту, ілюстрована 21 рисунком та містить 10 таблиць.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сегрегація хромосом, як важливе біологічне явище, та сучасні уявлення про механізми процесу

Поділ клітин та сегрегація хромосом являються фундаментальними процесами в біології. Незважаючи на те, що ці процеси привертали увагу вчених з моменту їхнього першого опису більш ніж 100 років тому, основні механізми і схеми регуляції цих процесів досі неповно вивчені. Сегрегація хромосом є одним з основних етапів у відтворенні клітин і зазвичай забезпечується з високою точністю під контролем молекулярних механізмів. Важливість цього процесу не переоцінена, тому що дефекти в сегрегації хромосом під час клітинного поділу порушують збалансоване успадкування генетичної інформації дочірніми клітинами, що може призводити як до негативних наслідків, так і до позитивних. Наприклад, неправильне розходження хромосом під час мітозу може призводити до хромосомної нестабільності, в результаті чого у ссавців можуть виникати клітини з ознаками раку. Відомо, що клітини більшості видів раку є анеуплоїдними, містять аберантне число хромосом, які також часто мають значні структурні зміни (транслокації, делеції і ампліфікації). В деяких новоутвореннях конкретні випадки хромосомних перебудов є прогностичними показниками агресивності пухлин, чутливості до хіміотерапії і загального клінічного результату (Weaver and Cleveland 2006; Giam and Rancati 2007; Stallings 2007; Albertson et al., 2003). Порушення правильного розходження хромосом під час мейозу можуть бути причиною викиднів, безпліддя і генетичних захворювань, такі як синдром Дауна та інші (Pezza 2015, Andreieva et al., 2017). Проте, оскільки рослини мають більш пластичний геном, в експериментах спеціально провокують аномальний поділ клітин для створення поліплоїдних генотипів або нових сортів (dErfurth 2009; Scattler et al., 2016).

Сегрегація хромосом є складним процесом, вдосконаленим в ході

еволюції і має контрольні пункти та механізми корекції помилок, оскільки точність і відповідність передачі хромосомного матеріалу дочірнім клітинам мають бути дуже високими. Припускають, що із приблизно 5000 генів еукаріотів для правильної сегрегації хромосом використовується біля 500 генів (Yanagida 2005). Дані досліджень поведінки хромосом на клітинах дріжджів (Marston 2014; Kim et al., 2013), нематод (Maddox et al., 2004; Muscat et al. 2015), дрозофіл (Herzig et al. 2002; McKim et al. 2002), рослин (Harrison et al. 2010; Zamariola et al. 2014), хребетних (Vorozhko et al. 2008; Schwartzman et al. 2010) свідчать про те, що основні механізми, що контролюють сегрегацію хромосом подібні для всіх еукаріотів, так як і багато генів, що беруть участь в цих процесах, еволюційно консервативні.

1.1.1. Механізми контролю поділу клітини.

При поділі еукаріотичної клітини хромосоми мають бути правильно розподілені між дочірніми клітинами. Це забезпечує механізм переміщення хромосом в певних напрямках в батьківській клітині. Під час мітозу та другого поділу мейозу відокремлюються одна від одної сестринські хроматиди, тоді як в першому поділі мейозу відбувається розходження гомологічних хромосом, що призводить до зменшення плоідності та утворення гамет. Точний розподіл генетичного матеріалу у еукаріотів залежить від реалізації трьох основних принципів: 1) необхідності створення сили, що генерує рух хромосом, 2) хромосоми повинні бути зв'язані з клітинними структурами, які будуть посередниками розходження, 3) елементи хромосом повинні бути зчеплені перед відокремленням (Peters and Hauf 2006; Sept 2007).

1. Створення сили, необхідної для руху хромосом і їх розходження, забезпечує біполярна структура - веретено поділу. Ця структура складається з антипаралельного масиву мікротрубочок, кожна з яких представляє собою протеїновий полімер (гетеродимер α - і β -тубуліну) з мінус кінцем, направленим до полюсу веретена, та плюс кінцем, спрямованим від полюса до хромосоми (Wittmann et al. 2001; Walczak et al. 2010). Мікротрубочки

формують тринадцять паралельних протофіламентів, які з'єднуються між собою і утворюють структуру полого циліндра (Nogales et al. 2000). У тварин і дріжджів мікротрубочки зароджуються в центрах організації мікротрубочок, таких як центросоми і полярні базальні тільця, які відповідають за організацію астральних масивів мікротрубочок в інтерфазі і мітотичного веретена під час поділу клітин (Jaspersen and Winey 2004). На відміну від тварин і дріжджів, рослини не мають помітних організаційних центрів. Тим не менше, тут мікротрубочки організовані у впорядковані масиви, які пов'язані з характером росту рослинної клітини, і їх нуклеація відбувається на ядерній оболонці (Horio and Murata 2014). Динамічні властивості мікротрубочок дозволяють їм рости або скорочуватися завдяки додаванню або втраті димерів тубуліна на кінцях полімеру (Sept 2007).

2. Посередником з'єднання мікротрубочок і хромосом виступає кінетохор. Це білковий комплекс, який збирається на певній ділянці хромосоми - центромері, де в нуклеосомі гістон H3 замінено на варіант CENP-A (у тварин та людини) або CENH3 (у рослин). Кінетохор складається з великої кількості різних білків, кожен з яких присутній у багатьох копіях в кінетохорі. Розглядаючи відносну просторову локалізацію цих білків та їхні різноманітні функції, їх можна поділити на три основні категорії: (1) внутрішній кінетохор, необхідний для формування з'єднання з хромосомною ДНК і забезпечення платформи для збірки кінетохору, (2) зовнішній кінетохор, який утворює зв'язок з мікротрубочками, і (3) регуляторні білки, які слідкують або контролюють роботу кінетохору (Ruchaud et al. 2007; Cheeseman 2014). Крім того кінетохор безпосередньо змінює динаміку мікротрубочок. Ця поведінка регулюється за допомогою білків, які зв'язуються з кінцями мікротрубочок (Umbreit et al. 2012). Таким чином, кінетохор контролює і використовує силу, створену мікротрубочками, щоб перетворити її на направлений рух хромосом.

3. Без контрольного механізму над мікротрубочками та кінетохорами хромосоми рухалися б у будь-якому напрямку. Для спрямованого руху в протилежних напрямках необхідно, щоб хромосоми або хроматиди були

фізично пов'язані, щоб протистояти силам веретена і полегшити прикріплення до мікротрубочок з протилежних полюсів. У мітозі цю функцію виконує когезин, який є мульти-протеїновим комплексом. Він пов'язує сестринські хроматиди в мейозі та мітозі завдяки утриманню їх в своїй кільцевій структурі (Сиволоб і Афанасьєва 2012). Когезиновий білковий комплекс високо консервативний в еукаріотів і складається з чотирьох еволюційно консервативних білків, широко вивчених на дріжджах і тваринах. У мітозі когезиновий комплекс складається з двох членів сім'ї SMC (structural maintenance of chromosomes), SMC1 і SMC3, і двох допоміжних SCC субодиниць (sister chromatid cohesion), α -клеїзину Rad21/SCC1 і SCC3. У мейозі структура когезину дуже схожа, за винятком компоненту Rad21/SCC1, замість якого присутній його аналог Rec8, і грає важливу роль в сегрегації гомологічних хромосом (Brooker and Berkowitz 2014; Duro and Marston 2014). Конденсин, який також належить до великого білкового комплексу, по структурі аналогічному когезиновому, надає хромосомам компактної стрижневої структури, яка забезпечує їх захоплення і рух під час сегрегації (Hirano 2012). Конденсин і когезин зконцетровані в перицентромерних районах хромосом і дозволяють врівноважити сили веретена так, щоб розтягнути, а не розірвати хромосоми (Stevens et al. 2011).

Кінетохори захоплюють мікротрубочки стохастичним чином. Проте для рівного розподілу хромосом між дочірніми клітинами важливо, щоб кінетохори парних хроматид (під час мітозу та 2го поділу мейозу) були приєднані до мікротрубочок, що походять від протилежних полюсів. Нормальне біполярне прикріплення кінетохор до протилежних полюсів називається амфітелічним (Сиволоб і Афанасьєва 2012; Tanaka 2010). Однак під час поділу клітин іноді утворюються деякі неправильні конфігурації. Приєднання одного кінетохора до одного полюсу поділу називається монотелічним. Приєднання відразу двох кінетохор однієї хромосоми до одного полюсу поділу називається синтелічним. Можливо також і меротелічне прикріплення, при якому один кінетохор з'єднується відразу з двома

полюсами (Duro and Marston 2015).

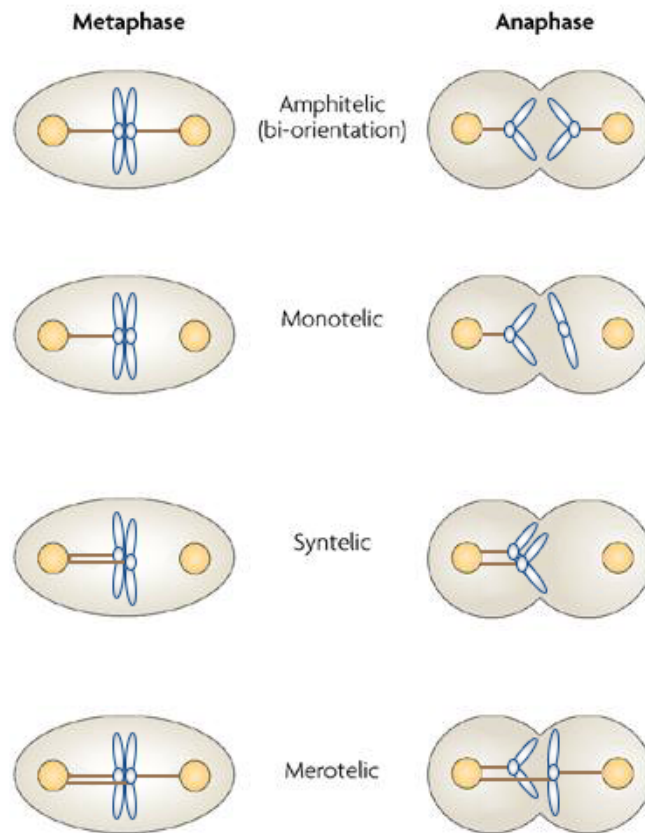


Рис. 1.1. Аномальні кріплення мікротрубочок до кінетохор (Musacchio and Salmon 2007).

Недавні дослідження показують, що меротелічне з'єднання кінетохор являє собою механізм, який сприяє анеуплоїдії в мітотичних клітинах і є основною причиною хромосомної нестабільності в клітинах раку (Cimini 2008; Gegan et al. 2011). Щоб запобігти неправильному приєднанню, активується механізм (the spindle assembly checkpoint), який затримує перехід клітинного циклу з метафази в анафазу, щоб виділити більше часу хромосомам для досягнення належного біполярного приєднання мікротрубочок до кінетохор. В основі цього механізму лежить напруженість. Принципове значення напруженості вперше було доказано завдяки витонченим експериментам з проведенням мікроманіпуляцій на клітинах комах, які

показали, що наявність напруженості використовується як зчитування точності (Nicklas et al. 1995; Nicklas 1997). Коли сестринські кінетохори біполярно орієнтовані, тягове зусилля веретена поділу протидіє когезіновим зв'язкам між сестринськими хроматидами, генеруючи напруженість між кінетохорами. Це відбувається тільки в тому режимі прикріплення, коли підводиться рівна сила до кожного сестринського кінетохору. Штучне створення натягу до кінетохор стабілізує мікротрубочки і збільшує кількість кінетохорних з'єднань (Nicklas et al. 1995; King and Nicklas 2000). Кінетохори міцно зв'язуються зі зростаючими мікротрубочками та слабо з тими, що скорочуються, супресуючи таким чином деполімеризацію мікротрубочок (Akiyoshi et al. 2010). Розтягування сестринських центромер видаляє кінетохори з області дії кінази Аугога В, яка постійно фосфорилує компоненти кінетохор в межах своєї досяжності, щоб звільнити їх від поєднання з мікротрубочками (Welburn et al. 2010; Krenn et al. 2015). Вивільнюючи кінетохор, Аугога В таким чином відіграє вирішальну роль у забезпеченні правильного з'єднання “хромосоми-мікротрубочки” двома способами: послаблюючи кріплення зовнішніх кінетохорних білків до мікротрубочок і безпосередньо дестабілізуючи кінці мікротрубочок, приєднаних до кінетохор (Sarangapani et al. 2013; Kelly and Funabiki 2009). Коли всі кінетохори правильно прикріплені до мікротрубочок, створюється сигнал, націлений на руйнування зчеплення між хромосомами за допомогою спеціального ферменту сепарази і який сприяє сегрегації хроматид або хромосом та виходу з мітозу або мейозу.

1.1.2. Головні відмінності мітозу і мейозу.

Вище описані механізми контролю поділу клітини під час мітозу і мейозу дуже подібні за виключенням деяких розбіжностей. Суттєва різниця полягає в принципі розподілу генетичного матеріалу між дочірніми клітинами. У мітозі відбувається розходження сестринських хроматид по дочірнім клітинам, в результаті чого нові клітини отримують ідентичний набір

генетичного матеріалу, як і у батьківській клітині. Тобто кількість хромосом до і після поділу не змінюється. Мейоз складається з двох послідовних поділів ядра, в результаті яких зменшується кількість хромосом вдвічі, а отже і рівень плоідності. Так з одної батьківської клітини утворюються чотири дочірні гаплоїдні клітини (гамети).

Як було сказано вище, у мітозі точна сегрегація хромосом залежить від встановлення правильної (амфітелічної) орієнтації кінетохор. В мітотичних хромосомах, сестринські кінетохори розташовані таким чином, що сприяє їхній біорієнтації. Як припускають, вони мають геометрію “спина до спини”, що сприяє захопленню мікротрубочок з протилежних полюсів, а правильне з’єднання кінетохор з мікротрубочками залежить від архітектури хромосом (що диктують когезін і конденсін) і генерації напруги (Replowska et al. 2014; Verzijlbergen et al. 2014).

Мейоз, спеціалізований поділ клітин, що призводить до утворення гаплоїдних гамет з диплоїдної клітини-попередника, базується на тих же основних принципах, але з деякими змінами. У першому мейотичному поділі (мейоз I) гомологічні хромосоми розходяться одна від одної, в той час як сестринські хроматиди мігрують разом. Цей поділ ще називають редукційним, оскільки він призводить до зниження плоідності вдвічі. У другому поділі мейозу (мейоз II), так як і в мітозі, відокремлюються сестринські хроматиди. Три важливі особливості лежать в основі мейозу I: (1) гомологічні хромосоми фізично пов'язані між собою і утворюють, як правило, хіازми, продукти гомологічної рекомбінації; (2) сестринські кінетохори моноорієнтовані до одного полюса веретена; (3) зчеплення втрачається поетапно: спочатку на хромосомних плечах під час першого поділу, а потім і в перицентромерних районах в анафазі мейозу II (Duro and Marston 2015).

Аналогічно мітозу, для забезпечення двонаправленої орієнтації тільки вже не хроматид, а гомологічних хромосом в мейозі I, фізичні зв'язки, які можуть протидіяти напруженню від веретена поділу, генеруються шляхом гомологічної рекомбінації. Так, спочатку на стадії лептотени відбувається

кон'югація гомологічних хромосом, починаючи з теломер по всій довжині; це спарювання стабілізується білковими структурами, які називаються сінаптонемним комплексом. На наступному етапі рекомбінація починається з дії ендонуклеази Spo11, яка спеціально вводить дволанцюгові розриви вздовж однієї з хроматид. Частина цих розривів відновлюється за допомогою хроматиди іншої гомологічної хромосоми, утворюючи подвійне з'єднання Холідея. В залежності від того, як розійшлося це з'єднання, між якими хроматидами, можливі різні варіанти: кросинговер, конверсія або сестринський хроматидний обмін (Коряков и Жимулев 2009). Створені фізичні зв'язки між гомологами називаються хіазмами, а отримана пара гомологічних хромосом - бівалентом. Однієї хіазми достатньо, щоб підтримувати напруження - протидію веретену поділу, необхідну для точності розходження хромосом (Hillers and Villeneuve 2003). Аналогічно бі-орієнтації сестринських хроматид у мітозі, напруженість та дія кінази Aurora B відіграють важливу роль в досягненні правильної орієнтації кінетохор у гомологів в мейозі (Meyer et al. 2015). В той же час кінетохори сестринських хроматид повинні мати моноорієнтовані кінетохори, щоб відійти під час мейозу I в складі одного гомолога. Модель можливого механізму моно-орієнтації сестринських кінетохор завдяки їхньому з'єднанню була підтверджена дослідженнями за допомогою флуоресцентної мікроскопії на мейоцитах кукурудзи (Li and Dawe 2009). Також під час мейозу в центральному ядрі центромери збагачуються мейоз-специфічною субодиницею Rec8 когезину, яка, як вважають, сприяє розташуванню сестринських кінетохор "пліч-о-пліч" для їхньої ефективної моно-орієнтації (Sakuno et al. 2009).

1.1.3. Соматична редукція хромосом як порушення мітозу.

Отже існує два основних типи розмноження клітин в природі: мітоз і мейоз. Мітоз забезпечує стабільне успадкування генома дочірніми клітинами і ідентичні набори хромосом для всіх соматичних клітин багатоклітинного

організму. Мейоз приводить до зменшення числа хромосом вдвічі у новостворених клітинах порівняно з материнською клітиною з випадковим розподілом батьківських і материнських хромосом між дочірніми клітинами і новою комбінацією алелів за рахунок гомологічної рекомбінації. У той же час є багато свідчень про різноманітні випадки нестабільності геному в соматичних тканинах, які відносять до мутацій і мітотичних порушень. Загалом, базовий набір хромосом, як правило, має тенденцію до збільшення в цілому, оскільки збалансована поліплоїдія має більшу життєву здатність, ніж незбалансований набір хромосом (Yousafzai et al. 2010; Sytnyk et al. 2012). Поліплоїдія надзвичайно поширена у природі. Кількість поліплоїдних видів серед квіткових рослин достатньо висока і оцінюється в межах 50-70% (Otto and Whitton 2000; Kellogg and Bennetzen, 2004). А також, це не рідкісна ситуація у тварин (Wolfe 2001). Геномна пластичність соматичних тканин може бути спровокована механізмами адаптації. Приклади нестабільності вмісту ДНК в соматичних клітинах під впливом умов навколишнього середовища і стресових факторів представлено в огляді (Li 2009). Поряд зі збільшенням вмісту ДНК, числа хромосом і цілих геномів в соматичних тканинах, є численні факти протилежних процесів - втрата певних хромосом, алелів або цілих геномів. Різні механізми можуть бути причетними до цих видів змін, але вони не достатньо досліджені. Втрата гетерозиготності (LOH), як правило, пов'язана з втратою деяких алелів або частин груп зчеплення і вважається наслідком мітотичної рекомбінації хромосом (Schuermann et al. 2005). Втрата однієї або декількох груп зчеплення (цілих хромосом) (Baker et al. 2009), або цілих геномів відноситься до соматичної редукції хромосом. Елімінація хромосом в соматичних тканинах віддалених гібридів є добре задокументованим процесом (Gernand et al. 2006; Sanei et al. 2011).

У рослин геномна пластичність і життєздатність генетично змінених клітин значно вища, ніж у тварин. Крім того, соматичні клітини рослин з успадкованими генетичними змінами здатні дати початок новому організму, як у природі, так і в умовах *in vitro*. Дослідження мінливості і нестабільності

геному у рослин становить особливий інтерес як для фундаментальних так і прикладних цілей.

1.1.4. Приклади соматичної редукції гомологічних хромосом.

У 20 столітті було проведено безліч досліджень з різними видами рослин, за якими встановлено факти сегрегації гомологічних хромосом в соматичних тканинах (табл. 1.1). Більшість з них спиралися на цитологічні спостереження або морфологічну характеристику рослин (Jones 1937; Menzel 1952) і лише кілька - на результати безпосереднього аналізу ДНК, наприклад, цитофотометрії (Giorgetti et al. 1995) або ДНК-маркерів (Chen et al. 2001; Wang et al. 1999). Це є однією з головних проблем, тому що традиційний метод давлених препаратів дозволяє встановити лише наявність феномену, але не дає жодної інформації про долю клітин.

В літературі найчастіше згадуються два явища, які описують розходження гомологічних хромосом: редукційне угруповання та мейозоподібний поділ (соматичний мейоз). Редукційне угруповання означає розподіл хромосом у клітині, що ділиться на дві або більше однакових або нерівних груп. Термін мейозоподібний поділ використовується у випадках хіазм і кон'югації хромосом, які можна спостерігати на цитологічних зразках. Невідомо, чи ці два цитологічні спостереження стосуються різних явищ, бо їхні механізми ще не ідентифіковані. Багато питань, що стосуються соматичного мейозу залишаються невизначеними. Дочірні клітини, отримані після розходження гомологічних хромосом, можуть відновитися до диплоїдного стану за рахунок ендоредуплікації (рис. 1.2). Або клітини можуть пройти другий мейотичний поділ з утворенням гаплоїдних клітин. У разі непроходження цитокінезу і подальшого злиття чотирьох гаплоїдних ядер можуть виникати тетраплоїдні клітини (Ronchi et al. 1992b; Chen et al. 2001). У будь-якому випадку, незалежно від механізму, зменшення числа хромосом з наступним поділом хроматид вочевидь призводить до гомозиготації однієї або декількох груп зчеплення. У теорії, втрата одного з двох батьківських геномів

або випадкова елімінація батьківських чи материнських гомологів зі зменшенням числа хромосом вдвічі призводить до повної гомозиготації, але й досі залишається невідомим, чи можуть такі процеси приводити до утворення повністю гомозиготних соматичних клітин зі збалансованим набором хромосом.

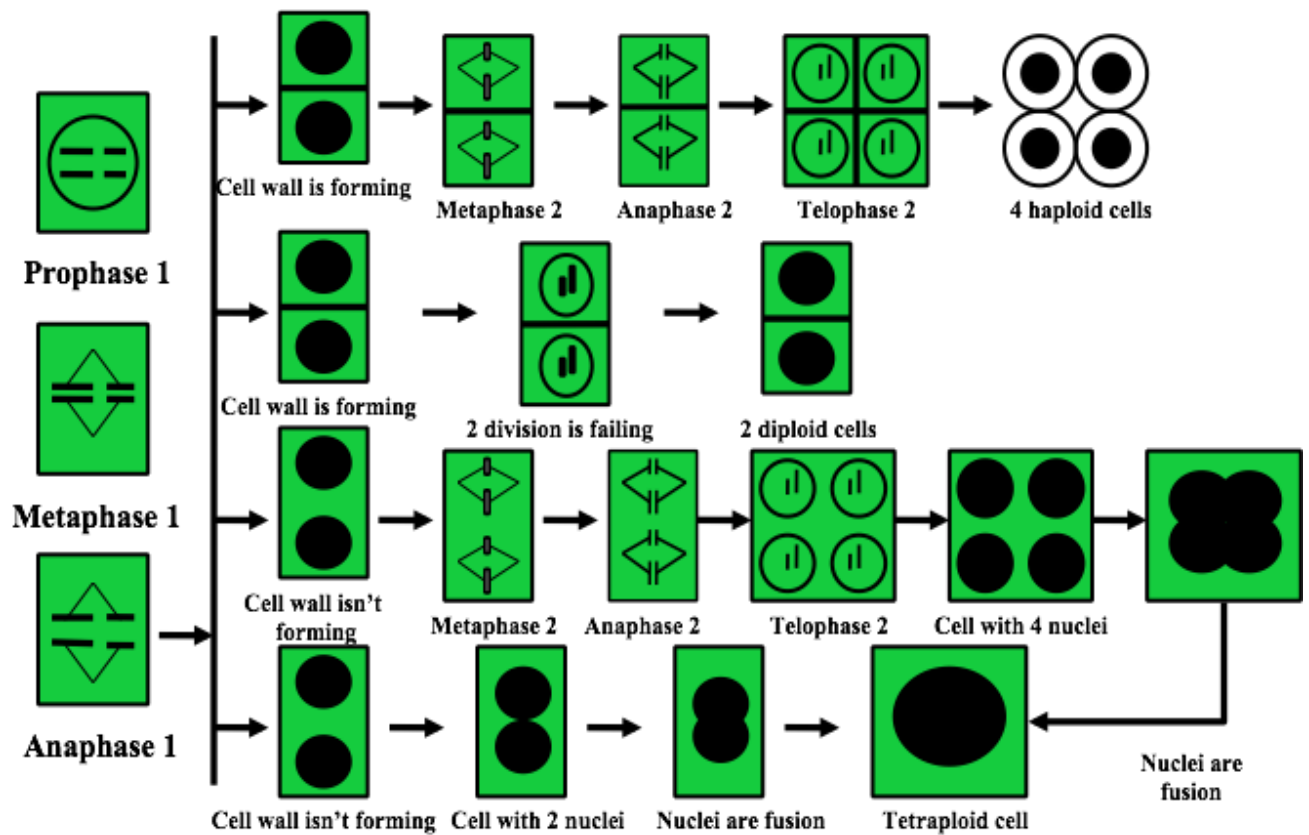


Рис. 1.2. Ймовірний механізм соматичної сегрегації, що приводить до редукції числа хромосом (Chen Yihua et al. 2000).

Випадки зменшення числа хромосом в соматичних тканинах можуть відбуватися як спонтанно, так і за дії різних фізичних та хімічних чинників. Такі процеси відбуваються і у міжвидових гібридів (Sanei et al. 2011, Ishii et al. 2016; Brown 1947) і в поліплоїдів (Menzel 1952; Sanders and Franzke, 1962). Поліплоїдію взагалі можна розглядати як додатковий чинник, який зумовлює індукцію явища соматичної редукції хромосом. Існує багато доказів хімічно індукованої соматичної сегрегації (табл. 1.1), і це дає надію на те, що такі процеси можуть бути керованими. З іншого боку, аналіз хімічних реагентів, які

індукують соматичну сегрегацію, може допомогти пролити світло на біохімічні механізми явища. Різні автори, що вивчали різноманітні об'єкти, типи клітин, генотипи і експериментальні умови (табл. 1.1), інтерпретуючи власні результати, висловлюють різні припущення щодо причин і наслідків соматичної редукції. Хаскінс, який був одним з перших, хто спробував систематизувати вивчення соматичної редукції у рослин в 1950, бачив можливості для використання цього явища в селекції рослин, а саме для отримання гомозиготних диплоїдних ліній і нащадків, які відтворюють батьківські форми (Huskins 1948). Броу і Мензель (Brow and Menzel 1952) провели аналогію між мейозом, механізмом збалансованого утворення гамет, і соматичною редукцією, процесом, що усуває хромосоми одного з видів у гібриді і встановлює більш життєздатний організм зі стабільним геномом. При встановленні випадків соматичної редукції і анеуплоїдних материнських клітин пилку в міжсорттовому гібриді *Chrysanthemum carinatum* Рана припускав, що соматична редукція може бути фактором видоутворення (Rana 1965). Сторі (Storey 1968), ґрунтуючись на своїй роботі з диференціації клітинних шарів апогеотропних коренів у саговникових, стверджував, що зменшення числа хромосом - це природний онтогенетичний процес для цих об'єктів. В серії експериментів, які досліджують вплив колхіцину на сорго, показано цікаві результати (Atkinson et al. 1957; Sanders and Franzke 1962; Simantel et al. 1963; Simantel and Ross 1963). Насамперед, була виявлена залежність появи соматичної редукції від генотипу. Потім була отримана інформація про стабільність розподілу хромосом по групам. У більшості проаналізованих клітин хромосоми були розподілені на рівні або приблизно рівні групи (10:10, 9:11 і 8:12). Але у ряді випадків було знайдено розподіл в більш ніж двох групах. Проте, автори не змогли виявити закономірність поведінки гомологічних хромосом (Atkinson et al. 1957). Ця остання задача була частково розглянута в двох інших дослідженнях (Simantel 1963; Simantel and Ross, 1963), де структурні хромосомні маркери (реципрокні транслокації) були введені в рослини сорго. Були створені гетерозиготні рослини з

маркерними хромосомами і таким чином отримано гібрид, який дозволяє відрізнити гомологічні хромосоми. В результаті обробки колхіцином гібридів були отримані гомозиготні рослини. Автори прийшли до висновку, що єдиний механізм появи гомозиготації - це соматична сегрегація гомологічних хромосом, в результаті якої звичайні хромосоми відділяються від хромосом з транслокацією. Проте подібні експерименти з впливом колхіцину на гетерозиготний ячмінь, проведених Sybenga (2000), не виявили гомозиготних секторів. Систематичне вивчення індукованого редукційного поділу в соматичних тканинах було зроблено Мера та ін., результати якого представлені в серії публікацій (Mehra and Dhiman 1986a,b; Mehra et al. 1986c; Mehra 1986d). Було проаналізовано вплив пуринових і піримідинових похідних і ДНК/РНК нуклеїнових кислот. Через легкість морфологічної ідентифікації всіх трьох ($n = 3$) хромосом *Pterotheca falconeri* автори змогли встановити, що під час мейозоподібного поділу розходяться гомологічні хромосоми. У кінчиках корінців цієї рослини, яку обробляли різними хімічними речовинами, спостерігались перший і другий поділи мейозу, і найвища частота таких випадків отримувалась за допомогою кофеїну. Chen et al. (2000) також отримували високий відсоток соматичного мейозу, викликаний кофеїном у *Vicia faba*. В своїй статті автори висловили думку про можливість розвитку системи виробництва гаплоїдів з використанням соматичних клітин в якості альтернативи системі подвійних гаплоїдів (double haploids), яких отримують з регенерованих мікро- і макроспор.

Багато досліджень з культивування дедиференційованих клітин *in vitro*, та/або регенерованих тканин дуже цікаві для подальшого застосування (Giorgetti et al. 1995; Geri et al. 1999; Chen et al. 2001). Група Рончі намагалася вивчити взаємозв'язок між розвитком соматичних ембріонів моркви (*Daucus carota* L.) і зміною вмісту ДНК (Ronchi et al. 1992a,b). Вони припустили, що випадки соматичної сегрегації можуть бути передумовою морфогенетичних процесів в культивованих *in vitro* соматичних клітинах, і що умови *in vitro*, як

фактори стресу, можуть активувати репродуктивні механізми, в тому числі мейотичні поділи.

Таблиця 1.1

**Порівняльний аналіз деяких літературних даних по вивченню
соматичної сегрегації**

Об'єкт	Первісні клітини, органи	Спонтанно/індуковано	Метод обстеження	Тип редукції	Макс. % фігур	генетичні наслідки
<i>O. sativa</i> (Wang, 2001)	соматичні клітини гібриду F1	спонтанно	RAPD	Асорта-тивний мітоз	-	гомозиготні F1
<i>A. thaliana</i> (Chen, 2001)	ембріогенні калусні клітини	культура <i>in vitro</i>	давлені препарати	ПУ*	12	Клітини різної плоідності
				МПП**	н/д	
<i>V. faba</i> (Chen, 2000)	коренева меристема	кофеїн	давлені препарати	ПУ	54	гаплоїдні клітини
				МПП	н/д	
<i>D. carrota</i> (Ronchi, 1992a)	ембріогенні клітинні лінії	культура <i>in vitro</i>	цитометрія RFLP RAPD	ПУ	1-3	гомозиготні регенеранти
				МПП	н/д	
<i>D. carrota</i> (Ronchi, 1995)	ембріо-/не ембріогенні клітинні лінії	культура <i>in vitro</i>	цитометрія давлені препарати	ПУ	н/д	клітини різної плоідності

Продовження таблиці 1.1

Об'єкт	Первісні клітини, органи	Спонтанно/індуковано	Метод обстеження	Тип редукції	Макс. % фігур	генетичні наслідки
<i>P. falconeri</i> (Mehra and Dhiman, 1986)	коренева меристема	пуринові і піримідинові похідні	давлені препарати	ПУ	54.54 для кофеїну	гаплоїдні і анеуплоїдні клітини
				МПП	23.79 для урацилу	
<i>Cycadaceae</i> (Storey, 1968)	шар клітин з апогеотропної і кореневої коркової тканини	спонтанно	давлені препарати	соматична редукція	н/д	клітини з хромосомним числом менше 2n
<i>Sorghum</i> (4n)(Sanders and Franzke, 1962)	проростки	колхіцин	давлені препарати материнських клітин пилку	соматична редукція	н/д	диплоїдні і міксоплоїдні клітини пилку

Примітка: *ПУ – профазне угруповання, **МПП – мейозоподібний поділ

Суттєве спостереження проведено Чен (Chen et al. 2001). У своєму дослідженні він відмітив, що тетраплоїдні клітини *A. thaliana*, культивовані *in vitro*, показали більше випадків редукційного угруповання ніж диплоїдні клітини. Автори не коментують далі цей факт, але гіпотетично можливо, що

зменшення числа хромосом у поліпоїдів може бути компенсаційним механізмом, який призводить до відновлення диплоїдного стану. Деякі інші результати також можна пояснити в рамках цього припущення (Sanders and Franzke 1962; Ronci et al. 1992a).

Можливо, найбільш практичні результати були отримані в групі R. R.-C. Wang. В своїх експериментах з селекції рису (*Oryza sativa*) вони виявили явище втрати гетерозиготності (LOH). Була встановлена гомозиготність окремих пагонів за 14 RAPD-маркерами (випадково ампліфікована поліморфна ДНК), розподіленими по 6 хромосомам, а також морфологічні відмінності у деяких рослин в F1 поколінні, в той час як інші пагони одних і тих же рослин F1, як і очікувалося в результаті схрещування, були гетерозиготними (Wang et al. 1999). Поява гомозиготних тканин зі стабільним диплоїдним геномом і рекомбінантними батьківськими ознаками (RAPD маркери) пояснюється авторами механізмом, який вони назвали “асортативним мітозом” (Wang et al. 2001) - мейозоподібною поведінкою гомологічних хромосом.

Незважаючи на те, що більшість авторів вказують на значні можливості практичного застосування розглянутих явищ (Huskins 1948; Simantel and Ross, 1963; Sybenga 2000; Chen et al. 2000; Wang et al. 2001), реальність його реалізації - все ще в далекому майбутньому. Детальний аналіз літератури вказує на іноді суперечливі дані, що можуть самі по собі означати, що ми маємо справу з різними явищами, і/або бути наслідком методологічних неузгодженостей. Питання, які поки залишаються без відповіді:

- Які причини цих незвичайних соматичних поділів, зазначених вище? Вирішальне значення тут має питання, чи є які-небудь переваги для самих рослин від таких типів поділу? Це природний механізм, або відхилення, або це залежить від певних факторів?

- Інше питання, що дуже важливе як для фундаментальних досліджень, так і практичного застосування, чи можемо ми вплинути на ці явища і їх контролювати? Щоб відповісти на це, ми повинні чітко розуміти ряд процесів, молекулярні механізми і генетичні наслідки явищ; наявність генетичних

детермінант, зовнішніх факторів і внутрішніх агентів, керуючих явищами; умови для збалансованого або незбалансованого розподілу хромосом і формування анеуплоїдних клітин; випадковість і закономірність в розподілі батьківських і материнських хромосом; рівень плідності клітин і причини, що впливають на нього; ймовірність гомологічної рекомбінації під час мейозоподібного поділу клітин.

1.2. Методологія дослідження геномів та поведінки хромосом

Виявлення та аналіз генетичної мінливості може допомогти нам зрозуміти молекулярну основу різних біологічних явищ в рослинах. Хоча секвенування ДНК – простий підхід для ідентифікації зміни у локусі, це дорого і трудомістко. Поки все рослинне царство не буде просеквеновано, саме молекулярні маркери і їх кореляція з фенотипами може надати нам необхідні орієнтири для з'ясування генетичного поліморфізму.

Концепція генетичних маркерів не нова. Грегор Мендель використовував у своєму експерименті в XIX столітті генетичні маркери на основі окремих ознак фенотипу. Пізніше використання фенотипових маркерів дрозофіли призвело до виникнення теорії генетичного зчеплення. Обмеження у використанні фенотипових маркерів призвело до розробки більш загальних і корисних молекулярних маркерів. Молекулярні маркери включають біохімічні складові (наприклад, вторинні метаболіти рослин) і макромолекули, а саме білки і ДНК. Аналіз вторинних метаболітів, однак, обмежений тими рослинами, які виробляють відповідний діапазон метаболітів, що можуть бути легко проаналізовані, і за якими можна розрізняти сорти. Ці метаболіти повинні бути ідеально нейтральними до впливу навколишнього середовища або практичного використання. Молекулярні ДНК маркери можуть і не корелювати з фенотиповою експресією ознак, але вони мають численні переваги порівняно з традиційними альтернативами на основі фенотипу, так

як вони стабільні і виявляються в усіх тканинах, незалежно від розвитку, диференціації клітини, навколишнього середовища, плейотропних та епістатичних ефектів.

1.2.1. ДНК маркери.

ДНК маркери являють собою певний сегмент ДНК (в основному повторювані послідовності), який дозволяє відрізнити організми на рівні генома. Цей підхід був розроблений завдяки дослідженню структурної організації геномів організмів.

Геном рослин складається із послідовностей двох типів: унікальних і повторюваних. Унікальні послідовності зустрічаються в геномі один або декілька разів. Вони відповідають структурним і регуляторним генам та мають комплексну організацію. Важливим кроком вперед в генетичній ідентифікації стало відкриття того, що близько 30-90% геному практично всіх еукаріотів становить повторювана ДНК, яка є досить поліморфною. Такі ділянки геномів містять генетичні локуси з кількома сотнями алелів, які відрізняються один від одного довжиною, послідовністю або одночасно тим і другим, і вони перемежуються масивами тандемних повторів. Повторювані ділянки ДНК відіграють важливу роль у “поглинанні” мутацій в геномі. З мутацій, які відбуваються в геномі, тільки успадковуванні мутації відіграють важливу роль в еволюції та мінливості. Таким чином, повторювані послідовності ДНК і функціональний характер мутацій разом утворюють базис для визначення системи маркерів, корисних для застосування в аналізі геному рослин. Повторювані послідовності можуть мати або просту структуру у вигляді повторів певного мотиву довжиною від 2-9 п.н. (мікросателітна ДНК) до 10-100 п.н. (мінісателітна ДНК) та більше 100 п.н. (сателітна ДНК), або ж являють собою чисельні копії більш складних послідовностей, які часто відносяться до мобільних генетичних елементів. До повторюваних послідовностей відносяться також деякі гени (гени рибосомної РНК) (Sharma and Raina 2005). Маркери, що належать до цього типу, ідентифікуються за допомогою

гібридизації з міченими сателітними зондами і ПЛР.

Сателітна, міні- і мікросателітна ДНК

Мікросателітні послідовності (SSR, Simple Sequence Repeats) являють собою короткі тандемні повтори (2-9 п.н.), які широко розповсюджені в геномах еукаріотів і зустрічаються в прокаріотичних геномах (Morgante et al. 2002; Tautz et al. 1986). Серед рослин найбільш розповсюджені ди- і тринуклеотидні повтори, в основному (AT)_n та (GT)_n, для тварин найбільш характерні тандеми (AC)_n. Тринуклеотидні повтори представлені мікросателітами виду (TAT)_n, хоча у окремих таксонів спостерігаються власні домінуючі повтори, наприклад (CGG)_n/(CCG)_n, які характерні для генома рису (Röder et al. 1995; Rakoczy-Trojanowska and Bolibok 2004).

Мінісателіти складаються з тандемно дуплікованих елементів середньої довжини (10-100 п.н.), які утворюють послідовності розміром від 0,5 до декількох т.п.н. (Vergnaud and Denoeud 2000). Чутливість процесу ампліфікації мінісателітів до подвійних розривів робить їх унікальними маркерами для моніторингу іонізуючого опромінення (Dubrova et al. 1998). Незважаючи на високу мутабільність мінісателітів, деякі корові повторювані послідовності із геномів людини та рослин виявилися схожими між собою (Vergnaud and Denoeud 2000).

Мікросателіти і мінісателіти таким чином, становлять ідеальну систему маркерів. Вони містять тандемні повтори, які розрізняються за кількістю повторюваних ланок між генотипами. Деякі з характерних особливостей цих маркерів у тому, що вони кодомінантні, успадковуються за законами Менделя, і у них існує багато алелів в популяції, рівень гетерозиготності яких високий.

Сателітна ДНК відрізняється від міні- та мікросателітних послідовностей як по структурі, так і по функціональному навантаженню. До цього класу повторів відносять доволі протяжні (до декількох млн. п.н.) послідовності мономерів різного розміру. Найбільш розповсюджені сателітні мономери мають довжину 140-180 і 300-360 п.н., що відповідає довжині ДНК на одній або двох нуклеосомах (Vershinin 2006).

В багатьох випадках функції сателітної ДНК добре вивчені. Центромерні райони хромосом багатьох видів рослин складаються із протяжних сателітних повторів, які містять вставки мобільних елементів і навіть окремих генів. Для *A. thaliana* та кукурудзи було показано, що мотив центромерної сателітної ДНК бере участь у взаємодії центромери з кінетохором, специфічно зв'язуючись з певними білками. Інші сателітні послідовності можна знайти в термінальних районах, а також в характерних вузликах (knob) на А-хромосомах кукурудзи. У деяких видів роду *Allium* сателітні послідовності навіть замінюють канонічні теломерні мотиви виду (TTTAGGG)_n, характерні для більшості рослин (Sharma and Raina, 2005).

У дослідженнях, присвячених процесам мінливості генома у *A. thaliana*, ми використовували маркери SSLP (Simple sequence length polymorphism). Ці мікросателітні маркери мають кодомінантний тип спадкування, прості в застосуванні, вимагають мінімум витрат реактивів і часу і вельми інформативні (Зими́на и др., 2014)

Мобільні генетичні елементи

Інші повторювані послідовності є дисперсними послідовностями і за своїм вмістом в деяких випадках досягають 50 і більше відсотків ядерної ДНК (Bowen and Jordan, 2002; Feschotte et al., 2002). Мобільні елементи рослин поділяються на декілька типів залежно від структури та механізму переміщення. Головним чином мобільні елементи поділяють на дві основні групи: ретротранспозони (під час своєї реплікації проходять через стадію зворотної транскрипції РНК - ДНК) і транспозони, які завжди переміщуються у вигляді фрагментів ДНК (Feschotte et al. 2002). Серед представників ДНК-транспозонів можна назвати мобільні елементи кукурудзи Ac (автономний) і Ds (неавтономний), за відкриття яких Барбара МакКлінток отримала Нобелівську премію в 1983 році (Diao et al. 2006).

1.2.2. Флуоресцентна гібридизація *in situ*.

ДНК гібридизація *in situ* – це цитогенетичний метод, який дозволяє

фізично локалізувати на метафазних хромосомах або в інтерфазному ядрі певні послідовності ДНК, які використовуються в якості проб. В якості таких проб використовують різні класи послідовностей ДНК, в тому числі структурні (центромерні і теломерні), дисперсні і тандемні повтори, видоспецифічні послідовності, гени і RFLP-маркери (). За допомогою гібридизації *in situ* можливо поєднати інформацію про молекулярну структуру послідовності ДНК з її фізичним розташуванням на хромосомах на стадії метафази та інтерфази. Таким чином, можливо вивчити і зрозуміти геномну організацію у різноманітних видів (як з великими, так і з малими хромосомами) і дослідити просторовий розподіл послідовностей ДНК в метафазі, інтерфазі соматичних клітин і клітин на стадіях мейозу. Такі дослідження мають фундаментальне і практичне значення.

Проби, які використовуються для гібридизації *in situ*, дозволяють ідентифікувати хромосоми, а організація гібридизаційних сайтів забезпечує інформацією про еволюційні перебудови в геномі, або ті, що сталися останнім часом. Порівняння даних FISH аналізу віддалених видів дозволяє визначити спільні елементи геномної організації різних видів. FISH аналіз дає можливість вивчати як види з самими маленькими геномами серед відомих рослин включаючи *Arabidopsis* і *Citrus* (до 300 млн.п.н.), так і види з великими геномами, такі як пшениця і сосна з розміром до 25000 млн.п.н. (Schwarzacher and Heslop-Harrison 2000). Результати FISH дають можливість будувати детальні моделі великомасштабної геномної структури всередині окремих видів, вивчаючи взаємозв'язки між повторюваними послідовностями ДНК, генами і генною активністю. Крім того використовуючи FISH можливо визначити розповсюдження послідовностей ДНК на метафазних хромосомах і в ядрі під час інтерфази, коли відбувається синтез ДНК, транскрипція і генна експресія.

Дуже часто гібридизацію *in situ* використовують в селекції рослин в різних аспектах. Зокрема, певні програми включають детекцію і порівняння чужорідних хромосом або хромосомних сегментів в потенційних селекційних

рослинних лініях з хромосомними сегментами різного походження. Завдяки FISH стали можливими розробка маркерів важливих для селекціонерів ознак, розуміння фізичної поведінки хромосом, хромосомної елімінації, генної експресії, еволюції і генного картування.

Детекція сайтів гібридизації є важливою частиною FISH аналізу, яка дозволяє візуалізувати сформовані продукти гібридизації. Необхідні кроки детекції залежать від модифікації нуклеотидів, використаних для мічення проб. Якщо для мічення використовуються прямі мічені флюорофори, то для візуалізації не потрібна іммуногістохімія, в такому випадку препарати забарвлюються і зразу використовуються для дослідження під мікроскопом. Проби, мічені біотином, потребують детекції авідином, стрептовідином, екстра-авідином або антитілами до біотину, якщо проби, мічені дигоксігеніном, тоді потрібен анти-дігоксігенін. Також часто використовуються антитіла до флюорофорів, зокрема флуоресцеїн. Антитіла та авідини зв'язуються з флюорофорами, ензимами або металами, що дозволяє детекцію в залежності від чутливості і роздільної здатності. Флуоресцентна система детекції використовується зазвичай для ДНК гібридизації *in situ* завдяки чіткій локалізації гібридизаційного сигналу, мультикольоровій детекції і різноманітним доступним флюорофорам. Колориметричне дослідження з використанням антитіл, що зв'язуються з ензимами, які каталізують осадження кольорових пігментів з субстратів, є більш трудомістким і менш просторово чітким ніж флуоресценція. Проте, деякі зразки можуть бути проаналізовані за допомогою світлової мікроскопії, також можуть бути більш чутливі і в більшості випадках використовуються для детекції РНК.

Для флуоресцентної детекції найчастіше використовується FITC (збудження синього спектру, жовто-зелена флуоресценція), родамін, Texas Red або Cy3 (збудження зеленого спектру, червона флуоресценція). Інші широко використовувані флюорофори – це кумарин (УФ збудження, синя флуоресценція) і Cy5 (червоне збудження, інтенсивна червона

флуоресценція), а також набори флуорофорів Alexa і Cy (Schwarzacher and Heslop-Harrison 2000). Якщо потрібно виявити дві, або більше проб одночасно, важливо обережно вибирати флуорофори, особливо якщо змішуються і використовуються одночасно декілька антитіл і реагентів детекції. Прямі проби, мічені флуорофорами, можливо об'єднувати з непрямими, і це не впливає на етапи виявлення непрямих міток.

Антитіла і авідини, що використовуються на різних етапах детекції, мають високі афінність і специфічність до мічених молекул. Оскільки вони надійніші і легші у використанні ніж антибілкові антитіла, то їх можна змішувати не зважаючи на інтерференцію і втрату інтенсивності виявлення за багатоцільових експериментів. Завжди важливо перевіряти партії реактивів від різних постачальників, оскільки вони можуть відрізнятися за концентрацією чи не працювати надійно.

Всі протоколи для мічення проб починаються з визначення якості ДНК, яка тестується і перевіряється. Найбільш частими і надійними є такі методи як нік-трансляція, олігомічення та мічення за допомогою ПЛР. Нік-трансляція є надзвичайно зручною і ефективною для тотальної геномної ДНК чи великих клонованих послідовностей. Олігомічення використовується для малих кількостей коротких (менше 1 т.п.н.) клонованих фрагментів. Використовуються менше 200 нг як одно- так і дволанцюгової ДНК у якості матриці в реакції. Ампліфікація за допомогою ПЛР в присутності мічених нуклеотидів використовує плазмідну чи геномну ДНК в дуже маленьких кількостях, але в результаті кількість міченої ДНК є великою і якісною.

1.2.3. Білкові маркери. Селективні і репортерні гени.

Крім ДНК маркерів - послідовностей, які організми вже спочатку мають в своєму геномі, в наукових дослідженнях широко використовуються трансгени. Ці трансгени можуть бути вбудовані в геном організму і реплікуватися разом з ним, або (для експресії у невеликій частині багатоклітинного організму) може бути введені місцевою ін'єкцією у складі

вірусного вектора. На сьогодні модифіковані десятки тисяч генів багатьох видів бактерій, дріжджів, грибів, рослин, комах і деяких видів ссавців використовують як маркери, тому що їх генні продукти (білки) мають очевидні ефекти на фенотип організму. Розрізняють дві великі категорії серед маркерних систем: селективні маркери і репортерні маркери. Селективні маркери - це, зазвичай, гени стійкості до антибіотиків, які дозволяють трансформованому організму вижити в присутності антибіотика. Репортерні гени, як правило, призводять до зміни кольору або інших видимих змін в тканинах трансформованого організму. Це дозволяє досліднику швидко проводити скринінг великої групи клітин або організмів, які були трансформовані. Селективні і репортерні маркери мають важливе значення в генній інженерії прокаріот і еукаріот і зазвичай входять до складу плазмідних конструкцій, що використовуються для генетичної трансформації.

Домінантні стабільні маркери є невід'ємною частиною рослинної трансформації. До таких селективних маркерних генів відносяться: гени стійкості до антибіотиків, антиметаболітів, гени стійкості до гербіцидів, гени біосинтезу гормонів і також гени стійкості до токсичних рівней амінокислот або їх аналогів (Miki 2004; Bohnert et al. 2008; Sundar and Sakthivel 2008). Корисність конкретного маркера стійкості залежить від характеристик селективного агента, гена стійкості і рослинного матеріалу. Селективний агент повинен повністю пригнічувати ріст нетрансформованих рослин, однак, вплив, який чиниться загиблими нетрансформованими клітинами на трансформовані має бути мінімальним. Як правило, використовується низька концентрація селективного агента, який пригнічує зростання нетрансформованих організмів. Чутливість рослин до селективного агента залежить від генотипу, типу експлантів, стадії розвитку і умов культивування тканин, і тому концентрації селективних агентів повинні бути визначені відповідно до реальних умов трансформації та процесу регенерації. І, нарешті, рівень резистентності також залежить від промотора і трансляційного сигналу, які контролюють експресію гена резистентності. Таким чином, необхідна

перевірка кількох генних конструкцій (Rosellini 2012; Ziemienowicz 2001; Sundar 2008).

Для трансформації рослин в якості селективного маркера найбільш широко використовується ген неоміцинофосфотрансферази II, або *nptII*. Ензим, який кодує ген *nptII* (або *нео*) з транспозона Tn5 інактивує фосфорилування ряду аміноглікозидних антибіотиків, таких як канаміцин, неоміцин, генетіцин (аналог гентаміцина) і паромоміцин (Stockwell and Duffy 2012). Канаміцин головним чином використовується в концентраціях від 25 до 500 мг/л. Резистентність до канаміцину є дуже корисним маркером для різноманітних видів рослин, проте для деяких бобових і злаків він є неефективним. Пророщування насіння на середовищі з канаміцином або розпилення розчину канаміцина на ґрунти застосовують з метою відбору стійкого потомства.

Фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази, які надають стійкість до гербіциду фосфінотрицину, кодуються геном *bar* від *Streptomyces hygroscopicus* або *pat* геном від *S. viridiochromogenes*, які надають стійкість до гербіциду фосфінотрицину (Yun et al. 2009). Фосфінотрицин (PPT) як аналог глутамату є інгібітором глутамат-синтетази, ферменту, що приймає участь у рослинній асиміляції аміаку. Похідні фосфінотрицину з фітотоксичною активністю, наприклад, біалафос (Herbiace, Meiji Seika, Japan) - трипептид із залишком фосфінотрицину, отриманий від *S. hygroscopicus*, і BASTA (Hoechst, Німеччина) - синтетичний фосфінотрицин (глюфосинат амонію) використовують в сільському господарстві та можуть бути використані для селекції.

Схеми для селекції були розроблені для різних видів рослин і гербіцидів. Наприклад, концентрації для *in vitro* селекції використовують в діапазоні від 0,5 мг/л PPT (для протопластів тютюну) до 20 мг/л PPT (для рису) (Cui et al. 2016).

На відміну від селективних маркерних генів, репортерні гени не надають рослинам стійкість до хімічного агенту. Репортерні гени кодують продукти, які виявляються безпосередньо, або каталізують специфічні реакції, продукти

яких можна легко ідентифікувати та виміряти. Репортерні гени дають можливість аналізувати експресію генів в експериментах з транзійентної або стабільної трансформації. Основною перевагою цього виду маркерів є легкість аналізу. Ідеальний репортер мусить виявлятися з високою чутливістю при ефективному аналізі і низькому ендogenous фоні. Аналіз має бути не руйнівним для поточного моніторингу в реальному часі і мати мінімальну кількість зусиль і витрат. Проте, поки що жоден окремий ген-репортер не відповідає всім цим вимогам (de Ruijter et al. 2009).

Одним з найбільш використовуваних репортерних генів для аналізу експресії генів рослин є бактеріальний ген *uidA*, який кодує β -глюкуронідазу (GUS) (Mudunkothge and Krizek 2014), що розщеплює різні глюкуроніди. Репортерна система з геном *gus* відповідає кільком критеріям, необхідним для використання в рослинах, а саме: простота кількісного аналізу, висока чутливість, достатня специфічність ферментативної реакції за мінімальної шкоди нормальному клітинному метаболізму, можливість локалізації за допомогою гістохімічної реакції і активність ферменту при трансляційному поєднанні з іншими протеїнами. Субстрати для GUS - забарвлення доступні для спектрометричних, флуориметричних і гістохімічних аналізів. Найбільш поширеним субстратом для гістохімічного GUS - забарвлення є 5-бром-4-хлор-3-індоліл-глюкуронід (X-Gluc). Продукт реакції в цьому випадку має синій колір.

В репортерних системах на основі зеленого флуоресцентного білка (GFP) використовується біolumінесценція медузи *Aequorea victoria* для виявлення експресії гена та внутрішньоклітинної локалізації білків (Snapp 2009). Білок, масою 26,9 кДа, флуоресціює зеленим кольором (509 нм) при збудженні світлом синього спектру (395 нм - 475 нм) (Chuan Low and Gong, 2006). GFP на відміну від інших є стабільним білком, тому його спектральні властивості відносно стійки в денатуруючих умовах. GFP має потенціал репортерної молекули з кількох причин:

- його детекція, враховуючи достатній рівень експресії, може бути виявлена

при опроміненні з використанням стандартних джерел довжиною хвилі УФ світла;

- виявлення можливе в реальному часі в природних умовах;
- не потребує введення субстрату, на відміну від інших широко використовуваних репортерних генів;
- відносно малий розмір молекули і мономірна природа надають можливість створювати злиті білки.

З часу відкриття, методами генної інженерії були розроблені численні нові варіанти на основі GFP, які значно яскравіші та мають різні кольори (синій, зелений, жовтий, червоний), або можуть змінювати колір з часом та в залежності від умов внутрішньоклітинного середовища (Shaner et al. 2008).

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Система *Arabidopsis thaliana*

2.1.1. Рослинний матеріал.

В якості вихідного матеріалу в експериментах з модельною системою *Arabidopsis thaliana* використовували лінії екотипів Columbia (№1093) і Landsberg *erecta* (№1298), насіння яких отримали з Нотінгемського центру зразків (NASC, Nottingham, UK).

2.1.2. Бактеріальні штами та вектори.

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 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) (Рис. 2.1).

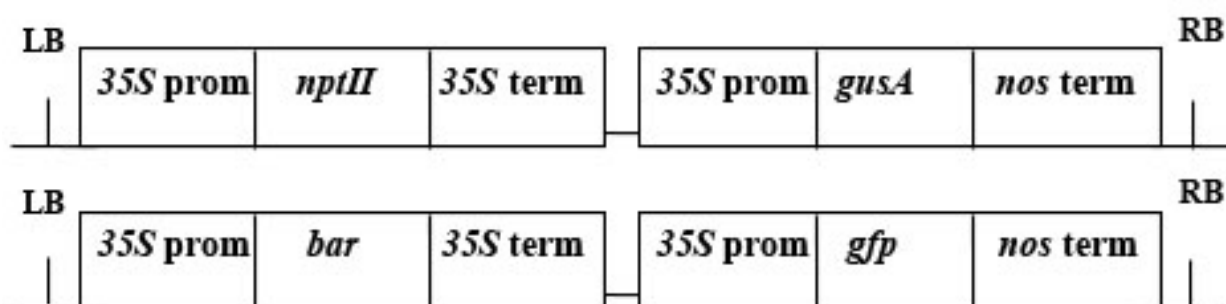


Рис. 2.1. Схема Т-ДНК векторних конструкцій, використаних в експерименті: LB, RB - ліва і права межі Т-ДНК; 35S prom - промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; *nptII* - ген неоміцинфосфотрансферази; *nos* - термінатор нопалінсинтази; *gusA* - ген β -глюкуронідази, *bar* - ген стійкості до фосфінотрицину; *gfp* - ген зеленого флуоресцентного білка.

2.1.3. Генетична трансформація рослин.

Рослини вирощували в умовах закритого ґрунту (рН 5.6 - 5.8) і 16-годинного світлового періоду. Для стимуляції розвитку множинних стрілок і збільшення кількості зав'язування насіння первинні стрілки видаляли. Рослини трансформували згідно методу (Zhang et al. 2006), шляхом занурення квіткових бруньок в суспензію *A. tumefaciens*. Бактерію нарощували протягом 1-2 днів на шейкері при 28 °С в рідкому середовищі LB з додаванням 100 мг/л ампіциліну, 50 мг/л рифампіцину та 25 мг/л гентаміцину. Культуру бактерій центрифугували при 5000 об/с протягом 5 хвилин і ресуспендували в 5% розчині сахарози до досягнення оптичної щільності OD=0,8 при 600 нм. Перед зануренням бруньок в розчин з бактерією додавали ПАР Silwet L-77 в концентрації 0,05%. Після інокуляції рослини накривали поліетиленовими камерами і витримували при підвищеній вологості протягом 48 годин, а потім вирощували в умовах довгого дня до отримання насіння.

2.1.4. Селекція трансформованих рослин.

Насіння стерилізували 2 хв. в 70% EtOH, 15 хв в розчині білизни (1:2), промивали 5-6 разів у стерильній дистильованій воді і висаджували на живильне середовище MS (Murashige and Skoog 1962), що містило 25 мг/л канаміцину (вектор 2301) або 5 мг/л фосфіотрицину (вектор 5290). Зелені стійкі рослини пересаджували в землю для одержання насіння.

2.1.5. Аналіз експресії трансгенів.

Експресію гена *gusA* визначали за допомогою гістохімічної реакції згідно Jefferson (1987). Проростки і окремі частини органів рослин поміщали на 24 год при 37 °С в реакційний буфер, що містив 0,1% 5-бромо-4-хлоро-3-індолил-β-D-глюкопіранозидуронова кислота (X-Gluc). Про наявність експресії свідчила поява синього забарвлення тканин. Детекція експресії гена *gfp* проводилась ультрафіолетовим випромінюванням (395 нм) за допомогою мікроскопа Zeiss Axiostar Plus, фільтр Filter Set 44 (Carl Zeiss). Щоб упевнитися

в стабільній експресії трансгенів у поколіннях і отримати рослини, гомозиготні по вставках, було проведено 3 цикли самозапилення і пророщування насіння на селективних середовищах.

2.1.6. Схрещування трансформованих ліній та отримання гібридів.

Рослини вирощували в умовах закритого ґрунту (рН 5,6 – 5,8) і 16-годинного світлового періоду, кожна ізольована рослина в окремому горщику. Для стимуляції розвитку множинних стрілок і збільшення кількості зав'язування насіння первинні стрілки видаляли. Кастрацію та примусову реципрокну гібридизацію проводили за допомогою біноккулярного мікроскопу. Отримане насіння збирали з кожної рослини окремо в паперовий конверт.

2.1.7. Введення *Arabidopsis thaliana* в культуру *in vitro* та підбір умов для ефективної регенерації рослин.

З метою отримання високої частоти калюсогенеза і регенерації рослин було перевірено дві системи:

- 1 - отримання регенерантів рослин з корневих експлантів за методикою Chen Yihua et. al. (2000);
- 2 - отримання регенерантів рослин з апікальних меристем пагонів *A. thaliana* в умовах осмотичного стресу за методикою, описаною в статті Miho Ikeda-Iwai et al. (2003).

Для експерименту використовували лінії *A. thaliana* екотипів Columbia і Landsberg *erecta*. Насіння стерилізували 2 хвилини в 70% EtOH, потім 10 хвилин у розчині «Білизни» (1:2) і промивали 5-6 разів у стерильній дистильованій воді. Потім стерильне насіння висаджували на агаризоване середовище MS (Murashige and Skoog 1962) і пророщували в умовах 16-годинного світлового періоду при температурі 24 °C. Далі різні експланти 6-12-денних рослин висаджували на гормональні середовища залежно від системи.

I система:

Кореневі експланти 12-денних рослин розрізали на частини близько 1 см і висаджували на середовище С-1 для індукції калюсогенеза (Chen Yihua et. al. 2000). Через 7 днів експланти пересаджували на середовище М-2 (Chen Yihua et. al., 2000) для регенерації пагонів. Після цього на 7й-10й день регенеранти переносили на агаризоване середовище MS без фітогормонів до повного росту в зрілі рослини. Склад середовищ представлений в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Склад середовищ за схемою Chen Yihua (Chen 2000) на основі MS

Макроелементи	середовище С-1 [мг/л]	середовище М-2 [мг/л]
за методикою Мурасиге и Скуга (Murashige and Skoog, 1962)		
Мікроелементи	С-1 [мг/л]	М-2 [мг/л]
за методикою Мурасиге и Скуга (Murashige and Skoog, 1962)		
Вітаміни	С-1 [мг/л]	М-2 [мг/л]
Тіамін	10	10
Піридоксин	1	1
Нікотинова кислота	1	1
Інші складові	С-1 [мг/л]	М-2 [мг/л]
Міо-інозитол	100	100
NaFe-EDTA	36,7	36,7
Гліцин	2	2
Біотин	0,01	-
Сахароза	20	20

Продовження таблиці 2.1

Гормони	С-1 [мг/л]	М-2 [мг/л]
2,4-Д	0,150	-
ІОК	0,5	-
2-іп	0,3	4
НОК	-	0,2
БАП	0,6	-

2 система:

З 6-денних рослин *A. thaliana* вирізали апікальні меристеми пагонів (близько 1 см в довжину) і висаджували на агаризоване безгормональне середовище В5 (Gamborg et al. 1968), що містило 0,3 М NaCl. Експланти культивували в умовах осмотичного стресу протягом 4 годин, після промивали рідким В5 без стресових агентів, переносили на агаризоване середовище В5-1, що містило 1мг/л 2,4-Д (табл.2.2). Через 20 днів культивування експланти, що утворили соматичні ембріоїди, переносили на агаризоване середовище В5 без фітогормонів до повного росту в зрілі рослини.

Таблиця 2.2

Склад середовища В5-1 за схемою Miho Ikeda-Iwai et al. (2003)

Макроелементи	[мг/л]
За методикою Гамборга (Gamborg, et al., 1968)	
Мікроелементи	[мг/л]
За методикою Гамборга (Gamborg, et al., 1968)	

Продовження таблиці 2.2

Вітаміни	[мг/л]
Тіамін	10
Піридоксин	1
Нікотинова кислота	1
Інші складові	[мг/л]
Міо-інозитол	100
NaFe-EDTA	36,7
Гліцин	2
Сахароза	20
Гормони	[мг/л]
2,4-Д	1

Частоту утворення калюсу для обох екотипів визначали як співвідношення кількості експлантів, які продукують калюс, до загальної кількості висаджених експлантів. Частоту регенерації рослин визначали як співвідношення кількості отриманих регенерантів до загальної кількості висаджених експлантів *A. thaliana* (Загричук и др. 2013). Ефективність системи визначали за частотою регенерації рослин та часом отримання зрілих рослин.

2.1.8. Визначення концентрації пара-фтор-L-фенілаланіну (ПФФА), оптимальної для регенерації і калюсоутворення.

Оптимальну концентрацію ПФФА для регенерації визначали для

подальшого експерименту з культивування гібридів *A. thaliana*. Ґрунтуючись на даних по культивуванню тканин полуниці (Niizeki and Fukui 1983) перевірили діапазон концентрацій від 1 мг/л до 50 мг/л. Стерилізоване насіння висівали на агаризоване середовище MS і пророщували в умовах 16-годинного світлового періоду в стерильних умовах при температурі 24°C. Експланти вводили в культуру за протоколом Chen Yihua et. al. (2000) з власними модифікаціями. Кореневі експланти двотижневих рослин розрізали і висаджували на середовище С-1 для індукції калюсогенеза з додаванням ПФФА в різних концентраціях: 1мг/л, 5 мг/л, 10 мг/л, 15 мг/л, 17 мг/л, 18 мг/л, 19 мг/л, 20 мг/л, 25 мг/л, 50 мг/л. Через 7 днів експланти пересаджували на середовище М-2 з тими ж концентраціями ПФФА для отримання регенерантів. Оптимальну концентрацію ПФФА визначали як ту, яка найбільш впливає на частоту калюсоутворення, але все ще не перешкоджає суттєво регенерації рослин. Сформовані пагони пересаджували на середовище MS для вкорінення з додаванням 1мг/л ІМК (індоліл-3-масляна-кислота) без ПФФА. Експеримент проводився в трьох повторностях.

2.1.9. Культивування *in vitro* та отримання регенерантів.

Отримане гібридне насіння стерилізували і висівали на агаризоване середовище MS з додаванням канаміцину 25 мг/л і фосфінотрицину (PPT) 7,5 мг/л, щоб уникнути попадання негібридного насіння. Пророщували в умовах 16-годинного світлового періоду в стерильних умовах при температурі 24°C. Відібрані гібриди вводились в культуру за протоколом Chen Yihua et. al. (2000) з власними модифікаціями. Кореневі експланти двотижневих рослин розрізали і висаджували на середовище С-1 для ініціації утворення калюсу з додаванням ПФФА в концентрації 18 мг/л. Через 7 днів експланти пересаджували на середовище М-2 з ПФФА 18 мг/л для отримання регенерантів. Сформовані пагони пересаджували на середовище для вкорінення з додаванням 1мг/л ІМК (індоліл-масляної кислоти) без ПФФА. Підрощені рослини збирали для виділення ДНК.

2.1.10. Приготування препаратів хромосом.

Жовтуватий калюс, сформований на експлантах, фіксували на 7-й день культивування на середовищі С-1 в оцтовому алкоголі 3:1. Фіксований матеріал мацерували розчином 2% Cellulase Onozuka R-10 (Duchefa) і забарвлювали DAPI (4',6-діамідино-2-феніліндол). Для мікроскопічного аналізу готували тимчасові давлені препарати меристеми коренів та калюсних клітин за загальновизнаними методиками (Пухальский В.А. и др. 2007). Давлені препарати переглядали під флуоресцентним мікроскопом Carl Zeiss Axio Scope A.1 з фільтром для DAPI. Для отримання ілюстративного матеріалу препарати фотографували. В клітинах калюсу та меристеми коренів визначали мітотичний індекс (МІ) та частоту мейозоподібних поділів (ЧМПП). Достовірність відмінностей між дослідними варіантами і контролем для мітотичного індексу (МІ) визначали за методом χ^2 , а для частоти мейозоподібних поділів (ЧМПП) за точним критерієм Фішера (McDonald 2014).

2.1.11. Підбір SSLP ДНК-маркерів.

Підбір ДНК-маркерів проводили за допомогою пошукового ресурсу веб-сайту TAIR таким чином, щоб на кожному плечі з 1-ї по 4-у хромосому знаходилося по одному маркеру і на обох плечах 5-ї хромосоми - по два маркера. Всього було підбрано 12 маркерів SSLP. Різниця довжин фрагментів різних локусів становить від 15 п.н. і більше, що дозволяє легко відрізняти ці фрагменти в 4%-му агарозному гелі. Для одного з мікросателітів (5-й маркер, 3-тя хромосома) не ампліфікується фрагмент, характерний для екотипу Columbia, що може бути пов'язано з делецією в хромосомі даного екотипу. В нашій роботі даний маркер використовували як нуль-алель.

2.1.12. Виділення ДНК та умови ПЛР.

Тотальну ДНК для проведення реакції ПЛР виділяли з рослинних тканин

методом СТАВ (Sambrook et al. 2012). Якість і концентрацію ДНК визначали на спектрофотометрі SPECTRA max PLUS384. Суміш ПЛР на одну реакцію (15 мкл) містила: 1,5 мкл 10х 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. Орієнтовну температуру гібридизації праймерів визначали за формулою:

$$T_m (^{\circ} \text{C}) = 4 (G + C) + 2 (A + T) - 5,$$

де G, C, A і T - кількість відповідних нуклеотидів в послідовності праймера.

Термоцикл реакції стартував з початковою денатурацією протягом 4 хв при 94°C, потім слідували 35 циклів ампліфікації (30 с - 94 °C, 30 с - 45 °C, 30 с - 60 °C, 2 хв - 72 °C), фінальна інкубація становила 5 хв при 72 °C. Електрофорез проводили за стандартною процедурою в 4% агарозному гелі (Sambrook et al. 2012).

2.2. Система *Secale cereale*

2.2.1. Рослинний матеріал.

Матеріал для аналізу складався із п'яти сортів жита *Secale cereale*: Petkus і Imperial (John Innes Centre, Norwich, UK), Selgo (IEB, Czech Republic), Онохойская, Життедайне (колекція ІМБГ, Київ). Онохойская – сибірський різновид, являє собою фенотипово стабільний сорт, що відрізняється від Petkus та Imperial в основному морфологічними характеристиками, такими як форма росту, структура колосу, розмір і форма зерна.

2.2.2. Збір та фіксація матеріалу.

Пророщування насіння жита проводили в чашках Петрі на зволоженому фільтрувальному папері при 25°C в термостаті протягом 27-40 годин з обробкою ДМСО (диметилсульфоксид) та ізатізоном. З пророщеного

насіння скальпелем відрізалися кінчики корінців довжиною 1 см, які поміщали в епандорфи з льодяною водою та ставили в холодильник на 16-22 години. Фіксацію корінців проводили у розчині етанол:оцтова кислота у співвідношенні 3:1 протягом 4-7 днів при кімнатній температурі. Для довготривалого зберігання заморожували при -20°C . Для швидкого використання, витримували 2 години в 1% розчині ацетокарміну та готували давлені препарати.

2.2.3. Приготування давлених препаратів.

Відділяли чохлик, частину меристеми занурювали в краплю 45% оцтової кислоти і давили методом двох покривних скельць до зникнення слідів тканини. Знімали друге покривне скельце, злегка підігрівали, потім охолоджували та давили на препарат. Знімали покривне скельце та швидко занурювали в розчин 45% оцтової кислоти на кілька хвилин при кімнатній температурі. Зібрані препарати ще раз переносились в 45% оцтову кислоту на 3 хвилини при $43-45^{\circ}\text{C}$ (для подальшого проведення C-banding/FISH; для FISH температуру піднімають до 60°C). Висушували препарат на повітрі (Schwarzacher and Heslop-Harrison 2000). Каріотип визначали на основі не менше 20 метафазних пластинок, отриманих з 7-10 зернин кожного генотипу.

2.2.4. Проби та їх мічення.

В якості проб використовували високоповторювані послідовності pSc200, pSc250 та pSc119.2, клоновані з *S.cereale*, мікросателітний повтор GAA і повтори ДНК 45S рДНК (pTa71) та 5S рДНК (pTa794) (Vershinin et al. 1995). Для проведення гібридизації *in situ* проби мітили digoxigenin-11-dUTP (Roche Molecular Biochemicals) та biotin-16-dUTP (Roche Molecular Biochemicals) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з використанням M13 праймерів.

Якщо використовували в якості матриці для ПЛР геномну ДНК *S.cereale* брали пари праймерів до різних районів послідовностей pSc200 і pSc250 :

від pSc200:

primer 1, 5'-GCACCAAGGACCTGAAC-3';

primer 2, 5'-CCACCCATGTATGGATAC-3';

primer 3, 5'-CTGTGTGTGCACGTATG-3';

primer 4, 5'-CACGTGCGTGGAATAATTC-3';

від pSc250:

primer 1, 5'-GTTCGAAAATAATGGGCC-3';

primer 2, 5'-GTAGAAGAGATGGTATGC-3';

primer 3, 5'-CTTCTAGCGTCTACCACCC-3';

primer 4, 5'-CCAACCACTAAATCATTCG-3'.

ПЛР проводили на тотальній геномній ДНК при наступних умовах: 5 хв при 94⁰С; 35 циклів по 30с при 94⁰С, 30с при 56⁰С та 2 хв при 72⁰С, а далі 10 хв при 72⁰С.

2.2.5. Флуоресцентна гібридизація *in situ*.

Метод приготування препаратів хромосом та проведення гібридизації *in situ* був адаптований з протоколів, розроблених Schwarzacher та Heslop-Harrison (2000). 20 мкл розчину для гібридизації містить 50% формаміду, 10% сульфату декстрану в 2×SSC, 250 мг/мл ДНК тимусу теляти та 1-2 мг/мл міченої проби; використовується для кожного предметного скельця. Препарати денатурували протягом 2 хвилин при 80⁰С на нагрівальному

столику. Гібридизація проводилась протягом ночі при 37°C. Після того, як зняли покривні скельця, препарати промивали в 50% розчині формаміду в $1 \times \text{SSC}$ при 42°C протягом 10 хвилин, і три рази – в $2 \times \text{SSC}$ при 20°C. Сайти гібридизації дігуксігенін-міченою пробою детектували, використовуючи антидігуксігенін-FITC, сигнал збільшується з використанням anti-sheep-FITC. Сайти гібридизації мічених дігуксігеніном та біотином ДНК-зондів виявляли з використанням анти-дігуксігенінового флуоресцеїну («Roche») і стрептавідіну, сполученого із Cy3 (Sigma, США) відповідно. На завершення, препарати контрастно забарвлювали DAPI (0.2 мг/мл) та покривали розчином, що перешкоджає знебарвленню флуорохрома (antifade solution, Vectashield «Vector Laboratories», США) (Schwarzacher and Heslop-Harrison, 2000).

Препарати досліджували за допомогою мікроскопу Olympus BX60, обладнаного наборами оптичних фільтрів, що підходять для DAPI, флуоресцеїну-FITC та Cy3 флуоресценції. Зображення DAPI, флуоресцеїну та Cy3 флуоресценції отримували окремо за допомогою чорно-білої CCD-камери, яка з'єднана з ПК за допомогою інтерфейсу, із запущеною на ньому програмою Metasystems ISIS v.5.2.8 software («Metasystems», «Altussheim», Німеччина). Зображення накладали одне на інше після оптимізації контрасту та фону.

2.2.6. Проточна цитометрія і сортинг хромосом.

Синхронізацію клітинного циклу та акумулювання метафаз в кінчиках корінців проводили за методом (Dolezel et al. 2007). Пророщене насіння жита з корінцями довжиною 30 мм відбирали і переносили в гідроксисечовину на 18,5 годин, потім промивали декілька разів деіонізованою водою і інкубували в живильному розчині Hoagland's впродовж 6,5 годин для відновлення поділів (табл. 2.3). Після чого в розчині переносили проростки в крижану воду для накопичування метафаз і залишали в холодильній камері на ніч. Наступного дня корінці фіксували в 2% розчині формальдегіду, зробленому на буфері Tris

(10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7.5), і інкубували при 5°C протягом 30 хвилин. Суспензію хромосом із синхронізованих корневих меристем готували за методикою Vrana et al. (Vrana et al. 2000; Vrána et al. 2016). Промивали корінці в буфері Tris три рази по 5 хвилин при 5°C. Відрізали кореневі меристеми (1-2 мм) і переносили в пробірки, що містили 1 мл лізуючого буферу LB наступного складу: 15 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 130 mM KCl, 20 mM NaCl, 1 mM сперміну, 1 mM спермідину, 45 mM β -меркаптоетанолу, 0.1% Тритона X-100, pH 9,4. Суспензія хромосом готувалась механічним гомогенізатором Polytron PT1200 на 15000 обертів (rpm) 13с. Розчин, що утворився, фільтрували через нейлонову сітку (4x4см) з порами розміром 50 мкм для того, щоб вилучити великі тканинні і клітинні фрагменти. Зберігали суспензію інтактних хромосом протягом кількох годин на льоду (чим довше, тим краща якість хромосомної ДНК і роздільна здатність проточного каріотипу). Аналіз суспензії хромосом методом проточної цитометрії і ідентифікація відсортованих хромосом проводилась згідно протоколу (Kubalakova et al. 2003).

Таблиця 2.3

Синхронізація клітинного циклу і акумуляція метафаз для *S. cereale*

Реагент	Концентрація	Тривалість обробки (години)	Час відновлення (години)
гідроксисечовина	2,5 mM	18,5	6,5
формальдегід	2%	0,5	-
льодяна вода	-	15,5	-

Хромосомний аналіз проводився за допомогою проточної цитометрії з використанням FACSVantage SE проточного цитометра (BD Biosciences

Immunocytometry Systems, Сан-Хосе, США), який обладнаний ультрафіолетовим лазером. Суспензію хромосом забарвлювали DAPI в остаточній концентрації 2 мкг/мл і аналізували на приборі зі швидкістю 200-300 частинок за секунду. Сортувальні шлюзи встановлюються в точці фіксації в області пульсу флуоресценції проти ширини пульсу флуоресценції, щоб вибрати непошкоджені хромосоми у фазі мітозу. Хромосоми сортували зі швидкістю в межах 100 - 200 частинок за секунду в рівному об'ємі крижаного буферу 1.5xLB, щоб досягти кінцевої концентрації 0.75 x LB. Сортування близько 1.8×10^6 хромосом проходить протягом 25 хвилин при 4°C.

Чистоту відсортованої фракції регулярно перевіряли за допомогою флуоресцентної гібридизації *in situ* з хромосомами, відібраними на мікроскопічне скло.

2.3. Статистична обробка результатів

Мітотичний індекс як показник мітотичної активності тканин визначали у відсотках за формулою 1:

$$1) MI = \frac{N_p}{N} \cdot 100 \% ,$$

де N_p - кількість клітин на стадії поділу, N - загальна кількість клітин.

Частоту мейозоподібних поділів (ЧМПП) визначали у відсотках за відношенням мейозоподібних поділів до нормальних: $ЧМПП = n_m \cdot 100 \% / n$, де n_m - кількість мейозоподібних поділів, n - загальна кількість проаналізованих клітин з поділами.

Результати експериментальних даних обробляли за загальноприйнятими статистичними методиками (Ивантер и Коросов, 2010; McCleery et al. 2007).

Похибку частки S_p (у відсотках) для ЧМПП та МІ визначали за формулою 2:

$$2) \quad s_p = \sqrt{\frac{p(100 - p)}{n}},$$

де p = ЧМПП, або МІ.

n – кількість клітин з поділами.

Достовірність відмінностей між дослідними варіантами і контролем для мітотичного індексу (МІ) здійснювали за методом χ^2 , а для частоти мейозоподібних поділів (ЧМПП) за точним критерієм Фішера (Ивантер и Коросов 2010; Атраментова і Утєвська 2007). Розбіжності між вибірками вважали статистично достовірними, починаючи від рівня вірогідності, меншого 0,05. Для обробки отриманих результатів було створено базу даних в програмі Excel.

Частоту утворення калюсу для обох екотипів *A.thaliana* визначали у відсотках за співвідношенням кількості експлантів, які продукують калюс, до загальної кількості висаджених експлантів. Частоту регенерації з калюсу обох екотипів та різних систем культивування розраховували зі співвідношення кількості отриманих регенерантів до кількості висаджених експлантів, помножене на 100%. Похибку частки S_p (у відсотках) визначали за формулою 2. Достовірність відмінностей між дослідними варіантами розраховували за методом χ^2 і вважали статистично значимою, починаючи від рівня вірогідності, меншого 0,05 (McDonald 2014).

Графік залежності частоти калюсоутворення від концентрацій ПФФА будували за допомогою пакету програм Excel та PAST3, використовуючи поліноміальний регресійний аналіз (McDonald 2014; McCleery et al. 2007). Надійність регресійної моделі визначали за коефіцієнтом кореляції R та критерієм Фішера (McDonald 2014), достовірність отриманих результатів вважали статистично значимими за $P \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Модельні системи для дослідження механізмів сегрегації хромосом

Майже кожен автор, який спостерігає випадки соматичної редукції в своїх дослідженнях, обговорює потенційне застосування явища в прикладній генетиці та селекції. Існує нагальна потреба створення гомозиготних ліній для виробництва гібридних сортів. Для отримання високоврожайних сортів різних культур гібридний потенціал має важливе значення. Проте, гетерозиготний генотип неможливо стабільно розмножувати через насіння, тому що батьківські хромосоми рекомбінують перш, ніж передаються потомству. Рекомбінація алелів знаходиться під впливом двох взаємопов'язаних подій під час мейозу I: кросинговеру і орієнтації гомологічних хромосом на мета фазній пластині. Кросинговер призводить до нових комбінацій алелів шляхом взаємного обміну сегментів хромосом, тоді як випадкова орієнтація під час метафази I генерує нові комбінації батьківських хромосом. Якби не було кросинговеру, єдиним фактором диверсифікації генетичної інформації була б орієнтація хромосом, і, отже, інтактні (нерекомбіновані) батьківські хромосоми надходили б до гамет.

Оскільки гібриди не можна стабільно відтворювати, селекціонери відтворюють елітний гібрид заново через схрещування гомозиготних батьківських ліній. Такі лінії одночасно забезпечують засоби для поліпшення продуктивності гібридної форми шляхом поліпшення своїх батьків. Неможливість селекціонерів легко відновити селекційні батьківські лінії з неохарактеризованих гетерозиготних форм є основною перешкодою для відокремлення елітних гетерозиготних форм від розщепленої популяції в свої гібридні селекційні програми. Мікроклональне розмноження (або апоміксис) дозволяє збереження батьківського генотипу, але запобігає його подальше поліпшення батьківських ліній.

Нещодавно запропонована концепція зворотної селекції (Dirks et al.

2003) матиме значний вплив на комбінаторну гетерозисну селекцію в майбутньому. Основна ідея цієї концепції полягає в отриманні двох ліній зі взаємодоповнюючих геномів з початкового гетерозиготного генотипу. Діркс (Dirks et al. 2009) запропонував супресію рекомбінації у гетерозиготних організмів, щоб отримати дигаплоїдні генотипи з nereкомбінантними батьківськими хромосомами за допомогою методу мікро/макро спор шляхом регенерації. Добре відомо, що в результаті супресії кросоверу формуються анеуплоїдні гамети, що сильно зменшує кількість гамет з збалансованим набором хромосом (Dirks et al. 2009). Таким чином, реалізація концепції зворотної селекції найближчим часом представляється можливою. тільки для видів з низьким числом хромосом. Застосування явища сегрегації гомологічних хромосом в соматичних клітинах може бути альтернативним підходом до зворотної селекції.

Використання явища соматичної редукції потребує ретельного вивчення феномену як такого, так і можливості контролювати цей процес для застосування у прикладній генетиці. Попередні дослідження не дають чіткої картини щодо індукції і з'ясування механізмів соматичної редукції хромосом. Тому з розвитком технологічного потенціалу з'являється можливість наблизитись до розв'язання питань, пов'язаних з феноменом, а також отримання більшої інформації щодо сегрегації та рекомбінації гомологічних хромосом загалом.

Беручи до уваги всі вище викладені міркування щодо явища соматичної редукції хромосом, ми розглядаємо можливі підходи для створення модельної системи для систематичних досліджень, які в першу чергу мають уточнити прикладні аспекти обговорюваних процесів. Наступні завдання були визначені пріоритетними: дослідження явищ не тільки на цитологічному рівні, але визначення подальшої долі клітин, в яких відбувається соматична сегрегація; розробки швидких методів скринінгу для визначення об'єктів дослідження та умов культивування, що здатні стабільно відтворювати результати; візуалізація поведінки гомологічних хромосом і в кінцевому рахунку ідентифікації

генетичних детермінант. На наш погляд, *A. thaliana* та *S. cereale* є найбільш відповідними об'єктами досліджень для цих цілей. З одного боку *A. thaliana* - це невеликого розміру квіткова рослина вже давно стала одним з популярних модельних організмів в біології рослин завдяки короткому життєвому циклу і зручності в культивуванні *in vitro*. *A. thaliana* належить до родини капустяних, яка включає культурні види такі як гірчиця, капуста, редька. *A. thaliana* немає великого агрономічного значення, проте має важливі переваги для фундаментальних досліджень в галузі генетики і молекулярної біології:

- малий геном, секвенований в 2000 році (157 млн. пар нуклеотидів, 125 Mbp);
- детальні генетичні та фізичні карти усіх 5 хромосом;
- короткий життєвий цикл (близько 6 тижнів від сходів до зрілого насіння);
- високий врожай насіння і легкість вирощування в умовах обмеженого простору;
- самозапилення рослин дозволяє вирощувати гомозиготні лінії
- ефективні методи трансформації за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*;
- велика кількість мутантних ліній і геномні ресурси, багато з яких доступні зі стокових центрів;
- проведення досліджень в багатонаціональних наукових співтовариствах академічних, державних і галузевих лабораторій.

З другого боку, *Secale cereale* L. - однорічна трав'яниста рослина родини злакових, близько пов'язана з ячменем та пшеницею, що широко вирощується людиною для отримання зерна та як кормова культура. Жито серед зернових має найбільший розмір геному ($1Cx = 7,917 \text{ Mbp}$) для його диплоїдного числа хромосом ($2n = 2x = 14$) (Bennett and Leitch 2011; Bartoš et al. 2008), який в 64 рази перевищує розмір компактного геному *A. thaliana*. *S. cereale* є відмінною цитологічною моделлю для дослідження поведінки гомологічних хромосом під час поділу і рекомбінації. Збільшення ядерного геному жита, в основному,

пов'язано з поширенням повторюваних послідовностей ДНК в ході видоутворення (Alkhimova et al. 1999; Evtushenko et al. 2016). Є класи повторюваних послідовностей ДНК, які еволюціонують так швидко, що стають специфічними для виду або групи видів. У жита повтори ДНК та ретроелементи складають до 95% генома (Flavell et al. 1977; Bennetzen et al. 2005; Vershinin 2006). Жито-специфічні послідовності мають важливе значення у формуванні структури геному і еволюції виду.

Крім того дані модельні об'єкти мають добре розвинену технологію *in vitro* культури, і їхні геноми докладно охарактеризовані.

Одним з наших підходів є створення модельних гібридів *A. thaliana* між екотипами Columbia і Landsberg *erecta* з трансгенними геномами, позначеними різними репортерними і селективними генами. Використовуючи цю модельну систему, рослини-регенеранти, отримані з окремих клітин за допомогою методів культури *in vitro*, можуть бути проаналізовані шляхом експресії репортерних генів і кодомінантними ДНК-маркерами для того, щоб знайти гомозиготні форми. Ця система дозволить скринінг умов для ефективної індукції соматичної сегрегації.

Наш другий напрямок досліджень ґрунтується на використанні хромосом жита, які мають великі розміри і хороші цитогенетичні маркери. Створення та використання гібриду *S. cereale* між різними сортами може допомогти розрізнити кожен хромосому за допомогою субтеломерних проб. Різні сорти та екотипи жита (Imperial, Petkus) відрізняються великими гетерохроматиновими блоками в термінальних районах хромосом, а ці блоки збагачені переважно трьома родинками сателітних послідовностей, pSc200, pSc250, pSc119.2. Ідентифікація гомологічних хромосомних груп дозволить відстежити поведінку хромосом під час поділу клітин.

Матеріали, подані у даному розділі, опубліковані у наступних тезах:

1. Sytnyk E., Tabaka P., Zimina O., Vdovychenko Z., Spyrydonov V. and Parii M. (2010, February) Approaches to Reverse Breeding. Proceedings of the International Conference Green Plant Breeding Technologies, Vienna University of Economics, Vienna, p. 58.
2. Зими́на О. В., Сытник Е.С., Парий, М.Ф. (2011, апрель) Создание модельной системы на примере *Arabidopsis thaliana* для изучения явления соматической сегрегации. Тезисы докладов XVIII-й Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых 'ЛОМОНОСОВ', Москва, с. 78-79.
3. Sytnyk K., Zimina O., Vdovychenko Zh., Spyrydonov V, Parii M. (2011, September) Plant model systems for somatic segregation study. Proceedings of the 7th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, Ghent, p. 32.
4. Alkhimova O., Zimina O., Parii M. (2011, September) Creation of model systems for somatic chromosome segregation evidence. Proceedings of the 18th Intern. Chromosome Conf, Manchester, p. 20.

3.2. Система *A. thaliana*

3.2.1. 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, які нам хотілося б простежити - 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 належних до різних геномів.

Для вирішення поставлених завдань модельна система на основі рослин *A. thaliana* має наступні переваги: невеликий розмір, мале число хромосом, короткий онтогенез, велика кількість насіння, наявність відпрацьованих методів культивування клітин *in vitro* та регенерації, а також легкий і швидкий спосіб отримання трансформантів, розроблена технологія ідентифікації генотипів за допомогою ДНК-маркерів. Таким чином, цей модельний об'єкт задовольняє майже всім необхідним критеріям. Єдиним недоліком даної рослини для наших завдань є малий розмір хромосом і неможливість в результаті цього проводити стандартні цитогенетичні дослідження явища соматичної сегрегації.

Для вивчення генетичних наслідків даного явища в культивованих клітинах і у рослин-регенерантів модельних гібридів передбачається простежувати поведінку гомологічних хромосом методом цитогенетичного аналізу та за допомогою системи ДНК-маркерів. Модельний гібрид між екотипами *Columbia* і *Landsberg erecta*, маркованими трансгенами, за допомогою ДНК-маркерів дозволить ідентифікувати генотип культивованих клітин та/або рослин-регенерантів, отриманих з клітин, що утворилися в результаті соматичної сегрегації. Для здійснення поставлених цілей необхідне

виконання наступних етапів роботи (рис. 3.1).



Рис. 3.1. Схема експериментів з вивчення явища соматичної редукції хромосом.

Для отримання гібридів 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 3 цикли самозапилення і пророщування насіння на селективних середовищах (рис. 3.2).

Крім того для подальшої роботи необхідно мати лінії з високим рівнем експресії генів, щоб легко проводити селекцію. Проростки і дорослі рослини отриманих трансформованих ліній відрізнялися за рівнем експресії *gusA* (рис. 3.3).

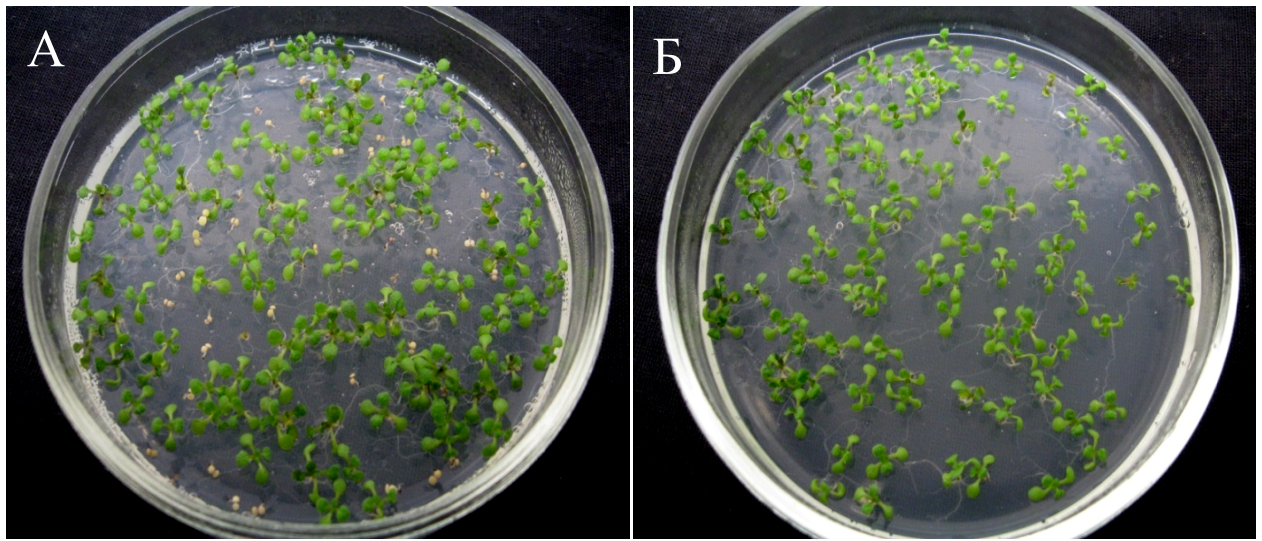


Рис. 3.2. Селекція насіння на середовищі з додаванням канаміцину 25 мг/мл. А – покоління Т-2 (гетерозиготне), Б – покоління Т-3 (гомозиготне).

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. 3.4). Одна з трансформованих рослин виявилась із сильною експресією гена *gfp*.

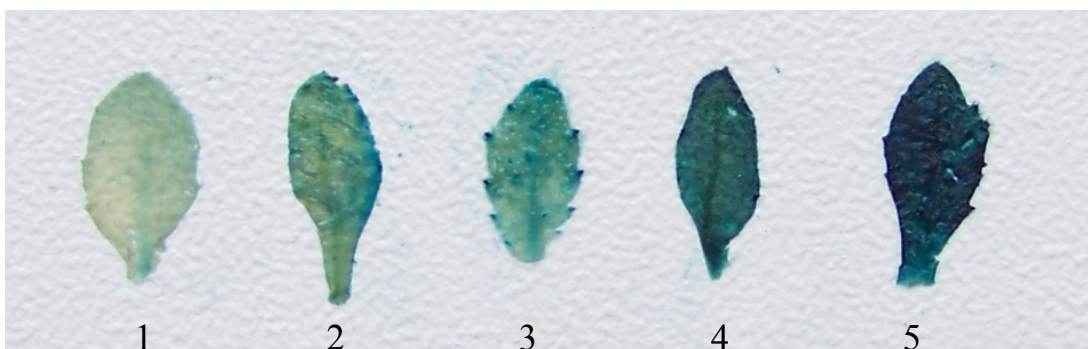


Рис. 3.3. Гістохімічний аналіз експресії гена *gusA*. 1-й лист зліва - дикий тип, 2 - 5-й - трансформанти, інтенсивність забарвлення свідчить про силу експресії гена *gusA*.

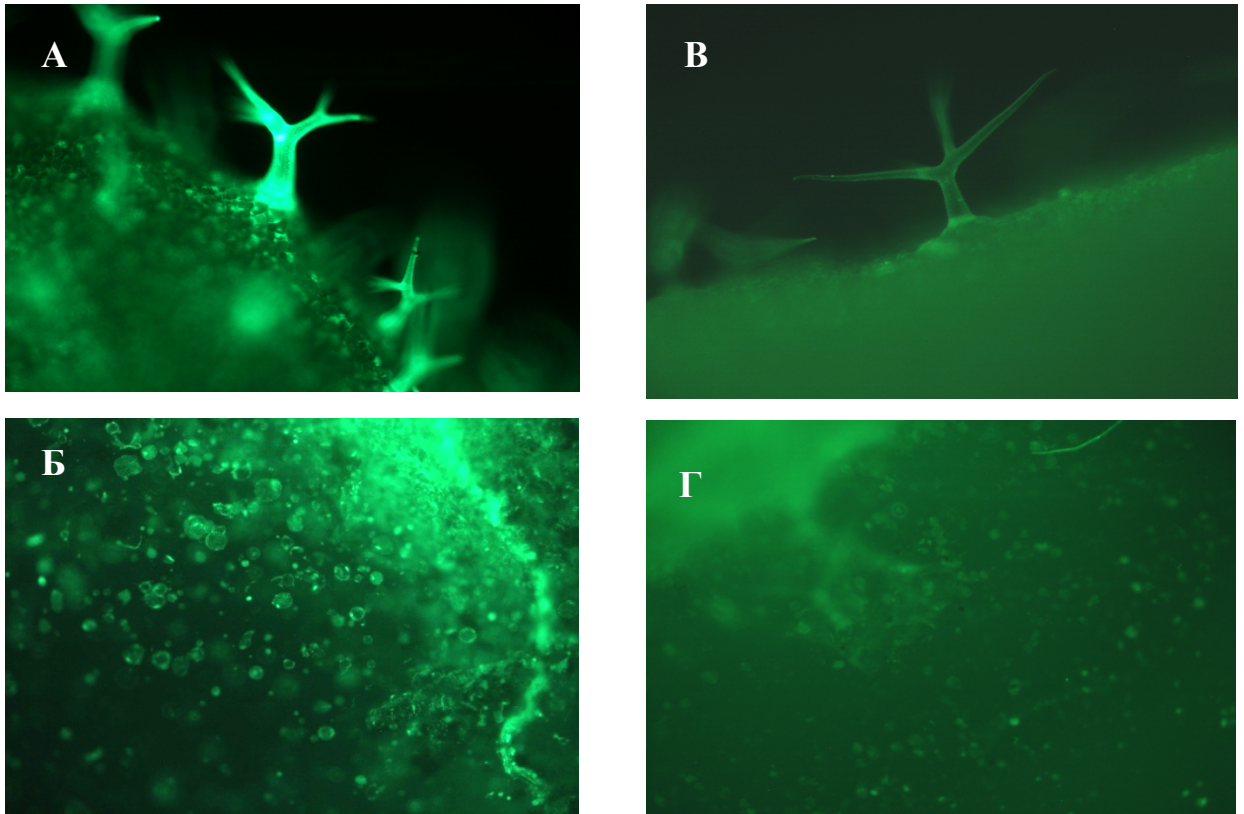


Рис. 3.4. Аналіз експресії гена *gfp* в тканинах листя рослин під мікроскопом Zeiss Axiostar Plus, збільшення 100 ×. Зліва (А, Б) - трансформована рослина, справа (В, Г)- дикий тип.

В результаті примусової гібридизації трансформованих ліній отримано 300-400 насінин, які в подальшому висаджували на селективне середовище з додаванням канаміцину і фосфінотрицину (PPT) для селекції гібридів (рис. 3.11).

3.2.2. 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. На даному етапі метою нашого дослідження було вивчення різних аспектів як спонтанної,

так і індукованої соматичної сегрегації хромосом в рослинах *in vitro*. Для цього ми оптимізували склад живильного середовища для *A. thaliana*, щоб підвищити частоту калюсогенеза і регенерації рослин.

Було апробовано дві методики культивування *in vitro* для отримання рослин-регенерантів: I) Chen Yihua et. al. (2000); II) Miho Ikeda-Iwai et al. (2003) (рис. 3.5). В обох системах першим етапом було отримання дедиференційованих клітин експлантів, які формували калюс, після чого здійснювали індукцію регенерації. Головними чинниками калюсогенезу і регенерації в першій системі були фітогормони, в другій – дія осмотичного стресу, створена шляхом додавання в середовище 0,3 М NaCl. Частота калюсоутворення для обох систем склала 100%. Однак більш високу частоту регенерації до 37, 5% для *L. erecta* і 35% для *Columbia* спостерігали в першій системі культури *in vitro*. Для другої системи частота регенерації рослин склала для цих двох екотипів 15% і 12,5% відповідно (рис. 3.6). Час отримання зрілих рослин різнився в декілька днів (5-7), тому ми не звертали на це уваги. Оскільки в першій системі була вище частота регенерації пагонів, вона була обрана для подальшої роботи. 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. 3.1).

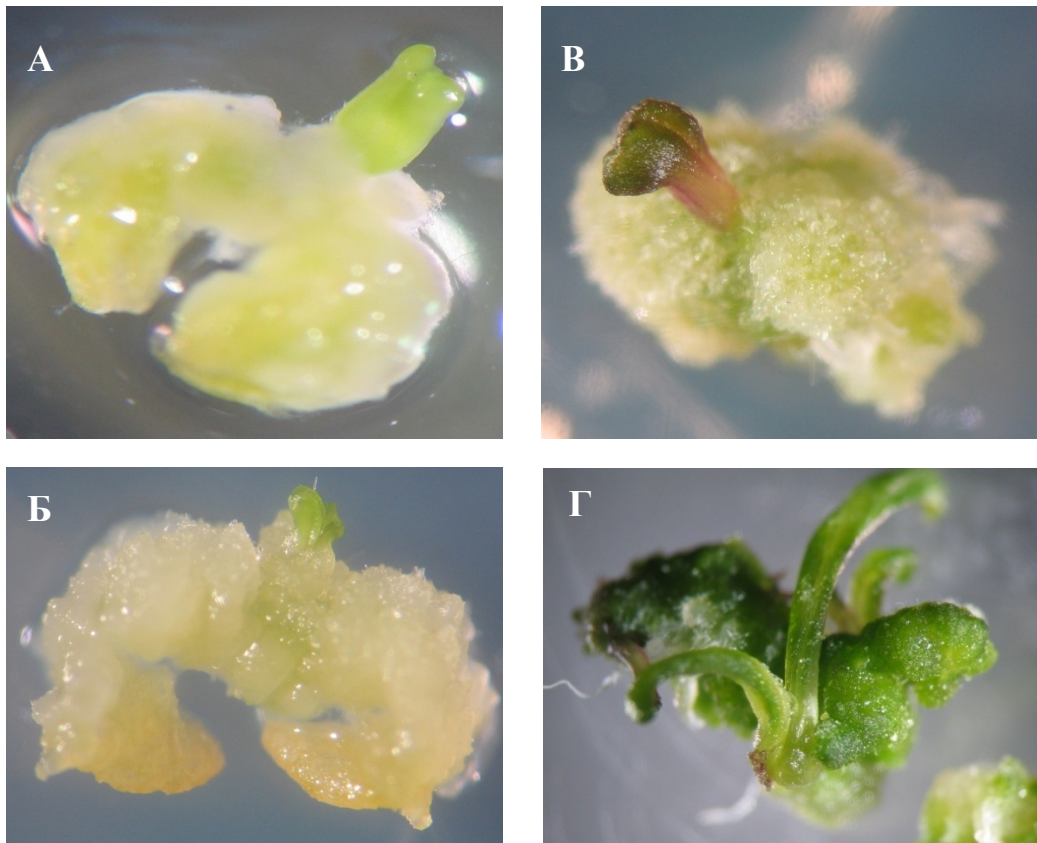


Рис. 3.5. Регенерація рослин *A. thaliana* з калюсної тканини в культурі *in vitro*. А, Б - Калюс з соматичними ембріоїдами формувався на експлантах, які культивували на агарозованому середовищі В5 без фітогормонів з 0,3 М NaCl протягом 4 годин, а потім протягом 20 днів - на твердому середовищі В5, до якого додавали 1мг/л 2, 4-Д без NaCl. Columbia і Landsberg *erecta* відповідно. В, Г - Калюс з регенерантами на експлантах, які культивували 7 днів на агарозованому середовищі С-1 з фітогормонами для ініціації калюсогенезу за системою І, а потім пересаджували на М-2 для ініціації регенерації.

Таблиця 3.1

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

Примітка: *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 $\chi^2=0.433$, $P>0.05$.

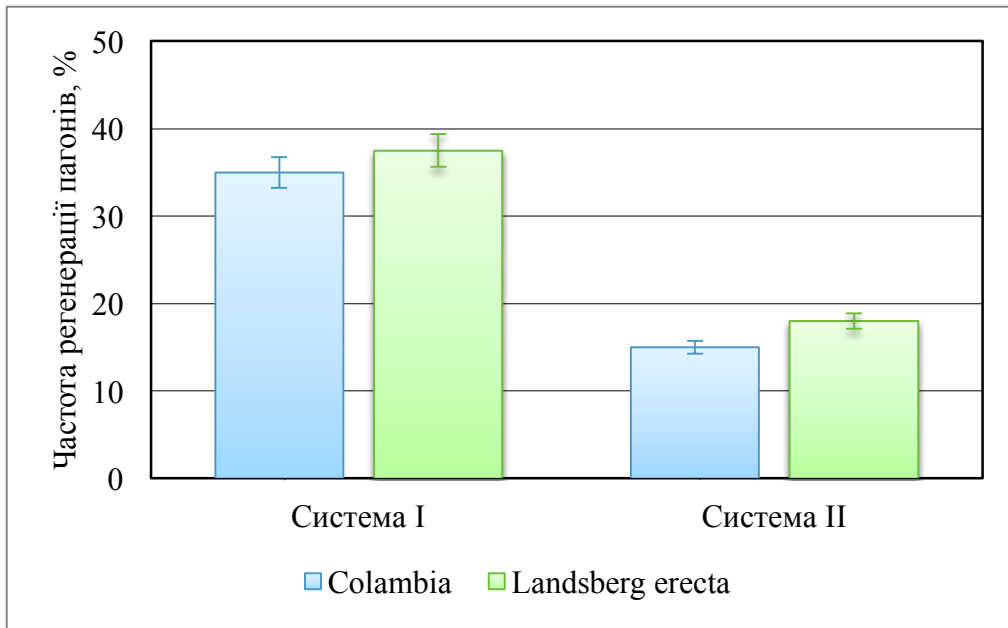


Рис.3.6. Частота регенерації пагонів двох екотипів *A. thaliana*.

Отже, були перевірені дві системи отримання регенерантів *in vitro* і підібрані оптимальні умови ефективного калюсогенеза і регенерації рослин для подальшого вивчення соматичної сегрегації.

3.2.3. Підбір SSLP-маркерів і умови ПЛР.

Для вивчення соматичної сегрегації хромосом важливим було простежити розподіл кожної хромосоми батьківського і материнського геномів гібридів *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 їх локалізацію отримали з даних, опублікованих Bell C.J. і Ecker J.R (1994) і бази даних TAIR (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>). Послідовності праймерів представлені в табл.3.2.

ДНК-маркери і праймери, використані для ПЛР-реакцій

№	Мікро-сателіт	Хромосома	Послідовність 5'→3' Прямий (F), Зворотній (R)	Розмір ПЛР-продукту (п.н.)	
				Col	Ler
1	F16J7-TRB	1	F:-TGATGTTGAGATCTGTGTGCAG- R:-GTGTCTTGATACGCGTCGAT-	165	114
2	NGA280	1	F: -GGCTCCATAAAAAGTGCACC- R:-CTGATCTCACGGACAATAGTGC-	105	85
3	CIW2	2	F: -CCCAAAAGTTAATTATACTGT- R: -CCGGGTTAATAATAAATGT-	105	90
4	NGA168	2	F:-GAGGACATGTATAGGAGCCTC- R:-TCGTCTACTGCACTGCCG-	151	135
5	ATDMC 1.1	3	F:-GCAACTGAATTTGTTTTTCGTTTG- R:-TTGATTAGTGGATCCGCAAACAA-	2200	342
6	CIW4	3	F: -GTTCATTAAACTTGCGTGTGT- R: -TACGGTCAGATTGAGTGATTC-	190	215
7	CIW5	4	F: -GGTTAAAAATTAGGGTTACGA- R: -AGATTTACGTGGAAGCAAT-	164	144
8	CIW6	4	F: -CTCGTAGTGCACTTTCATCA- R: -CACATGGTTAGGGAAACAATA-	155	150

Продовження таблиці 3.2

9	NGA151	5	F:-CAGTCTAAAAGCGAGAGTATGATG R:-GTTTTGGGAAGTTTTGCTGG-	150	120
10	NGA106	5	F:-TGCCCCATTTTGTCTTCTC- R:-GTTATGGAGTTTCTAGGGCACG-	157	123
11	PHYC.3	5	F:-AAACTCGAGAGTTTTGTCTAGATC- R:-TCAGAGAATTCCCAGAAAAATCT-	207	222
12	CIW9	5	F:-CAGACGTATCAAATGACAAATG- R:-GACTACTGCTCAAACATTCGG-	165	145

Для співставлення 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>) і (рис. 3.7).

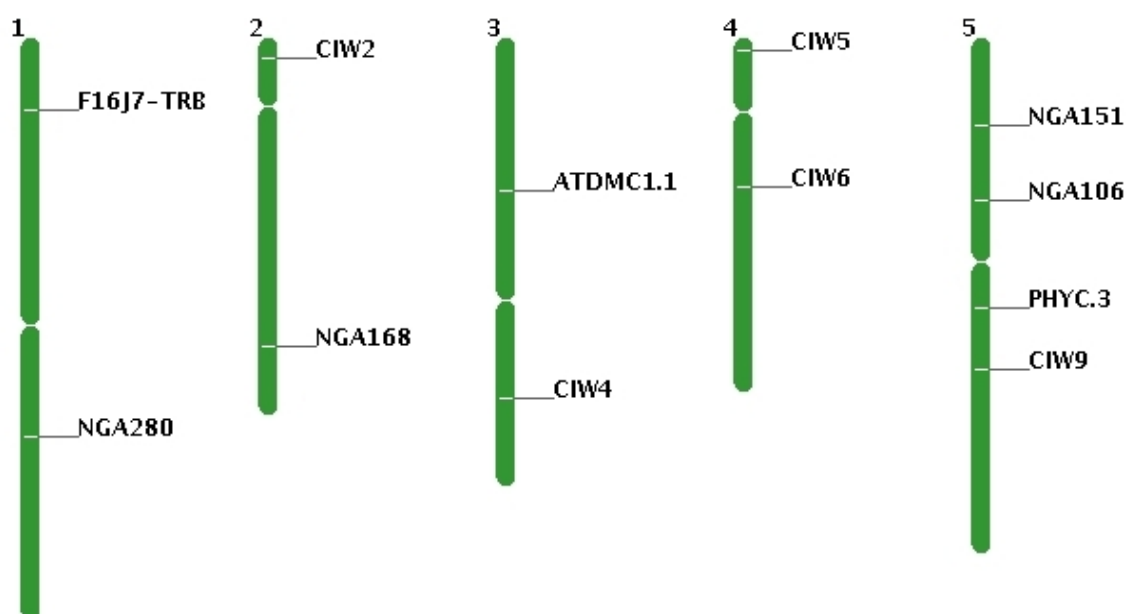


Рис. 3.7. Генетична карта, що показує розташування мікросателітів на хромосомах *A. thaliana*.

Для виявлення феномена соматичної редукції необхідний аналіз значної кількості рослин. Отже, оптимізація процедури аналізу з метою зменшення витрат часу і коштів в даному випадку мала важливе значення. Для вирішення цих завдань було необхідно розробити умови проведення мультиплексної ПЛР, зокрема:

1) підібрати комбінації мікросателітних маркерів різних локусів з неоднаковою довжиною фрагментів, що дозволить чітко відрізняти ці фрагменти при проведенні електрофорезу в агарозному гелі;

2) підібрати температуру гібридизації праймерів, при якій в ході ампліфікації відбувався б синтез максимальної кількості добре помітних фрагментів.

Обрані праймери та їх комбінації суттєво відрізнялися за розрахунковим значенням температури гібридизації від 50 °С до 68 °С. Тому спочатку проводили ПЛР для кожного локусу в окремій пробірці, використовуючи термоцикл з одним із середніх значень температури гібридизації: 50 °С, 55 °С, 60 °С. Однак при такому режимі не всі фрагменти ампліфікувались, утворювалось багато неспецифічних продуктів, картина на електрофореграмі була нечіткою. 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. Оскільки різниця в розмірах фрагментів ДНК складала не менше 15 п.н., електрофорез продуктів ампліфікації в 4%-му агарозному гелі дозволяв чітко їх розрізняти. Результати ампліфікації і розділення фрагментів в гелі наведено на рис. 3.8.

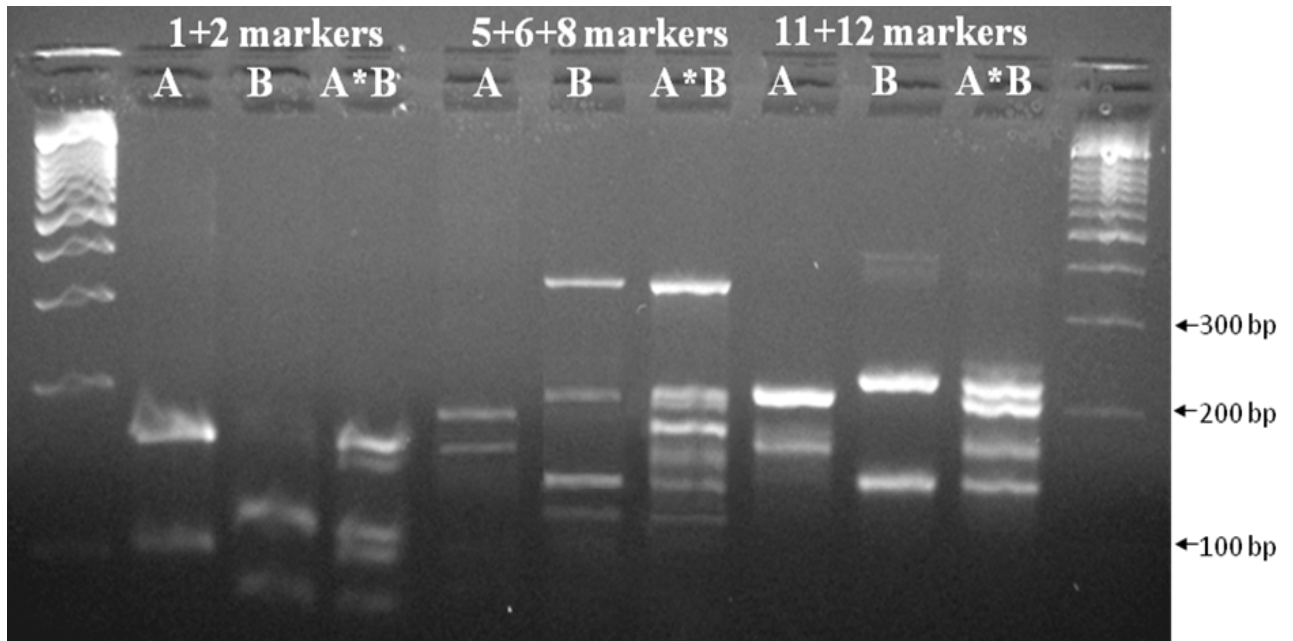


Рис. 3.8. Електрофореграма мультиплексної ПЛР SSLP-маркерів для двох екотипів *A. thaliana*, Columbia (A) і Landsberg *erecta* (B), а також їх гібрида (A * B): 1 + 2 markers - мультиплекс ПЛР з сумішшю праймерів F16J7-TRB і NGA280; 5 + 6 + 8 markers - суміш праймерів ATDMC1.1, CIW4 і CIW6; 11 + 12 markers - суміш праймерів PHYC.3 і CIW9.

Розміри ампліфікованих фрагментів для кожного з маркерів відповідають очікуваним (табл. 3.2). У мультиплексній реакції для 1-го (F16J7-TRB) і 2-го (NGA280) маркерів утворюються фрагменти довжиною 165 і 114 п.н., відповідно, у разі екотипу Columbia (A) і довжиною 105 і 85 п.н. – *L. erecta* (B). При проведенні ПЛР з геномною ДНК гібрида утворюються всі чотири фрагменти. 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. (рис. 3.8), що може бути пов'язано з делецією ділянки хромосоми, що містить цей маркер, у даного екотипу. У подальшому передбачається використання цього маркера в якості нуль-алеля.

Таким чином, 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) (рис. 3.8). Ця система мультиплексів дозволить мінімізувати витрати реактивів, кількість інформаційно-цінних смуг при аналізі в агарозному гелі, необхідних для візуалізації продуктів ПЛР, а також скоротити час досліджень. Результати роботи дадуть можливість прискорити та здешевити проведення масового генотипування рослин *A. thaliana*, екотипів Columbia і *L. erecta*.

Підібрано 12 SSLP маркерів для ідентифікації екотипів *A. thaliana*: Columbia і *L. erecta*, оптимізовано умови ПЛР-реакції для цих 12 мікросателітів і розроблені мультиплекс-реакції для ідентифікації 7 локусів. Розроблена система ДНК-маркерів може бути використана для дослідження поведінки та успадкування хромосом материнського і батьківського геномів у гібрида *A. thaliana*.

3.2.4. Вивчення впливу різних концентрацій ПФФА на калюсоутворення та регенераційну здатність.

Дослідженню процесів, які призводять до гаплоїдизації і/або гомозиготації генома в соматичних клітинах рослин, культивованих *in vitro* приділяють велику увагу вже впродовж декількох десятиліть. Практичний аспект значення цих досліджень зумовлений необхідністю створення ефективних підходів для отримання гомозиготних рослин та ліній рослин на основі гетерозиготного матеріалу. Відомо, що зменшення числа хромосом в соматичних клітинах відбувається спонтанно при культивуванні *in vitro*, або за дії різних хімічних індукторів на рослинні тканини (Мельничук и др. 2003; Sytnyk et al. 2012; Савінський та ін. 2012). Пов'язують це з явищем соматичної сегрегації хромосом – мейозоподібним поділом, в результаті якого розходяться не хроматиди, як в нормі під час мітозу, а хромосоми, і таким чином виникають клітини з редукованим числом хромосом (Giorgetti et al. 1995). Наслідком даного явища може бути втрата гетерозиготності окремих локусів або повна

гомозиготація (Wang and Chatterton, 2001; Sybenga 2000). Відомо, що однією з хімічних речовин, яка може впливати на мітоз та призводити до редукції числа хромосом, є пара-фтор-феніланін (ПФФА) (Niizeki and Fukui 1978; Banks et al. 1982; Palmer and Widholm 1975). ПФФА є аналогом феніланіну (ФА), який конкурує з природною амінокислотою та інтеркалюється в білки замість неї (Захленюк і Костенюк, 1991; Ruvalcaba-Ruiz et al. 2012). Деякі білки, що містять ПФФА зберігають свою функцію, а інші, навпаки, стають неактивними, порушуючи функціонування всієї клітини. ПФФА є інгібітором синтезу білка, а також може безпосередньо інгібувати певні ферменти, що беруть участь в біосинтезі ароматичних амінокислот (Варфоломеев и др. 2000). Крім того в культивованих клітинах, оброблених ПФФА, виникає деяка нестабільність і структурні аномалії в мітотичному веретені (Siskens et al. 1972). Всі ці ефекти ПФФА пригнічують поділ клітин та сприяють проходженню аномальних мітозів. Так, ПФФА може викликати у вищих рослин зміни плоїдності геному або зменшення числа хромосом, що призводить до гаплоїдизації або анеуплоїдії (Banks et al. 1982; Wijnker and Schnittger 2013). Результати досліджень в даній області в основному ґрунтуються на вивченні цитологічних препаратів хромосом меристематичних клітин. Важливим питанням залишається подальша доля таких клітин в культурі *in vitro*: чи схильні такі клітини до поділу, чи існують закономірності розподілу материнського і батьківського геномів між дочірніми клітинами, чи можна отримати з них дорослі рослини та яка генетична конституція цих рослин в порівнянні з вихідною.

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. Виходячи з даних досліджень інших рослин (Niizeki and Fukui 1983), перевіряли спектр концентрацій від 1 мг/л до 50 мг/л. Під час культивування експлантів на середовищі з ПФФА відбувалось

пригнічення росту калюсу залежно від концентрації ПФФА. Результати представлені на рис.3.9. 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 у середовищі (20 мг/л, 25 мг/л, 50 мг/л), експланти білили, 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%.

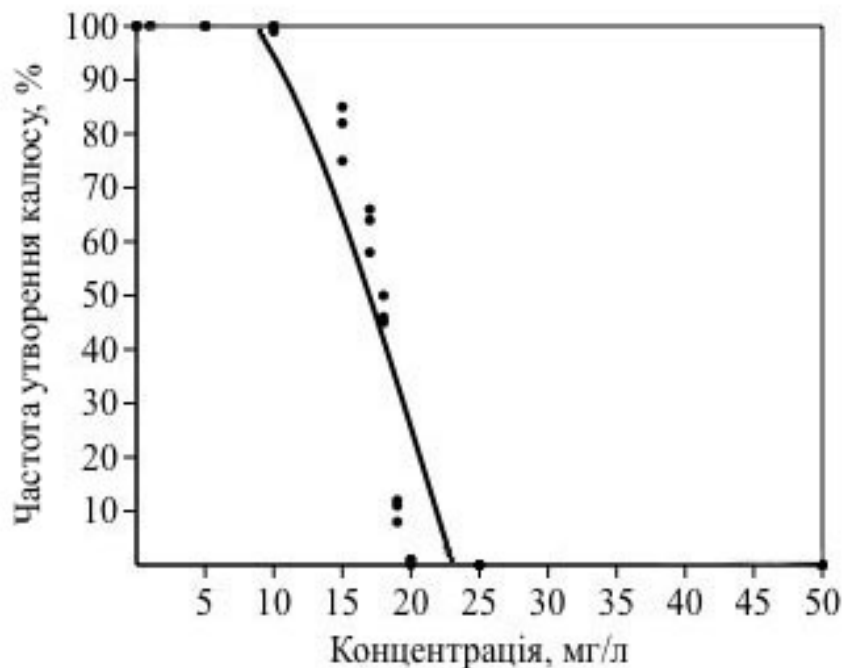


Рис. 3.9. Влив ПФФА на частоту утворення калюсу корневих експлантів *A. thaliana* (поліноміальна крива 3-го порядку, $R^2 = 0.89$, $F=86.5$, $P < 0.01$).

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 ще 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. 3.3).

Таблиця 3.3

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

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

Таким чином, ПФФА у концентраціях 15-18 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 (рис. 3.10), оскільки за такої концентрації дія ПФФА на поділ клітин була достатньо помітною, проте не відбувалося повного пригнічення росту калюсу і регенерації рослин.

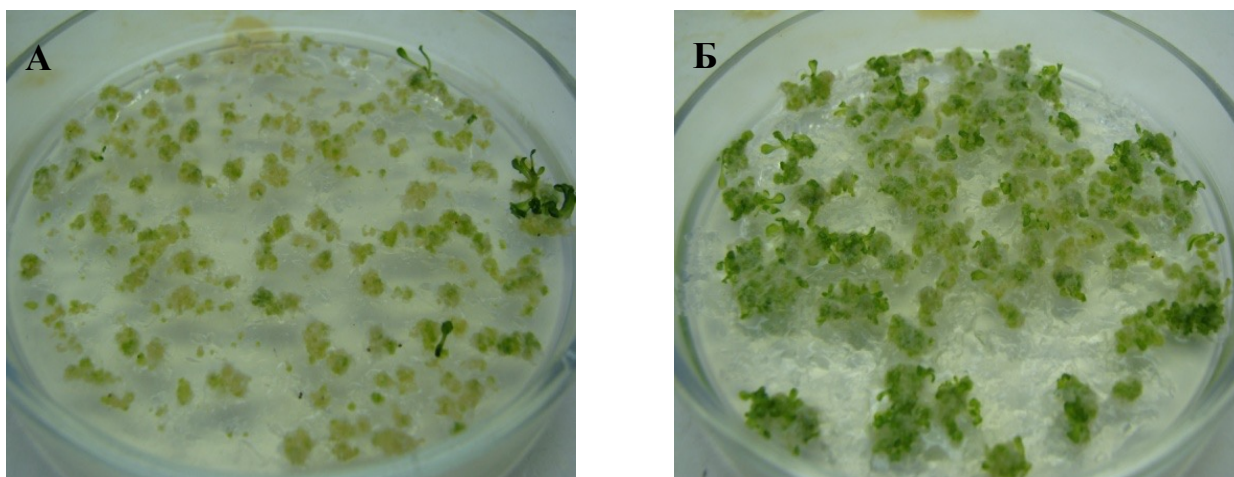


Рис. 3.10. Регенерація пагонів з калюсу на середовищі з додаванням 18 мг/л ПФФА (А) та в контролі (Б).

3.2.5. Культивування експлантів гібридів *in vitro* 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* (Зимина и др. 2011). Оскільки ці лінії мають селективний ген стійкості до канаміцину або PPT, відповідно, це дозволило відібрати на селективному середовищі гібридні рослини, тобто ті, що утворились шляхом перехресного запилення і мали селективні гени.

Після індукції регенерації з калюсу, що утворився на корневих 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.

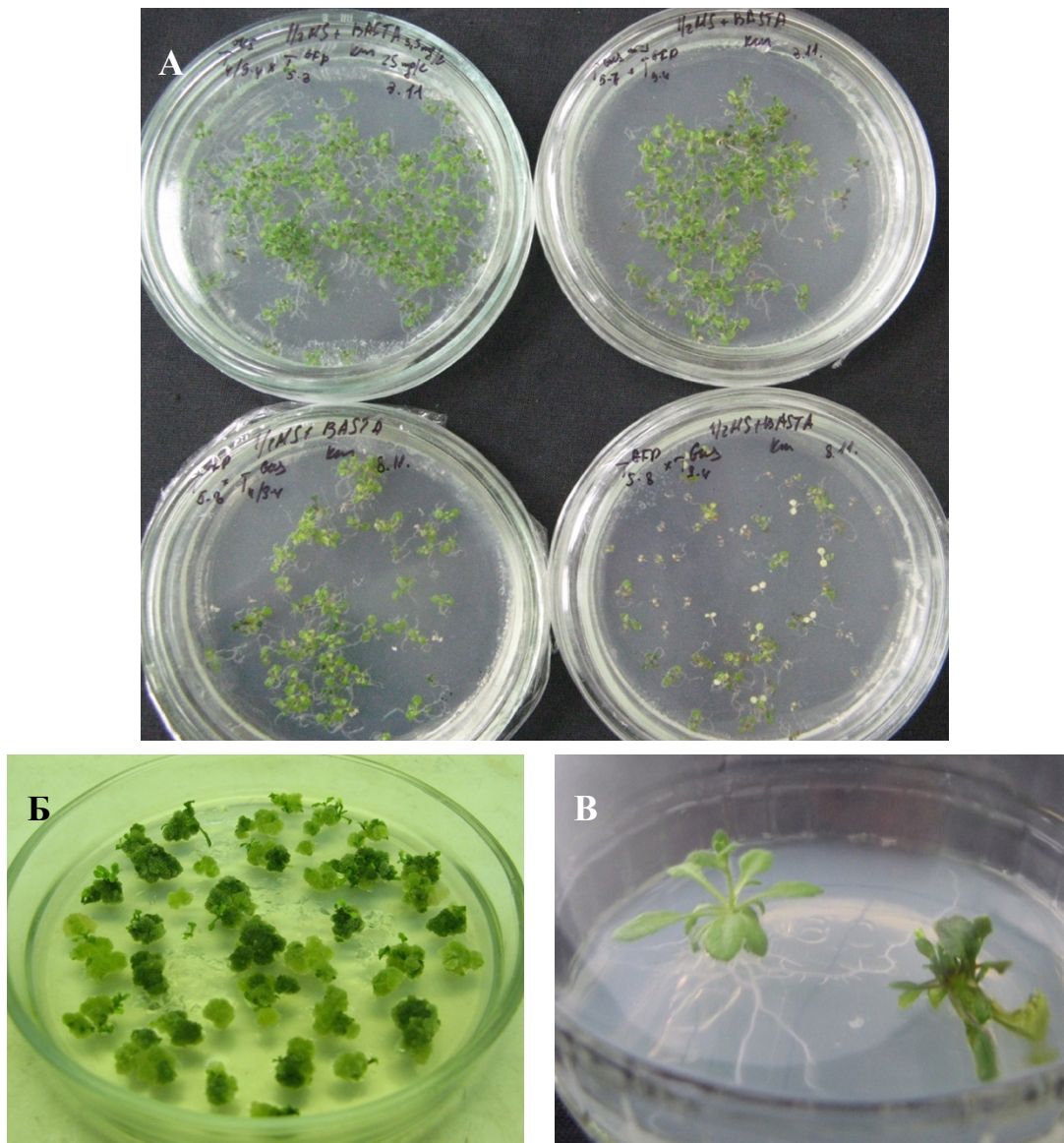


Рис.3.11. Селекція гібридного насіння *Columbia* × *Landsberg erecta* на середовищі з PPT і Km (A), регенерація рослин на живильному середовищі з ПФФА (Б), вкорінення і дорощування регенерантів (В).

3.2.6. Аналіз регенерантів за допомогою SSLP маркерів та цитологічний аналіз калюсних клітин.

Генотипування рослин за допомогою 12-ти SSLP маркерів дало наступні результати (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Генотипування регенерантів за допомогою SSLP маркерів

Варіант	1 хромо-сома		2 хромо-сома		3 хромо-сома		4 хромо-сома		5 хромо-сома коротке плече		5 хромо-сома довге плече	
	маркер 1	маркер 2	маркер 3	маркер 4	Маркер 5(н/а)	Маркер 6	маркер 7	маркер 8	маркер 9	маркер 10	маркер 11	маркер 12
Контроль 20 рослин	Col / <i>Ler</i>	Col / <i>Ler</i>	Col / <i>Ler</i>	Col / <i>Ler</i>	<i>Ler</i>	Col / <i>Ler</i>	Col / <i>Ler</i>	Col / <i>Ler</i>	Col / <i>Ler</i>	Col / <i>Ler</i>	Col / <i>Ler</i>	Col / <i>Ler</i>
ПФФА 18 мг/л 3 рослини	Col	<i>Ler</i>	Col	Col	<i>Ler</i>	Col / <i>Ler</i>	Col / <i>Ler</i>	Col / <i>Ler</i>	Col / <i>Ler</i>	Col / <i>Ler</i>	Col	Col

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

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. Однак, для інших трьох рослин SSLP-аналіз по шести локусам 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.3.12). 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.

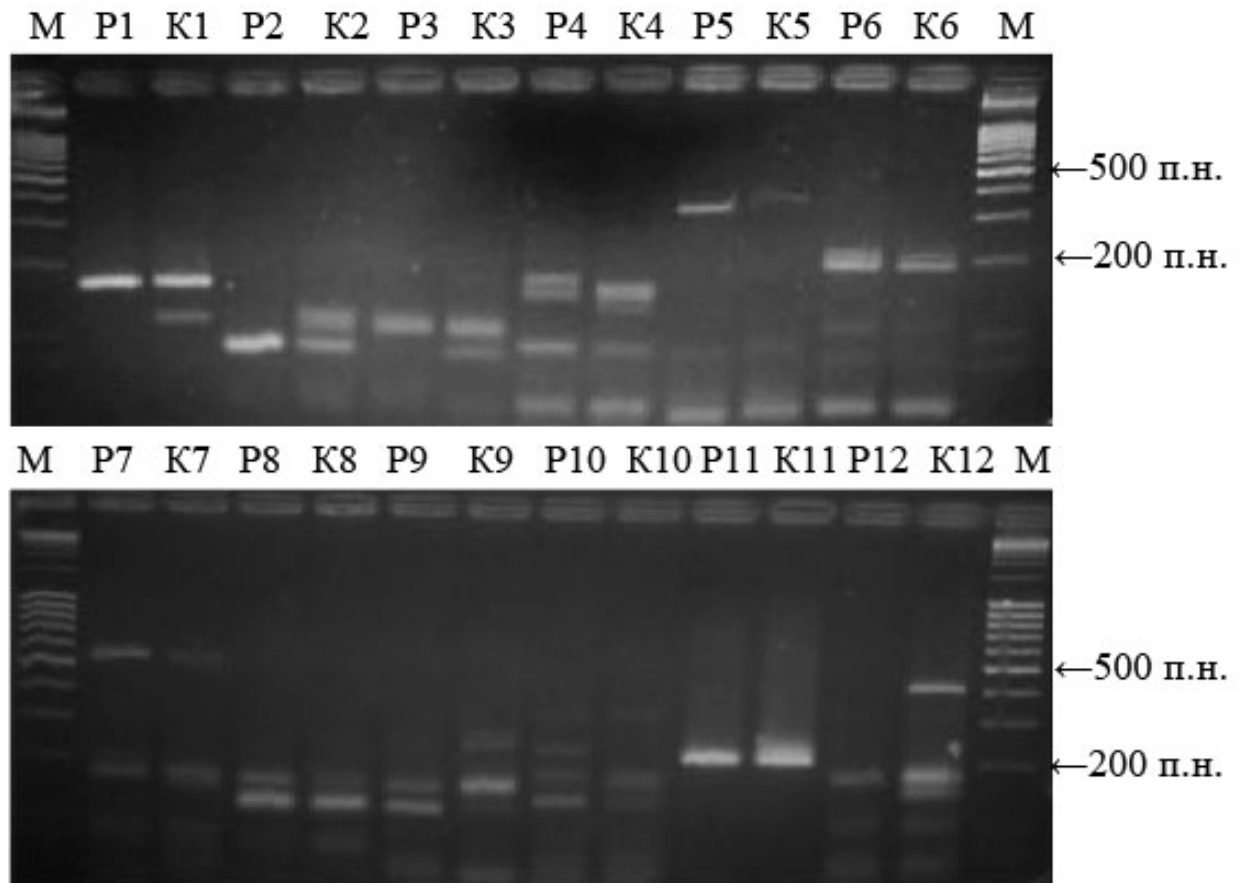


Рис. 3.12. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК з праймерами до послідовностей маркерних локусів. М-маркер MassRuler™ #SM0304, Р – регенерант, К – контроль, 1-12 – маркерні локуси.

Відомо, що під впливом ПФФА в мітотично активних культивованих клітинах відбувається втрата хромосом або гаплоїдизація (Ruvalcaba-Ruiz et al. 2012; Wijnker and Schnittger 2013), що може бути причиною втрати генетичного матеріалу однієї з батьківських ліній. Аналіз розподілу алелів на хромосомах однієї з отриманих рослин-регенерантів *A. thaliana* (рис. 3.13) показав, що гомозиготація локусів на обох плечах за материнським генотипом Columbia відбулась тільки для 2-ї хромосоми – локуси 3 та 4. Можна було б вважати гомологічну батьківську хромосому від *L. erecta* втраченою, а отримані рослини – анеуплоїдами, але для доказу відсутності цілої хромосоми потрібний цитофлуорометричний аналіз. Водночас, інші хромосоми з втратою гетерозиготності в одних локусах мають одночасно фрагменти як від

материнської, так і від батьківської лінії в інших. Так, для 5-ї хромосоми в локусах 11 та 12 на одному плечі ампліфікувались фрагменти тільки від генотипу Columbia, а локуси 9 та 10 залишилися гетерозиготними. У випадку 1-ї хромосоми на одному плечі є фрагмент тільки від лінії Columbia (локус 1), на іншому – тільки від *L. erecta* (локус 2).

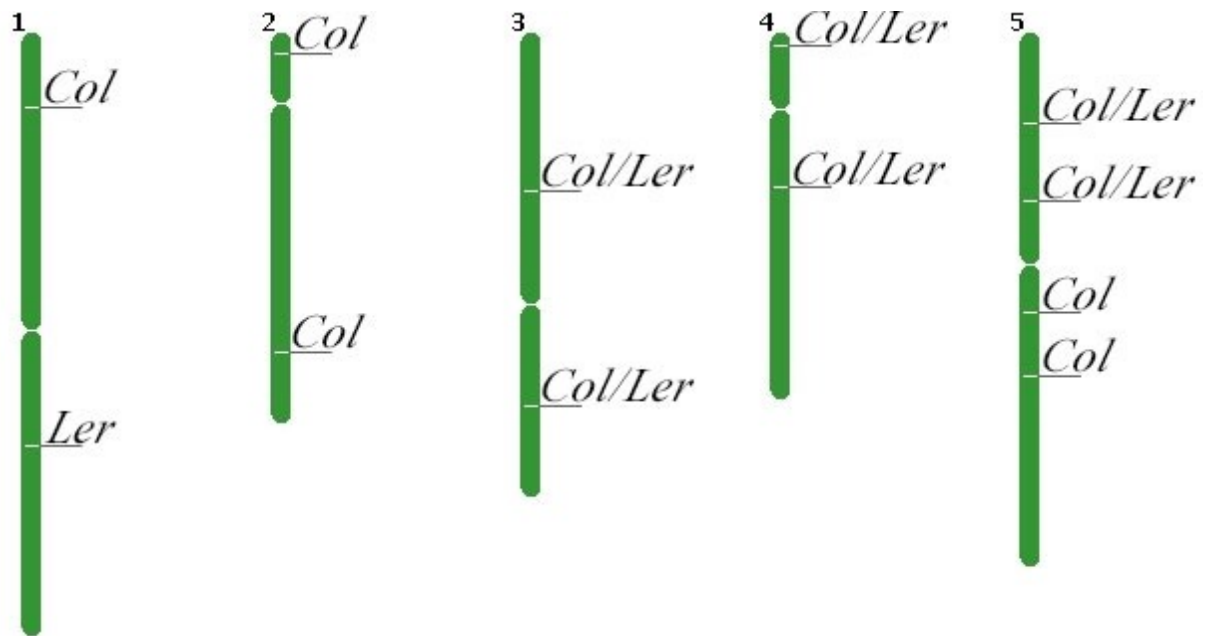


Рис. 3.13. Розподіл SSLP маркерів на хромосомах в результаті гомозиготації окремих локусів на хромосомах в однієї з рослин-регенерантів після культивування з використанням ПФФА .

Аналогічне явище – гомозиготацію локусів у пагонів рису – спостерігали також інші дослідники (Wang et al. 2006; Sybenga 2000). Автори схиляються до того, що можливими механізмами утворення пагонів, у яких виявлено втрату гетерозиготності окремих локусів, можуть бути асортативний мітоз або сегрегація гомологічних хромосом в меристематичних клітинах. Внаслідок цього кожна клітина отримала по одному з гомологів батьківських ліній, що і призвело до гомозиготації локусів. Італійські вчені також пов'язують випадки гомозиготації, які вони спостерігали в своїх дослідях з культивування *in vitro* клітин моркви, з подібними явищами хромосомної

сегрегації та/або мейозоподібними поділами (Giorgetti et al. 1995). На користь своїх припущень вони наводять дані цитологічного аналізу поділу клітин, який виявив фігури, схожі на перший поділ мейозу. Аналогічні результати отримані на калюсних культурах *A. thaliana*, які культивували на середовищі С-1 (Chen et al. 2001). Автори цієї роботи спостерігали до 3,2 % гаплоїдних клітин, до 7,3% випадків так званого редукційного угруповання хромосом (somatic chromosome reductional grouping), а також клітини з соматичним мейозом. В наших експериментах 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 хромосом (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

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 $P < 0.05$.

Ми 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. 3.14).

Зростання МІ в калюсних клітинах порівняно із інтактною рослиною слід було очікувати внаслідок дії фітогормонів і постійної проліферації клітин. При додаванні 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.

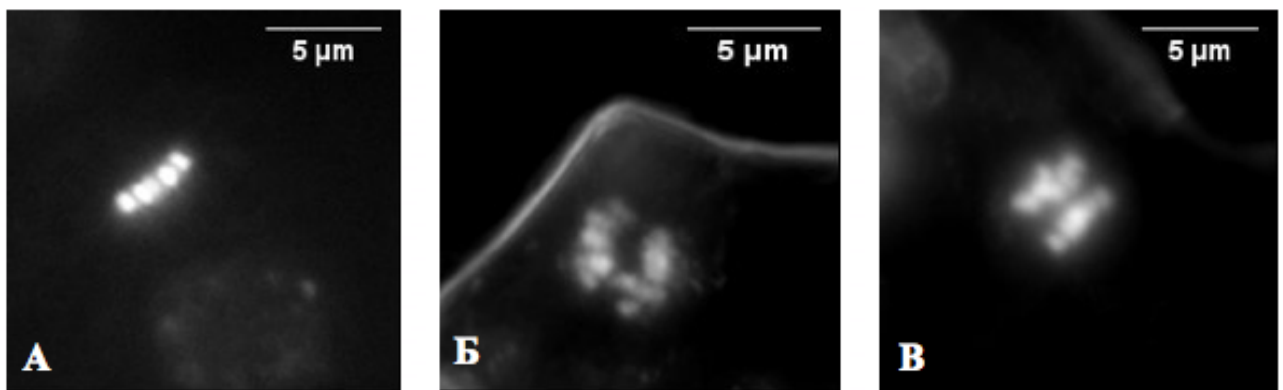


Рис. 3.14. Препарати хромосом калюсних клітин, культивованих на середовищі з ПФФА, на різних стадіях мітозу. А - метафаза з бівалент-подібними структурами і числом хромосом $n=5$; Б, В - клітини на стадії анафази з вдвічі зменшеним числом хромосом.

Точний підрахунок числа хромосом є проблематичним для цитогенетичного аналізу *A. thaliana* через малий розмір хромосом. Складність такого підрахунку призводить до помилкової інтерпретації результатів при спостереженні поділів хромосом на цитологічних препаратах. Так, китайські дослідники (Chen et al. 2001) прямо говорять про те, що вони не змогли оцінити кількість клітин з соматичним мейозом і проводили статистичний аналіз своїх даних, ґрунтуючись на кількості гаплоїдних клітин і клітин з редуційним угрупованням 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 пояснювати рекомбінація між двома гомологічними хромосомами.

Явище мітотичної рекомбінації (МР) досліджено у багатьох живих організмів (LaFave and Sekelsky 2009; Lee et al. 2009), зокрема у вищих рослин (Puchta and 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 сестринській хроматиді, так і на гомологічній хромосомі (Molinier et al. 2004). Відомо, що головною причиною спонтанних кросинговерів є подвійні розриви в ланцюзі ДНК (Lee et al. 2009; Gisler et al. 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 (Константинов 1971), 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.

Далі, особливий інтерес має бути спрямований на визначення в геномі *A. thaliana* певних сайтів рекомбінації між деякими хромосомами. З великою ймовірністю такі транслокації можуть відбуватись через фізіологічний дволанцюговий розрив і систему репарації під час мейозу (Alkhimova et al. 2004). З'ясування механізмів формування цих перебудов призведе до розуміння шляхів утворення розривів і репарації, що діють при нормальному мейозі. Субтеломерний регіон деяких хромосом *A. thaliana* містить потенційні гени та фрагменти дуплікації з інших хромосом *A. thaliana* (Wang et al. 2010). Так, було показано, що проксимальна від центромери теломер-асоційована ділянка послідовностей 3-ї хромосоми екотипу Columbia містить два ідентифікованих гена (Wang et al. 2008), а проксимальна від теломери ділянка тієї ж хромосоми має короткі дупліковані фрагменти з хромосом 1, 2, та 3; 3-я ж хромосома іншого екотипу - з хромосоми 5. Кожен з дуплікованих фрагментів зазнав дивергенції відносно ектопічного фрагмента. Невеликі ділянки гомологічних нуклеотидів були знайдені у фланкуючих

послідовностях як у дуплікованих фрагментів, так і у відповідних ектопічних послідовностях ДНК (Wang et al. 2010). Структурні характеристики цих дуплікованих фрагментів свідчать про те, що вони є тією ДНК, що виникає під час негомологічного з'єднання кінцевих послідовностей після репарації дволанцюгового розриву.

Деякі характеристики отриманих рослин поки що залишаються нез'ясованими, а саме невідомо яку вони мають плоїдність. Ми плануємо продовжувати дані дослідження із застосуванням FISH аналізу, дослідити сегрегацію хромосом в наступних поколіннях отриманих рослин-регенерантів та провести подібні досліді на інших модельних об'єктах.

Індукція конституційних змін генома в культурі *in vitro* була б особливо корисна як джерело нових форм для селекційної роботи та скоротила б час для виведення нових сортів рослин або отримання необхідних інбредних ліній.

З огляду на те, що відсоток явища соматичної редукції хромосом був дуже низьким за індукції ПФФА, складно дослідити механізми процесу. Ми припускаємо, що це пов'язано з механізмом контролюючого моменту (Check point), який запобігає неправильному розходженню хромосом в клітинах. Таким чином, пригнічення важливих чинників прогресії сегрегації хромосом має збільшувати випадки атипових поділів. Значну роль в сегрегації хромосом, у прикріпленні мікротрубочок до кінетохору і цитокінезі відіграє кіназа Aurora B (Carmena and Earnshaw 2003; Kurihara et al. 2008). Клітини, позбавлені кінази Aurora B, не зупиняються на стадії метафази, навіть коли хромосоми не з'єднані з мікротрубочками належним чином (Hauf et al. 2003). Отже, дефіцит кінази Ауорога В призводить до прогресії процесу поділу клітини далі через анафазу, незважаючи на наявність неправильно з'єднаних хромосом. В подальшому з метою підвищення відсотку аномальних поділів ми плануємо проведення експериментів із використанням інгібітора кінази Aurora B – гесперадина.

Результати, подані у даному розділі, опубліковані в наступних працях:

1. Zimina, O., Parii, M., Alkhimova, O. (2016). Loss of heterozygosity at individual loci in *Arabidopsis thaliana* regenerants cultured with para-fluorophenylalanine. *Cytology and Genetics*, 50(5), 278–284.
2. Sytnyk, K., Zimina, O., Vdovychenko, Z., Spyrydonov, V., Melnychuk, M., Parii, M. (2012). Somatic segregation: genetic evidences, consequences and applications. *Acta Hort.*, 961, 495– 502 (DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.961.65)
3. Зими́на, О. В., Сытник, Е. С., Парий, М. Ф., Алхимова, Е. Г. (2014). Мультиплексная полимеразная цепная реакция для генотипирования экотипов *Arabidopsis thaliana* с помощью SSLP-маркеров. *Biotechnologia Acta*, 7(4), 80-84.
4. Савінський, С., Вдовиченко, Ж., Ситник, К., Зіміна, О., Спиридонов, В., Парій, М. (2012). Аланін як індуктор соматичної сегрегації у клітинах апікальної меристеми корінців *Allium cepa* L. Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів, 10(2), 303-310.
5. Zimina, O., Vorobiova, I., Voloshchuk, T., Zaika, L., Alkhimova, O. (2012). DMSO and izatizon contribute to plant immunity. *Mater. online XVI Intern. Sci. Pract. Conf. 'Problems and ways of modern public health development'*, 187-188.
6. Зими́на, О., Сытник, Е., Вдовиченко, Ж., Парий, М., Алхимова, О. (2011). Создание трансгенных линий *Arabidopsis thaliana* для изучения явления соматической сегрегации. Збірник наукових праць 'Фактори експериментальної еволюції організмів', 11, 263-268.
7. Zimina O., Sytnik E., Parii M., Alkhimova, O. G. (2011) Study of somatic segregation in *Arabidopsis* cells cultured *in vitro*. *Biopolym. Cell*, 27(4), p. 327.
8. Zimina O., Parii M., Alkhimova O. (2015, August) Using the DNA markers for somatic chromosome segregation study in plants. *Proceedings of the 24th Wilhelm Bernhard Workshop 'Cell Nucleus'*, Vienna, p.44-45.

3.3. 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.

3.3.1. Хромосомна локалізація повторюваних послідовностей pSc119.2, pSc200 та pSc250.

Для ідентифікації гомологічних хромосом *S. cereale* ми використовували жито-специфічні негомологічні послідовності pSc119.2, pSc200, pSc250, що були добре охарактеризовані раніше (Vershinin et al. 1995). Вони складаються з мономерів довжиною 118, 379 і 571 п.н. відповідно, і кожна родина становить кілька відсотків ядерного геному жита, що при FISH аналізі дає можливість добре розрізняти гібридизаційний сигнал. Поліморфізм в розподілі цих сигналів між сортами жита дає можливість ідентифікації гомологічних хромосом у гібридів між даними сортами.

В результаті проведення флуоресцентної гібридизації *in situ* з клонами pSc119.2, pSc200 та pSc250 (рис. 3.15) отримані сильні гібридизаційні сигнали у місці розташування субтеломер, які відповідають позитивній флуоресценції гетерохроматину C-бендів при забарвленні DAPI.

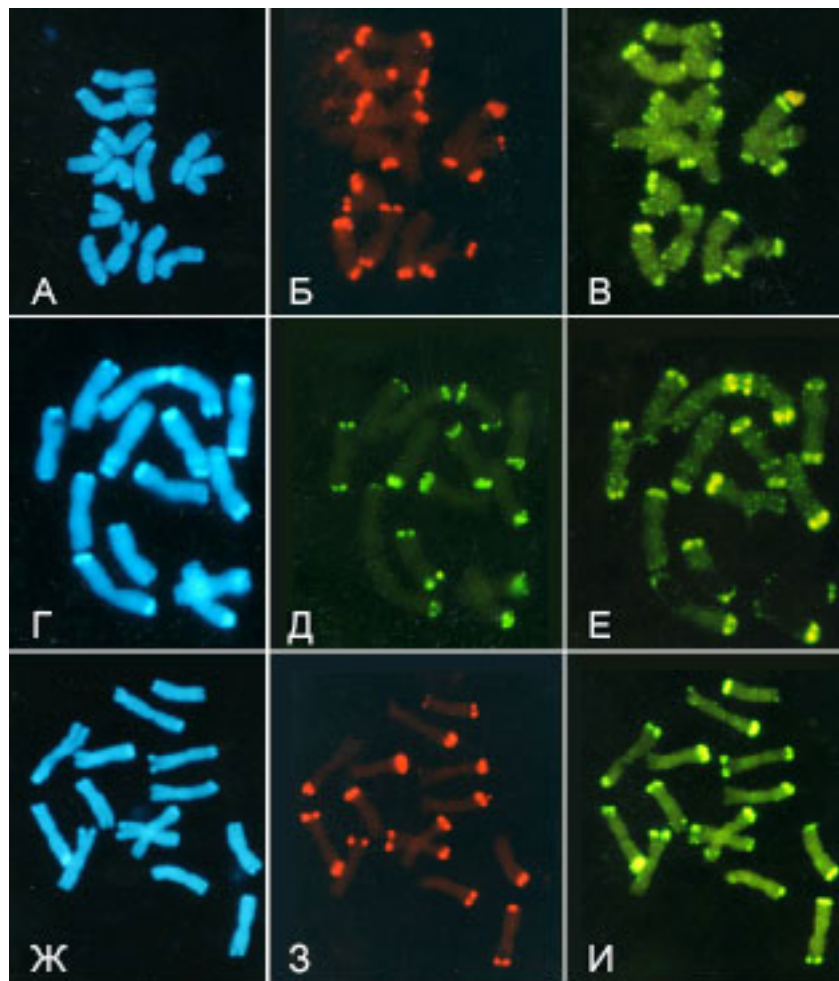


Рис. 3.15. Флуоресцентна гібридизація *in situ* повторюваних послідовностей ДНК, pSc119.2 (В, Е, І) та pSc250 (Б, Д, З) на хромосомах трьох сортів жита, Imperial (А, Б, В), Petkus (Г, Д, Е) та Онохойская (Ж, З, И). А, Г, Ж – забарвлення DAPI.

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. Загальна кількість окремих сайтів гібридизації, визначена шляхом підрахунку на мікроскопічних зображеннях видовжених профазних хромосом, які мають достатньо високу роздільну здатність, загалом може становити біля 100

дискретних сигналів у вигляді бендів чи подвійних крапок. 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. 3.15). 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.

3.3.2. Міжсортний поліморфізм хромосом жита.

Гібридизація *in situ* двох негомологічних високоповторюваних послідовностей ДНК, pSc200 та pSc250, показала хромосомспецифічну локалізацію цих повторів, що дало можливість ідентифікувати більшість плечей хромосом жита. Згідно номенклатури хромосом жита (Sybenga 1983), ми порівняли каріотиби трьох сортів Petkus, Imperial та Онохойская (рис. 3.16).

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, а також на довгому плечі одного з гомологів 2R та 7R у Онохойская.

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. На відміну від pSc200, де дані свідчать про позитивну кореляцію між розміром та розподілом сигналу і блоками гетерохроматину, сайти гібридизації з pSc250 не завжди співпадали за інтенсивністю та формою зі смугами, забарвленими DAPI.

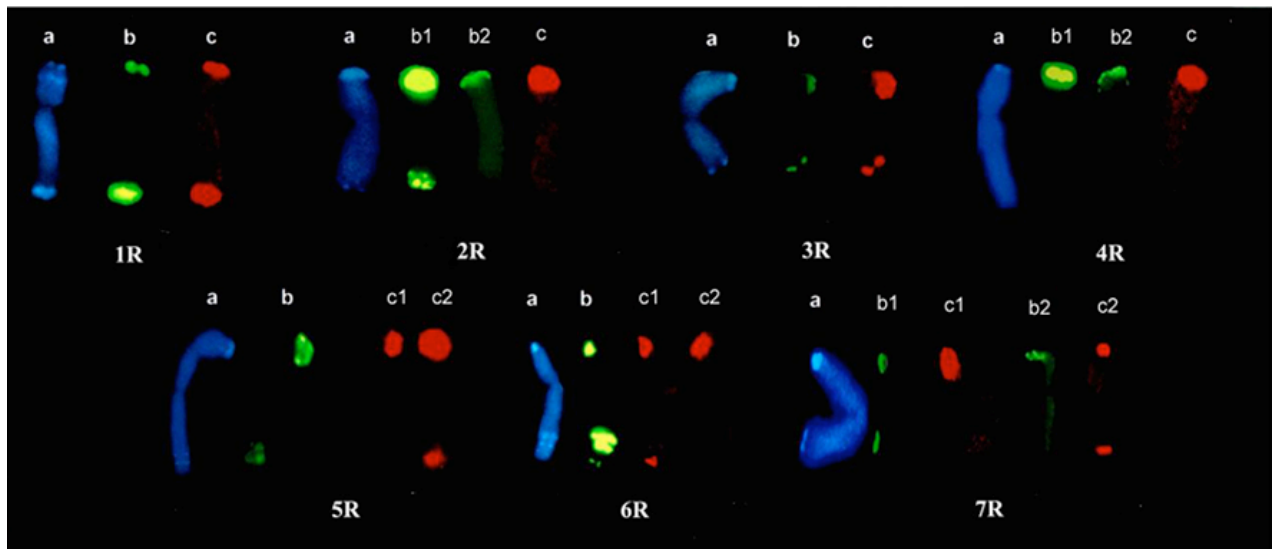


Рис. 3.16. FISH аналіз розподілу субтеломерних послідовностей ДНК, pSc200 та pSc250, на індивідуальних хромосомах жита (синій колір - DAPI забарвлення, зелений - pSc200, червоний - pSc250, 1- Petkus, 2 - Imperial).

Оскільки повторювані послідовності ДНК, pSc200 та pSc250, не були виявлені у геномі пшениці методами блот-гібридизації ДНК та гібридизації *in situ* (Vershinin et al. 1996), їх застосування в ролі хромосомних маркерів дозволяє з легкістю ідентифікувати хромосоми жита у пшенично-житніх заміщених та доповнених лініях. У дослідженнях на заміщених та доповнених

лініях (Alkhimova et al. 1999) тільки дві хромосоми Imperial, 4R та 6R, були незмінними. Моносомію хромосом 1R, 3R та 7R спостерігали у кожних двох з п'яти рослин, а моносомію 5R хромосоми – у кожних чотирьох з п'яти рослин серед доповнених ліній. Найбільш інтенсивні перебудови спостерігали у лінії, яка несла доповнену хромосому 2R. На відміну від доповнених ліній, у всіх заміщених лініях спостерігали ампліфікацію маркерних послідовностей, можливо тому, що вони зазнавали меншого селективного тиску.

3.3.3 Ідентифікація всіх хромосом жита *Secale cereale*.

Хоча за допомогою послідовностей сімейств pSc200, pSc250 та pSc119.2 можливо ідентифікувати більшість хромосом каріотипу *Secale cereale*, все ж таки не всі хромосоми легко диференціюються на цитологічних препаратах, оскільки після FISH мають деякі ідентичні сигнали гібридизації з відповідними повторами (наприклад, хромосоми 1R та 3R мають однакові бенди з усіма трьома зондами). Із використанням у якості зондів мікросателітної послідовності GAA і проби рТА794 (фрагмент гена 5S рРНК) було ідентифіковано хромосоми жита *S. cereale* сортів Selgo і Життєдайне (рис. 3.17). 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*. Такий самий розподіл сигналів зондів GAA та рТА794 мають і інші досліджені нами сорти жита. Поліморфізм виявився при розподілі повторів GAA на довгому плечі хромосоми 5 між двома сортами Selgo та Життєдайне (рис.3.17), таким чином дозволяє відрізнити гомологічні хромосоми даних сортів.

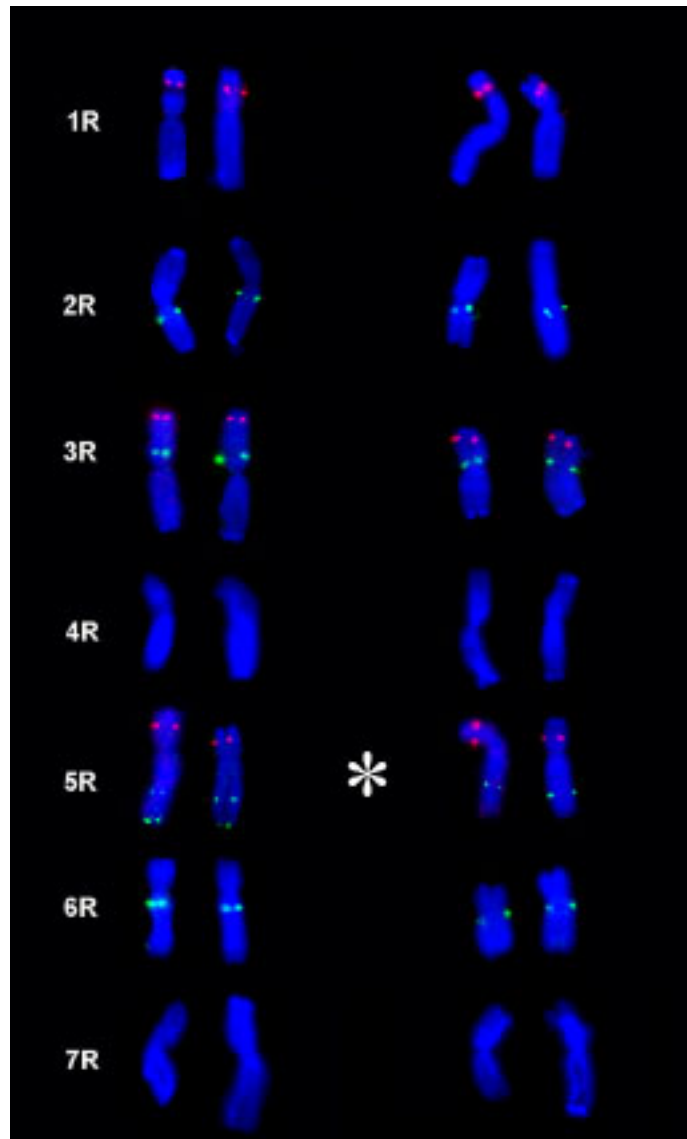


Рис. 3.17. Флуоресцентна гібридизація *in situ* мікросателітної послідовності GAA (зелений колір) та проби 5S рДНК (червоний колір) на хромосомах *S. cereale* сортів Selgo (зліва) та Життедайне (справа). * - відмінності сигналу GAA на хромосомі 5R.

3.3.4. Проточна цитофлуориметрія хромосом двох сортів *S. cereale*.

Цитофлуориметричний аналіз мітотичних метафазних хромосом, ізольованих з сорту жита Imperial, представлено гістограмою відносної інтенсивності флуоресценції (рис. 3.18), де більший, композиційний, пік

репрезентує хромосоми 2R-7R, а менший пік – хромосому 1R. Ця хромосома є найменшою у каріотипі жита Imperial і єдина, яку можна сортувати індивідуально.

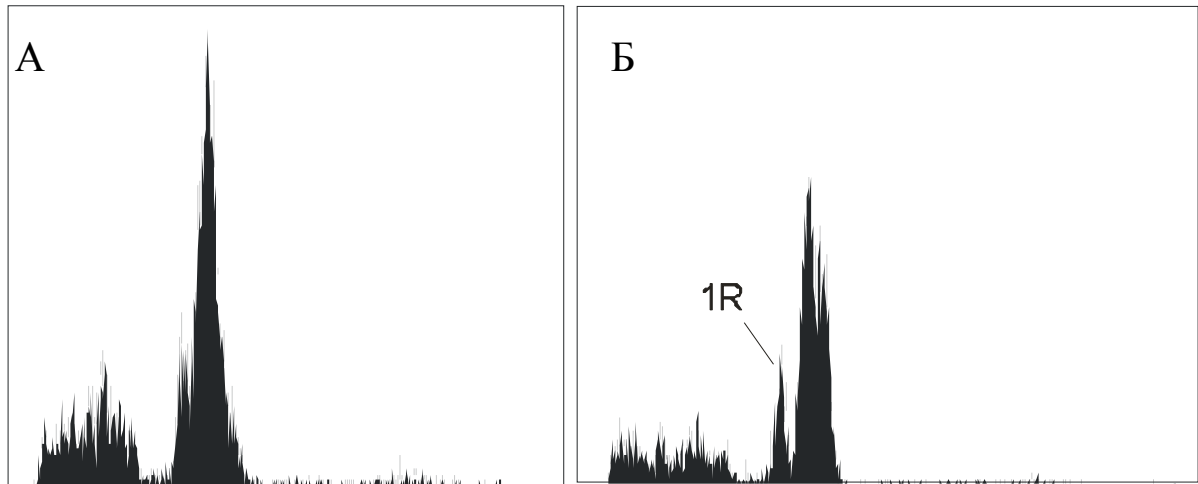


Рис. 3.18. Гістограма відносної інтенсивності флуоресценції (проточний каріотип), отримана після проточного цитометричного аналізу суспензії хромосом ліній жита, забарвлених DAPI. Композитний пік Selgo складається з хромосом 1 R-7R (А). Каріотип Imperial містить два піки, що представляють хромосоми жита 2R-7R і пік хромосоми 1R (Б). Пік хромосоми 1 R - чітко помітний, і хромосому можна легко сортувати.

Аналіз методом проточної цитометрії метафазних хромосом, виділених з жита Життєдайне, показав, що проточний каріотип цього сорту також складається з двох піків (рис. 3.19. А). 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.

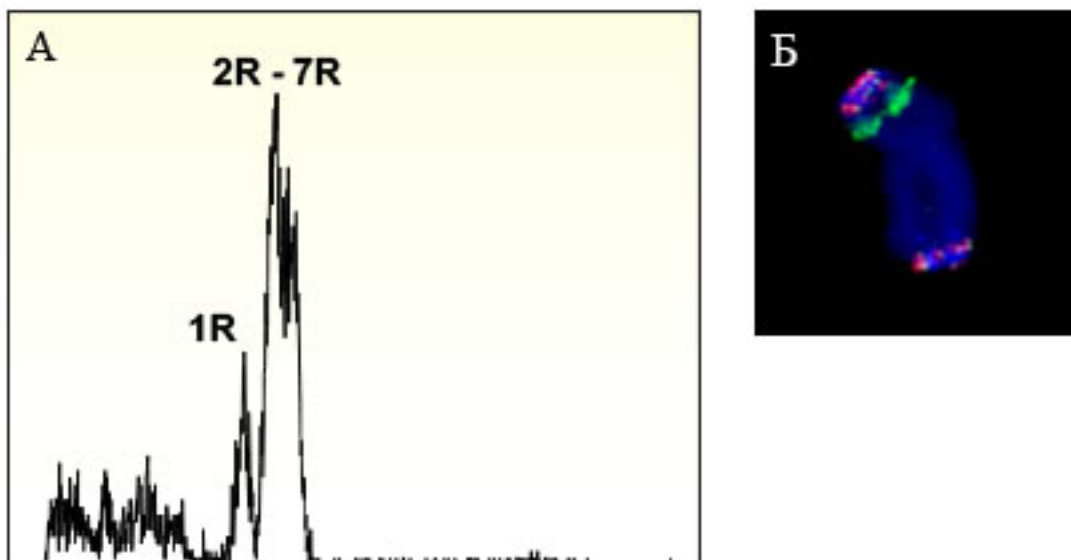


Рис. 3.19. Проточний каріотип *S. cereale*. **А** - Проточний каріотип, одержаний в результаті аналізу суспензії хромосом *S. cereale* сорту Життедайне, забарвлених DAPI. Пік, що репрезентує хромосому 1R можна легко розрізнити, і це дозволяє сортирувати хромосоми у великій кількості з чистотою більше 90%. Другий пік проточного каріотипу репрезентує групу житніх хромосом 2R-7R. X: відносна флуоресценція DAPI, Y: число випадків. **Б** – Хромосома 1R після сортирування 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 (блакитний колір).

Повний структурний і функціональний аналіз всіх семи пар хромосом жита – довготривале і складне дослідження. Розроблена процедура сортування великої кількості інтактних індивідуальних хромосом 1R жита (рис. 3.19) дозволяє послідовно фізично картувати цю хромосому. Нами вже започатковано дослідження тонкої структурної організації термінального регіону індивідуальної хромосоми 1R та створення фізичної карти

термінальних районів обох плечей з визначенням основних структурних доменів і локалізації найбільш поширених послідовностей ДНК.

Аналіз генома жита на молекулярному рівні ускладнюється за рахунок його великого розміру ($1C = 7900 \text{ Mbp}$) (Bartoš et al. 2008), який у 1,4 рази більший за геноми диплоїдних попередників гексаплоїдної пшениці. І хоча частка повторюваних послідовностей ДНК у геномі жита ще не точно визначена (Mago et al. 2004), все ж вона може становити більше ніж 90% геному жита. Аналіз на молекулярному рівні може бути спрощений шляхом розчленування генома на невеличкі частини і створення субгеномних молекулярних хромосомоспецифічних ВАС бібліотек. Хромосома 1R представляє важливу частину не тільки самого геному жита, але й геномів багатьох сортів пшениці (Bartoš et al. 2008).

Використання в якості проб негомологічних високоповторюваних житоспецифічних ДНК послідовностей pSc200 і pSc250 полегшило ідентифікацію хромосом у різновидах жита. Поліморфізм сайтів локалізації pSc200, pSc250 та pSc119.2 дав змогу ідентифікувати внутрішньо- та міжсортів відмінності, а також гетерозиготність між гомологами хромосом 1R, 2R і 7R сорту Онохойская. Міжсортів поліморфізм локалізації послідовності pSc200 був показаний для хромосом 2R, 4R та 7R, а по локалізації послідовності pSc250 – для хромосом 5R, 6R та 7R. Набагато менше сайтів гібридизації з pSc119.2 виявлено у сорту Онохойская порівняно із сортами Petkus та Imperial. Гетероморфізм гомологів та міжсортів поліморфізм локалізації високоповторюваних ДНК послідовностей – особливість сортів жита (Appels et al. 1981; Jones and Flavell 1982, Lapitan et al. 1988; Cuadrado et al. 1995). Різниця у хромосомному розподілі послідовностей між сортами показує, що зміни в родинях pSc200 і pSc250 виникли незалежно, незважаючи на їхнє близьке розміщення або навіть накладання, виявлене за допомогою гібридизації *in situ* та пульс-електрофорезу (Alkhimova et al. 2004). Відмінні патерни сайтів гібридизації цих послідовностей були показані у двох

видів *Dasyphyrum*, що також свідчить про їх незалежне походження і підтверджує їхній статус окремих одиниць еволюції (Vershinin et al. 1996).

Еволюція повторюваних послідовностей ДНК може бути прискорена, коли на організм діють різноманітні стресові фактори: фактори навколишнього середовища, гібридизація, культивування *in vitro* (McClintock 1978; Henikoff 2005). Була описана кореляція між перебудовами у видах ячменю та гібридів жито-ячмінь (Vershinin et al. 1992, Svitashhev et al. 1995). Ампліфікація pSc250 на довгому плечі хромосоми 2R сорту Онохойская може відображати процес розповсюдження високо повторюваних послідовностей ДНК в геномі жита. Запропонована тенденція збільшення розміру генома злаків в процесі еволюції здебільшого стосується ретротранспозонів (Bennetzen et al. 2005; Lelley et al. 2004). Тим не менше, вірогідно збільшення високоповторюваних тандемних послідовностей також сприяло цьому процесу, не менше ніж ретротранспозони, через високу копійність.

Таксономія роду *Secale*, як і будь-якого іншого, є ще неусталеною. Загальноприйнятою є точка зору, що рід включає три однорічних види: *S.cereale*, *S.silvestre*, *S.vavilovii* та три багаторічних види: *S.montanum*, *S.anatolicum*, *S.africanum*, це вид в еволюційному плані найбільш далекий від *S.cereale*. Було показано, що субтеломерні сегменти хромосом *S.silvestre* вдвічі менші за *S.cereale* (Alkhimova and Lialitska 2008).

Диференціальна елімінація хромосом в різновидах жита (Linde-Laursen et al. 1988) та пшенично-житніх гібридах (Taketa et al. 1995) може залежати від просторової організації хромосом (Linde-Laursen et al. 1988). Хромосоми жита можуть втрачатись під час мітозу, якщо у пшенично-житніх гібридів вони займають периферійне положення (Heslop-Harrison and Bennett 1990). Мейоз у жита проходить вдвічі довше, ніж у пшениці (Bennett 1977), що також може відображатись на втраті хромосом жита або їх гетерохроматинових ділянок, які пізно реплікуються.

На відміну від доповнених ліній, перебудови, виявлені в заміщених лініях, включають лише ампліфікації, можливо тому, що на них діє менший

селективний тиск (Lukaszewski 2008; Lukaszewski et al. 2004). До сьогодні, не було проведено порівняння стабільності та змін структури чужорідних хромосом в доповнених та заміщених лініях. Детальне дослідження варіабельності каріотипу та еволюції послідовностей у декількох об'єктів, як нами показано, є доповненням до вивчення поведінки хромосом в популяціях. Збільшення міжсортового хромосомного поліморфізму є корисним і в еволюційному сенсі. Відомо, що визначене хромосомне число протягом видоутворення є важливим для стабільності каріотипу. Зміни цього числа, що виникають в різновидах, сортах, доповнених лініях, можливо, є причиною перебудов, які часто супроводжуються втратою чужорідного генетичного матеріалу.

Всі хромосоми мають основні базові характеристики, але кожна хромосома різниться за розміром і молекулярною організацією окремих ланцюгів повторів. Отримання індивідуальних хромосом методом проточної цитофлуориметрії є одним з найважливіших етапів нашої роботи. Процедура сортування окремих хромосом жита була оптимізована в лабораторії професора Долежала в Інституті експериментальної ботаніки (Olomouc, Czech Republic) (Valárik et al. 2004; Dolezel et al. 2007). Ця процедура дозволяє визначити довжину теломерних доменів і прилеглих до них теломер-асоційованих повторів ДНК для всіх хромосом окремо для кожного каріотипу. Сателітні повтори ДНК мають для нас особливе значення не тільки в якості маркерів, але і їхньої можливої участі як факторів мітотичної рекомбінації. Відомі такі дослідження, в яких показано, що гомологічні хромосоми під час мейозу розпізнають один одного за допомогою субтеломерних послідовностей, що мають гетерохроматинову природу (Corredor et al. 2007). І одним з найбільш важливих практичних застосувань сортованих хромосом є створення хромосомоспецифічних бібліотек ДНК, які можуть бути використані для різноманітних цілей.

Результати, подані у даному розділі, опубліковані в наступних працях:

1. Alkhimova, O., Zimina O. (2017). Identification of Rye Chromosomes by Flow Cytogenetics. *Biopolym. and Cell*, 33(2), p. 116-123.
2. Портова П., Зими́на О.В., Алхимова О. (2011, декабрь) Хромосомные метки ржи (*Secale cereale* L.). Тезисы докл. 2-й Между-нар. конф. молод. ученых 'Генетика и селекция растений, основанная на совр. генетич. знаниях и технологиях', Звенигород, с. 61.
3. Zimina O., Portova P., Alkhimova O. (2011, февраль) Molecular Cytogenetic Mapping of Chromosomal Fragments in Rye. *Abstr. Intern.Conf. Plant Gene Discov. Techn.*, Vienna, p. 39.
4. Alkhimova O., Zimina O. (2011, August) Subtelomeric sites of chromosomes, their sequences and their importance. *Proceedings of the 22nd Wilhelm Bernhard Workshop 'The Cell Nucleus'*, Riga, p.125.
5. Zimina O., Gurianov D., Alkhimova O. (2013, August) Epigenetic profile of satellite DNA. *Proceedings of the 23th Wilhelm Bernhard Workshop 'Cell Nucleus'*, Debrecen, p. 125.
6. Zimina O.V., Parii M.F., Alkhimova O.G. (2016, July) Some aspects of somatic chromosome reduction phenomenon to unravel the mechanisms. *Proceedings of the 12th International Congress of Cell Biology*, Prague, p. 192.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Поряд з основними типами поділу клітин існує ряд змінених та атипових форм клітинного поділу, серед яких особливу увагу привертають соматична редукція та/або соматичний мейоз. Інші терміни, що вживаються в наукових працях і підкреслюють характерні особливості цього явища - соматичне хромосомне угруповання, погеномна сегрегація, асортативний мейоз, профазна геномна сегрегація. Спільною ознакою цих атипових форм клітинного поділу, як це випливає із наведених термінів, є розходження гомологічних хромосом або розділення їх на дві гаплоїдні групи в соматичних клітинах. Стосовно особливостей механізмів поділу, наявності гомологічної рекомбінації, рівня плоідності та кількості дочірніх клітин вчені роблять різні припущення, однак генетичні наслідки соматичної редукції поки що залишаються недостатньо дослідженими.

Існують припущення, що соматична редукція виникає як причина чи наслідок соматичного ембріогенезу, а також може мати еволюційні функції регулювання рівня плоідності соматичних клітин рослин у природі. Для розуміння факторів, які впливають на цей процес і регулюють його на молекулярному рівні, необхідні дослідження як в культурі *in vitro*, так і *in vivo*. Крім того, явище соматичної редукції може знайти колосальне прикладне застосування для отримання гомозиготних ліній з метою використання його в селекції рослин, для чого необхідно провести його подальше фундаментальне вивчення.

В середині XX століття було виявлено, що у багатьох видів рослин в соматичних клітинах при певних умовах (наприклад, під впливом аланіна, кофеїна) під час поділу відбувається розходження гомологічних хромосом, а не хроматид, як у нормі в мітозі у клітин. Дане явище отримало назву соматична сегрегація (соматична редукція, погеномна сегрегація). Був виявлений взаємозв'язок між формуванням соматичних ембріодів і соматичною редукцією у *A. thaliana* і моркви. Незважаючи на численні

цитогенетичні дослідження, до цих пір невідомі причини і механізми явища соматичної редукції, неясно, чи відбувається гомологічна рекомбінація, чи існують закономірності розподілу материнського і батьківського геномів між дочірніми клітинами, який рівень плоідності у клітин, що утворилися, і яка доля цих клітин у подальшому. Для того, щоб знайти відповіді на поставлені питання ми розробили модельну систему для візуалізації поведінки гомологічних хромосом і вивчення генетичних наслідків даного явища - гібрид екотипів *A. thaliana* Columbia і *L. erecta* з хромосомами, маркованими трансгенами. В якості вихідного матеріалу у роботі з модельною системою *A. thaliana* використали лінії екотипів Columbia (№1093) і *L. erecta* (№1298), насіння яких отримали з Нотінгемського стокового центру (NASC). Рослини екотипу Columbia трансформували конструкцією, яка мала кодуєчи послідовності селективного гену стійкості до канаміцину (*nptII*) і репортерного гену *gusA*; екотип *L. erecta* - конструкцією з трансгенами стійкості до фосфінотрицину (*bar*) і гену зеленого флуоресціюючого білка *gfp*. Для трансформації використовували штам *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 з бінарними векторами pCAMBIA 2301 і pICH5290, відповідно. Проводили селекцію трансформованих рослин. Про наявність експресії гену *gusA* свідчила поява синього забарвлення тканин, а детекція експресії гену *gfp* проводилась ультрафіолетовим випромінюванням (395 нм). Щоб упевнитися в стабільній експресії трансгенів у поколіннях і отримати рослини, гомозиготні за вставками, було проведено три циклу самозапилення і пророщування насіння на селективних середовищах. Створені лінії *Arabidopsis thaliana* екотипів Columbia и *L. erecta* з хромосомами, до яких внесені трансгени-маркери, у подальшому схрещували, за допомогою трансгенів відбирали гібриди, стійкі до обох селективних агентів. Отриманий модельний гібрид можна використовувати для вивчення соматичної редукції при формуванні регенерантів або соматичних ембріоїдів, а також в колоніях протопластів, культивованих з додаванням індукторів соматичної редукції. Успадкування ознак у рослин-регенерантів вивчали за допомогою ДНК-маркерів і

спостереження за експресією репортерних генів.

Для ідентифікації екотипів *A. thaliana* і їхнього гібрида в якості ДНК-маркерів використовували послідовності SSLP, які у *A. thaliana* є високополіморфними, мають кодомінантний тип успадкування і прості в застосуванні. Підбір ДНК-маркерів проводили за допомогою пошукового ресурсу веб-сайту TAIR таким чином, щоб на кожному плечі з 1-ї по 4-у хромосому знаходилося по одному маркеру і на обох плечах 5-ї хромосоми - по два маркера. Всього було підібрано 12 маркерів SSLP. Різниця довжин фрагментів різних локусів становить від 15 п. н. і вище, що дозволяє легко відрізняти ці фрагменти в 4%-му агарозному гелі. Для одного з мікросателітів (5-й маркер, 3-я хромосома) не ампліфікується фрагмент, характерний для екотипу Columbia, що може бути пов'язано з делецією в хромосомі даного екотипу. В нашій роботі даний маркер використовується в якості нуль-алеля. В результаті проведених експериментів з оптимізації умов ПЛР було встановлено, що двустадійна ПЛР з використанням двох температур відпалу праймерів в кожному циклі дозволяє ефективно ампліфікувати всі розглянуті в роботі фрагменти. Визначено умови для проведення двох ПЛР-мультиплексів, кожен з яких дозволяє ампліфікувати по два фрагмента, і одного ПЛР-мультиплексу - для ампліфікації трьох маркерів. Розроблена система ДНК-маркерів може бути використана для вивчення поведінки і успадкування кожної хромосоми материнського і батьківського геномів гібридів *A. thaliana*, а також дає можливість швидко і ефективно проводити генетичний аналіз.

Для дослідження дії ПФФА на поведінку геному клітин в культурі *in vitro* ми створили модельний гібрид *A. thaliana* між екотипами Columbia и Landsberg *erecta*, хромосоми яких легко відрізняти за допомогою ДНК-маркерів. В регенерантах, отриманих з культивованих *in vitro* клітин на середовищі з додаванням ПФФА, можна було таким чином оцінити зміни по окремих локусах в кожній хромосомі та відстежити поведінку батьківських геномів. Під впливом концентрацій ПФФА 15 мг/л і вище чітко видно

інгібування поділу клітин і калюсоутворення, проте ще залишається можливою здатність до морфогенезу. Починаючи з концентрації 19 мг/л і вище, зростання калюсу різко уповільнюється або взагалі зникає, таким чином унеможлиблюється розвиток пагонів. Для подальших дослідів була вибрана концентрація 18 мг/л, оскільки в присутності такої дози дія ПФФА на поділ клітин була достатньо помітною, проте зростання калюсу і регенерація рослин пригнічувалось не повністю.

Відомо, що пара-фтор-фенілаланін (ПФФА) є однією з хімічних речовин, що впливає на мітоз та призводить до редукції числа хромосом, він є аналогом фенілаланіну і конкурує з природною амінокислотою та інтеркалюється в білки замість неї. Деякі білки, що містять ПФФА зберігають свою функцію, а інші, навпаки, стають неактивними, порушуючи функціонування всієї клітини. ПФФА є інгібітором синтезу білка, а також може безпосередньо інгібувати певні ферменти, що беруть участь в біосинтезі ароматичних амінокислот. Крім того в культивованих клітинах, оброблених ПФФА, виникає нестабільність і структурні аномалії в мітотичному веретені. Всі ці ефекти ПФФА мають пригнічувану дію на поділ клітин та сприяють проходженню аномальних мітозів. Отже, отримане гібридне насіння *A. thaliana* використовувалось у подальшому для культивування клітин *in vitro* на середовищі з ПФФА. В результаті культивування калюсу, що утворився на корневих експлантах, та регенерації з нього рослин, було отримано 20 регенерантів на середовищі з ПФФА та 20 – з контрольних чашок. Генотипування рослин за допомогою 12 SSLP маркерів показало наступні результати. Для всіх рослин, що регенерували на контрольних чашках, ампліфікувались фрагменти, характерні для обох батьківських ліній, тобто спостерігалась гетерозиготність за всіма локусами. 17 з 20 рослин, отриманих на середовищі з ПФФА, виявились також гібридними за всіма маркерами. Однак для інших трьох рослин SSLP-аналіз у шести локусах з 12-ти показав ознаки, характерні тільки для материнської або тільки для батьківської лінії. Для всіх трьох рослин відбулася втрата гетерозиготності за одними і тими ж

локусами. Ґрунтуючись на отриманих нами даних, однозначний висновок стосовно утворення дочірніх клітин в результаті мейозоподібного поділу з розходженням гомологічних хромосом, або ж звичайного мітозу з розподілом хроматид по дочірнім клітинам, вимагає подальшого аналізу ліній наступних поколінь. На нашу думку в обох випадках поясненням отримання регенерантами такого розподілу ознак від гомозиготних батьківських ліній може бути рекомбінація між двома гомологічними хромосомами.

Мітотична рекомбінація досліджена у багатьох живих організмів, включаючи вищі рослини і пов'язується з важливими аспектами стабільності геному: репарацією ДНК, хромосомними перебудовами, втратою гетерозиготності. Вона забезпечує механізм обміну гомологічними ділянками, які можуть бути розташовані як на сестринських хроматидах, так і на гомологічній хромосомі. Відомо, що більшість спонтанних кросинговерів ініціюється подвійними розривами в ланцюзі ДНК. Рекомбінаційна репарація розриву потребує матрицю-зразок, в якості якої може виступати гомологічна хромосома. В результаті, така подія може призводити до виникнення клітин з конверсією генів, або втратою однієї з алельних послідовностей в тих локусах, які беруть участь в соматичному кросинговері. Наші дані підтверджують дане припущення.

Далі особливий інтерес має бути спрямований на визначення в геномі *A. thaliana* певних сайтів рекомбінації між деякими хромосомами. З великою ймовірністю такі транслокації можуть бути генеровані через фізіологічний дволанцюговий розрив і систему репарації під час мейозу. З'ясування механізмів формування цих перебудов призведе до розуміння шляхів утворення розривів, що діють при нормальному мейозі. Субтеломерний регіон деяких хромосом *A. thaliana* містить потенційні гени та фрагменти дуплікації з інших хромосом *A. thaliana* (Heacock et al. 2004). Так, було показано, що проксимальна від центромери теломер-асоційована ділянка послідовностей 3-ї хромосоми екотипу Columbia містила два нещодавно ідентифікованих потенційних гена, а проксимальна від теломери ділянка тієї ж хромосоми мала

короткі дупліковані фрагменти з хромосом 1, 2, та 3, 3-я ж хромосома іншого екотипу - з хромосоми 5. Кожен з дуплікованих фрагментів зазнав дивергенції відносно ектопічного фрагмента. Невеликі ділянки гомологічних нуклеотидів були знайдені у фланкуючих послідовностях як у дуплікованих фрагментів, так і у відповідних ектопічних послідовностях ДНК. Структурні характеристики цих фрагментів дуплікації свідчать про те, що вони є тією ДНК, що виникає під час негомологічного з'єднання кінцевих послідовностей після репарації дволанцюгового розриву. Внаслідок інтенсивних рекомбінаційних подій субтеломерні ділянки розглядаються як найбільш еволюційно динамічні. У рослин субтеломерний гетерохроматин детально досліджений у видів, які мають невеликі, практично повністю секвеновані геноми. До них відноситься *A. thaliana*. Субтеломерні райони коротких плечей хромосом 2 та 4 у *A. thaliana* містять тандемно організовані гени рибосомної ДНК (*NOR2* і *NOR4*), ділянка *NOR2* безпосередньо прилягає до теломерного повтору. Інші вісім плечей *A. thaliana* мають невеликі субтеломерні ділянки протяжністю до 5 т.п.н., в яких відсутні повторювана ДНК та транспозони (Heacock et al. 2004).

На відміну від *A. thaliana* у складі субтеломерного гетерохроматину всіх хромосом жита, *Secale cereale*, присутні по декілька послідовностей тандемно організованих мономерів сімейств pSc200 та pSc250. Ці ланцюги характеризуються гетерогенністю внутрішньої організації, зі специфічною для кожного тяжа організацією мономерів у структури більш високого порядку. Мономери різних сімейств мають відмінні шляхи походження, а оточуюча послідовності тандемних повторів геномна ДНК представлена копіями сімейств різноманітних класів ретроелементів, які присутні також в геномах найближчих родичів жита, пшениці і ячменя.

Враховуючи вибуховий характер формування субтеломерного гетерохроматину жита (*Secale cereale*) впродовж еволюції декількома родами тандемних повторів та інтенсивністю рекомбінаційних подій,

створено досконалу модель для вивчення сегрегації гомологічних хромосом (соматичної редукції).

Каріотип жита посівного (*Secale cereale*) розглядається як один із складних рослинних геномів, хромосоми якого важко відрізнити через однаковий розмір хромосом. Одним з завдань даного дослідження було виявлення варіабельних ділянок хромосом з використанням повторюваних послідовностей ДНК в якості зондів і визначення можливості сортигу хромосом у сортів *S. cereale*. Використовувались методи: проточна цитометрія і каріотипування, сортинг хромосом, флуоресцентна гібридизація *in situ* та мікроскопія.

В результаті проведення флуоресцентної гібридизації *in situ* з клонами pSc119.2, pSc200 та pSc250 отримані сильні гібридизаційні сигнали у місці розташування субтеломер, які відповідають позитивній флуоресценції гетерохроматину С-бендів при забарвлюванні DAPI. 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, ми порівняли каріотиби трьох сортів Petkus, Imperial та Онохойская.

Показано різний розподіл повторюваних послідовностей ДНК між двома сортами жита і здатність до сортигу хромосоми 1 у жита сорту Життєдайне. Вдруге продемонстровано можливість сортувати хромосому 1R методом проточної цитометрії у жита *S. cereale*.

Дослідження виявило хромосомний поліморфізм мікросателітної послідовності GAA у сортів жита і потенційну можливість сортигу хромосом у *Secale*, і показало, що мікросателіти і класичні сателіти можуть бути використані у подальших дослідженнях, а також в селекції жита.

Результати нашого дослідження показали, що одночасне чи послідовне використання декількох молекулярно-цитогенетичних маркерів дозволяє успішно ідентифікувати хромосоми та більш точно локалізувати різні ДНК-

зонди, а також одержати додаткову інформацію про структурну організацію мітотичних хромосом рослин, зокрема сорту жита Життедайне. Значних каріотипових відмінностей досліджуваного сорту не було виявлено. Тим не менш, навіть невеликі специфічні особливості його геному можуть слугувати основою для створення каріогеномного паспорту. Такий підхід є особливо важливим для сертифікації певного генотипу жита посівного при створенні нових сортів та перевірки чистоти елітного матеріалу насіння.

На початку минулого століття неодноразово здійснювалися спроби інтегрувати корисний генетичний потенціал споріднених видів у культивовану пшеницю через міжвидову гібридизацію. У першому пшенично-житньому гібриді 30-х років виявилася гомеологічна транслокація, спонтанно залученими в яку виявилися коротке плече хромосоми жита 1R та довге плече пшеничної хромосоми 1B. Інші транслокації 1RS, виявлені пізніше, включали 1AL та 1DL хромосомні плечі замість 1BL. В цих транслокаціях спостерігали надання стійкості пшениці проти деяких хвороб, таких як мучниста цвіль, іржа листа, іржа стебла, жовта іржа, та комах: зелена блощиця та павутинний кліщ. Також, хромосомне плече 1RS поліпшує адаптацію і підвищує врожаї пшениці у певних генетичних бекграундів.

Завдяки цим цінним характеристикам транслокації 1RS інтегровані у багатьох пшеничних програмах у всьому світі. Більш ніж 300 пшеничних культиварів світу несуть одну з названих транслокацій, охоплюючи значну частину культивованої території землі. В порівнянні з іншими транслокаціями хромосомне плече 1RS найчастіший і ширше використовуємий чужорідний хроматин у пшеничних брідінгових програмах. Високе агрономічне значення цієї хромосоми підкреслює потребу в її детальному структурному і функціональному дослідженні.

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 калусних 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 Життєдайне, 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, Життєдайне, 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Зими́на, О. В., Сытник, Е. С., Парий, М. Ф., Алхимова, Е. Г. (2014). Мультиплексная полимеразная цепная реакция для генотипирования экотипов *Arabidopsis thaliana* с помощью SSLP-маркеров. *Biotechnologia Acta*, 7(4), 80-84.
2. Зімі́на, О., Парі́й, М., Алхі́мова, О. (2016). Втрата гетерозинотності окремих локусів в регенерантах *Arabidopsis thaliana*, культивованих на середовищі з пара-фтор-фенілаланіном. *Цитология и генетика*, 50(5), 17-24.
3. Зими́на, О., Сытник, Е., Вдовиченко, Ж., Парий, М., Алхимова, О. (2011). Создание трансгенных линий *Arabidopsis thaliana* для изучения явления соматической сегрегации. *Збірник наукових праць 'Фактори експериментальної еволюції організмів'*, 11, 263-268.
4. Ивантер, Э. В., Коросов, А. (2010). *Элементарная биометрия*. Петрозаводск: ПетрГУ.
5. Сиволоб, А. В., Афанасьєва, К. С. (2012). *Молекулярна організація хромосом*. Київ: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет".
6. Коряков, Д., Жимулев, И. (2009). *Хромосомы. Структура и функции*. Новосибирск: Изд-во СО РАН.
7. Загричук, О. М., Герц, А., Дробик, Н., Кунах, В. (2013). Калюсогенез та регенерація рослин *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*) у культурі *in vitro*. *Biotechnologia Acta*, 6(6), 77-85.
8. Захленюк, О., Костенюк, И. (1991). Некоторые цито- и морфогенетические эффекты пара-фторфенилаланина в культуре тканей *Nicotiana tabacum* и *Papaver bracteatum*. *Biopolym. Cell*, 7(5), 66–71.

9. Мельничук, М., Новак, Т., Кунах, В. (2003). *Біотехнологія рослин*. Київ: Вища освіта.
10. Пухальський, В. (2007). *Практикум по цитології і цитогенетикі рослин* (Учебники и учебные пособия для студентов ВУЗов вид.). (В. Пухальський, А. Соловьев, Е. Бадаева, В. Юрцев, Ред.) Москва: Колос.
11. Савінський, С., Вдовиченко, Ж., Ситник, К., Зіміна, О., Спиридонов, В., Парій, М. (2012). Аланін як індуктор соматичної сегрегації у клітинах апікальної меристеми корінців *Allium sera* L. *Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів*, 10(2), 303-310.
12. Атраментова, Л., Утєвська, О. (2007). *Статистичні методи в біології*. Харків: ХНУ ім. В. Н. Каразіна.
13. Варфоломеев, С., Ефременко, Е., Верхуша, В., Вржеш, П. (2000). Синтетические аналоги аминокислот в клетках и белках. *ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 2. ХИМИЯ*, 41(6), 352-354.
14. Константинов, А. (1971). *Мейоз*. Минск: Изд-во БГУ.
15. Akiyoshi, B., Sarangapani, K., Powers, A., Nelson, C., Reichow, S., Arellano-Santoyo, H., et al. (2010). Tension directly stabilizes reconstituted kinetochore-microtubule attachments. *Nature*, 468(7323), 576-579.
16. Albertson, D., Collins, C., McCormick, F., & Gray, J. (2003). Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet.*, 34(4), 369–376.
17. Alkhimova, O., Zimina O. (2017). Identification of Rye Chromosomes by Flow Cytogenetics. *Biopolymers and Cell*, 33(2), 116-123.
18. Alkhimova, O., & Lialiutska, T. (2008). Comparative physical mapping of rye specific chromosome regions. *Abstr. XX Intern. Congress of Genetics*, (p. 314). Berlin.

19. Alkhimova, O., Heslop-Harrison, J., Shchapova, A., Vershinin, A. (1999). Rye chromosome variability in wheat-rye addition and substitution lines. *Chromosome Research.*, 7, 205-212.
20. Alkhimova, O., Martynenko, O., Dolezel, J. (2007). Physical mapping of plant specific chromosome regions. *MEDIMOND S.r.l.*, 45-50.
21. Alkhimova, O., Mazurok, N., Potapova, T., Zakian, S., Heslop-Harrison, J., Vershinin, A. (2004). Diverse patterns of the tandem repeats organization in rye chromosomes. *Chromosoma*, 113(1), 42–52.
22. Andreieva, S., Korets, K., Skorokhod, I., Ruzhinska, O. (2017). Cytogenetic and molecular cytogenetic investigations in relapse of B-Cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytology and Genetics*, 51(3), 155-161.
23. Appels, R., Dennis, E., Smith, D., Peacock, W. (1981). Two repeated DNA sequences from the heterochromatic regions of rye *Secale cereale* chromosomes. *Chromosoma*, 84, 265–277.
24. Appels, R., Gustafson, J., May, C. (1982.). Structural variation in the heterochromatin of rye chromosomes in triticales. *Theor Appl Genet.*, 63, 235-244.
25. Atkinson, G., Franzke, C., Ross, J. (1957). Differential reaction of two varieties of sorghum to colchicine treatment. *J. Heredity*, 48, 259-264.
26. Baker, D., Jin, F., Jeganathan, K., J.M., v. D. (2009). Whole chromosome instability caused by Bub1 insufficiency drives tumorigenesis through tumor suppressor gene loss of heterozygosity. *Cancer Cell*, 16(6), 475-486.
27. Banks, P., Britten, E. J., & Byth, D. E. (1982). Heritable parafluorophenylalanine-induced aneuploidy in maize. *The Journal of Heredity*, 73, 465–466.
28. Bartoš, J., Paux, E., Kofler, R., Havránková, M., Kopecký, D., Suchánková, P., et al. (2008). A first survey of the rye (*Secale cereale*) genome composition

- through BAC end sequencing of the short arm of chromosome 1R. *BMC Plant Biol.*, 8(95), 1-12.
29. Bell, C. J., & Ecker, J. (1994). Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of Arabidopsis. *Genomics*, 19(1), 137–144.
 30. Bennett M.D. (1982). *Nucleotypic basis of the spatial ordering of chromosomes in eukaryotes and the implications of the order for genome evolution and phenotypic variation* (Genome Evolution Pub.). (F. R. Dover G.A., Ed.) London: Academic Press.
 31. Bennett, M. (1977). The time and duration of meiosis. *Phil Trans R Soc Lond B.*, 277, 201-226.
 32. Bennett, M. D., & Leitch, I. (2011). Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. *Ann Bot.*, 107(1), 467–590.
 33. Bennetzen, J., Ma, J., & Devos, K. (2005). Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Ann Bot.*, 95(1), 127-32.
 34. Bohnert, H., Nguyen, H., & Lewis, N. (2008). *Bioengineering and Molecular Biology of Plant Pathways*. Pergamon: Elsevier.
 35. Bowen, N., & Jordan, I. (2002). Transposable elements and the evolution of ukaryotic complexity. *Curr Issues Mol. Biol.*, 4(3), 65-76.
 36. Breyer, D., Kopertekh, L., & Reheul, D. (2014). Alternatives to Antibiotic Resistance Marker Genes for In Vitro Selection of Genetically Modified Plants – Scientific Developments, Current Use, Operational Access and Biosafety Considerations. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33(4), 286-330.
 37. Brooker, A. S., & Berkowitz, K. (2014). The roles of cohesins in mitosis, meiosis, and human health and disease. *Methods Mol Biol.*, 1170, 229–266.
 38. Brown, M. (1947). A case of spontaneous reduction of chromosome number in somatic tissue of cotton. *Am. J. Bot.*, 34, 384-388.

39. Brown, M., & Menzel, M. (1952). Polygenomic hybrids in *Gossypium*. III. Somatic reduction in a phenotypically-altered branch of a tree-species hexaploid. *Am. J. Bot.*, 39, 625-633.
40. Carmena, M., & Earnshaw, W. (2003). The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 4(11), 842-54.
41. Cheeseman, I. M. (2014). The Kinetochore. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6, 1-19.
42. Chen, Y., Zhang, L., Geng, Y., & Chen, Z. (2001). Meiosis-like reduction during somatic embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 37, 654-657.
43. Chen, Y., Zhang, L., Zhou, Y., Geng, Y., & Chen, Z. (2000). Inducing somatic meiosislike reduction at high frequency by caffeine in root-tip cells of *Vicia faba*. *Mutat. Res.*, 452, 67-72.
44. Cheslock, P., Kemp, B., Boumil, R., & Dawson, D. (July 2005 p.). The roles of MAD1, MAD2 and MAD3 in meiotic progression and the segregation of nonexchange chromosomes. *Nat Genet.*, 37(7), 756-60.
45. Chuan Low, B., & Gong, Z. (2006). Reporter Gene System: Green Fluorescent Protein. *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*, 67, 215-247.
46. Cimini, D. (2008). Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1786(1), 32–40.
47. Corredor, E., Lukaszewski, A., Pachón, P., Allen, D., & Naranjo, T. (2007). Terminal regions of wheat chromosomes select their pairing partners in meiosis. *Genetics*, 177(2), 699-706.
48. Cuadrado, A., Ceoloni, C., & Jouve, N. (1995). Variation in highly repetitive DNA composition of heterochromatin in rye studied by fluorescence in-situ hybridization. *Genome*, 38, 1061-1069.

49. Cui, Y., Liu, Z., Li, Y., Zhou, F., Chen, H., & Lin, Y. (2016). Application of a novel phosphinothricin N-acetyltransferase (RePAT) gene in developing glufosinate-resistant rice. *Sci Rep.*, 6(21259), 1-10.
50. de Ruijter, N., Verhees, J., van Leeuwen, W., & van der Krol, A. R. (2003). Evaluation and Comparison of the GUS, LUC and GFP Reporter System for Gene Expression Studies in Plants. *Plant Biology*, 5, 103–115.
51. d'Erfurth, I., Jolivet, S., Froger, N., Catrice, O., Novatchkova, M., & Mercier, R. (June 2009 p.). Turning meiosis into mitosis. *PLoS Biol.*, 7(6), 1-10.
52. Diao, X., Freeling, M., & Lisch, D. (2006). Horizontal Transfer of a Plant Transposon. *PLoS Biol.*, 4(1).
53. Dirks, R., van Dun, C., Reinink, K., & de Wit, J. (2003). *Rijk Zwaan Zaadteelt en Zaadhandel B.V. Патент №WO/2003/017753*.
54. Dirks, R., van Dun, K., de Snoo, C., van den Berg, M., Lelivelt, C., Voermans, W., et al. (2009). Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis. *Plant Biotechnol. J.*, 7, 837-845.
55. Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysak, M., Nardi, L., & Obermayer, R. (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Ann Bot.*, 82, 17-26.
56. Dolezel, J., & Bartos, J. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann Bot.*, 95(1), 99-110.
57. Dolezel, J., Kubaláková, M., Paux, E., Bartos, J., & Feuillet, C. (2007). Chromosome-based genomics in the cereals. *Chromosome Res.*, 15(1), 51-66.
58. Dubrova, Y., Plumb, M., Brown, J., Fennelly, J., Bois, P., Goodhead, D., & Jeffreys, A. (1998). Stage specificity, dose response, and doubling dose for mouse minisatellite germ-line mutation induced by acute radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 6251–6255.

59. Duro, E., & Marston, A. (2015). From equator to pole: splitting chromosomes in mitosis and meiosis. *Genes Dev.*, 29(2), 109-122.
60. Evtushenko, E., Levitsky, V., Elisafenko, E., Gunbin, K., Belousov, A., Šafář, J., et al. (2016). The expansion of heterochromatin blocks in rye reflects the co-amplification of tandem repeats and adjacent transposable elements. *BMC Genomics*, 1-16.
61. Feschotte, C., Jiang, N., & Wessler, S. (2002). Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat. Rev. Genet.*, 3(5), 329-341.
62. Flavell, R., Rimpau, J., & Smith, D. (1977). Repeated sequence DNA relationships in four cereal genomes. *Chromosoma*, 63, 205-222.
63. Friebe, B., & Larter, E. (1988). Identification of a complete set of isogenic wheat/rye D-genome substitution lines by means of Giemsa C-banding. *Theor Appl Genet*, 76, 473-479.
64. Gamborg, O., Miller, R., & Ojima, O. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. *EXP. CELL RES.*, 50, 151-158.
65. Geri, C., Turrini, A., Giorgetti, L., Nicoletti, E., & Ronchi, V. (1999). Genome plasticity during the acquisition of embryogenic competence. *Genome*, 42, 1134-1143.
66. Gernand, D., Rutten, T., Pickering, R., & Houben, A. (2006). Elimination of chromosomes in *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum* crosses at mitosis and interphase involves micronucleus formation and progressive heterochromatinization. *Cytogenet. Genome Res.*, 114, 169-174.
67. Giam, M., & Rancati, G. (2015). Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. *Cell Division*, 10(3), 1-12.
68. Giorgetti, L., Vergara, M. R., Evangelista, M., Lo Schiavo, F., Terzi, M., & Nuti Ronchi, V. (1995). On the occurrence of somatic meiosis in embryogenic carrot cell cultures. *Molecular and General Genetics*, 246(6), 657–662.

69. Gisler, B., Salomon, S., & Puchta, H. (2002). The role of double-strand break-induced allelic homologous recombination in somatic plant cells. *Plant J.*, 32(3), 277–284.
70. Gregan, J., Polakova, S., Zhang, L., Tolić-Nørrelykke, I., & Cimini, D. (2011). Merotelic kinetochore attachment: causes and effects. *Trends Cell Biol.*, 21(6), 374–381.
71. Harrison, C. J., Alvey, E., & Henderson, I. R. (2010). Meiosis in flowering plants and other green organisms. *J. Exp. Bot.*, 61(11), 2863–2875.
72. Hauf, S., Cole, R., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., et al. (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol.*, 161(2), 281–94.
73. Heacock, M., Spangler, E., Riha, K., Puizina, J., & Shippen, D. E. (2004). Molecular analysis of telomere fusions in *Arabidopsis*: multiple pathways for chromosome end-joining . *EMBO J.*, 23, 2304–2313.
74. Henikoff, S. (2005). Rapid Changes in Plant Genomes. *The Plant Cell*, 17(11), 2852–2855.
75. Herzig, A., Lehner, C., & Heidmann, S. (2002). Proteolytic cleavage of the THR subunit during anaphase limits *Drosophila* separase function. *Genes Dev.*, 16, 2443–2454.
76. Heslop-Harrison, J., & Bennett, M. (1990). Nuclear architecture in plants. *Trends Genet.*, 6, 401–405.
77. Hillers, K., & Villeneuve, A. (2003). Chromosome-wide control of meiotic crossing over in *C. elegans*. *Curr Biol.*, 13(18), 1641–1647.
78. Hirano, T. (2012). Condensins: universal organizers of chromosomes with diverse functions. *Genes Dev.*, 26(15), 1659–1678.

79. Horio, T., & Murata, T. (2014). The role of dynamic instability in microtubule organization. *Front Plant Sci.*, 5(511), 1-10.
80. Huskins, L. (1948). Segregation and reduction in somatic tissues I. Initial observation on *Allium sepa*. *J. Heredity*, 39, 311-326.
81. Huttly, A. (2009). Reporter genes. *Methods Mol Biol.*, 478, 39-69.
82. Ikeda-Iwai, M., Umehara, M., Satoh, S., & Kamada, H. (2003). Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 34, 107-114.
83. Ishii, T., Karimi-Ashtiyani, R., & Houben, A. (2016). Haploidization via Chromosome Elimination: Means and Mechanisms. *Annu Rev Plant Biol.*, 67, 421-38.
84. Jaspersen, S., & Winey, M. (2004). The budding yeast spindle pole body: structure, duplication, and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 20, 1-28.
85. Jefferson, R. (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep.*, 5, 387-405.
86. Jones, D. (1937). Somatic segregation and its relation to atypical growth. *Genetics*, 22, 484-522.
87. Jones, J., & Flavell, R. (1982). The mapping of highly-repeated DNA families and their relationship to C-bands in chromosomes of *Secale cereale*. *Chromosoma*, 86, 595-612.
88. Kellogg, E., & Bennetzen, J. (2004). The evolution of nuclear genome structure in seed plants. *Am. J. of Bot.*, 91, 1709-1725.
89. Kelly, A., & Funabiki, H. (2009). Correcting aberrant kinetochore microtubule attachments: an Aurora B-centric view. *Curr Opin Cell Biol.*, 21(1), 51-158.

90. King, J., & Nicklas, R. (2000). Tension on chromosomes increases the number of kinetochore microtubules but only within limits. *J Cell Sci.*, 21, 3815-3823.
91. Krenn, V., & Musacchio, A. (2015). The Aurora B Kinase in Chromosome Bi-Orientation and Spindle Checkpoint Signaling. *Front Oncol.*, 5(225), 1-16.
92. Kubalakova, M., Valarik, M., Bartos, J., Vrana, J., Cihalikova, J., Molnar-Lang, M., & Dolezel, J. (2003). Analysis and sorting of rye (*Secale cereale* L.) chromosomes using flow cytometry. *Genome*, 46, 893–905.
93. Kurihara, D., Matsunaga, S., Uchiyama, S., & Fukui, K. (2008). Live cell imaging reveals plant aurora kinase has dual roles during mitosis. *Plant Cell Physiol.*, 49(8), 1256-1261.
94. LaFave, M., & Sekelsky, J. (2009). Mitotic recombination: Why? When? How? Where? *PLoS Genet.*, 5(3), 1-2.
95. Lapitan, N., Sears, R., & Gill, B. (1988). Amplification of repeated DNA sequences in wheat 3 rye hybrids regenerated from tissue culture. *Theor Appl Genet.*, 75, 381-388.
96. Lapitan, N., Sears, R., Rayburn, A., & Gill, B. (1986). Wheat-rye translocations. *J Heredity*, 77, 415-419.
97. Lee, P., Greenwell, P., Dominska, M., Gawel, M., Hamilton, M., & Petes, T. (2009). A fine-structure map of spontaneous mitotic crossovers in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.*, 5(3), 1–16.
98. Lelley, T., Eder, C., & Grausgruber, H. (2004). Influence of 1BL.1RS wheat-rye chromosome translocation on genotype by environment interaction. *J Cereal Sci.*, 39, 313-20.
99. Li, X., & Dawe, R. (2009). Fused sister kinetochores initiate the reductional division in meiosis I. *Nat Cell Biol.*, 11, 1103–1108.

100. Li, X.-Q. (2009). Developmental and environmental variation in genomes. *Heredity*, 102, 323-329.
101. Linde-Laursen, I., & von Bothmer, R. (1988). Elimination and duplication of particular *Hordeum vulgare* chromosomes in aneuploid interspecific *Hordeum* hybrids. *Theor Appl Genet.*, 76, 897-908.
102. Lukaszewski, A. (2008). Unexpected behavior of an inverted rye chromosome arm in wheat. *Chromosoma*, 117(6), 569-578.
103. Lukaszewski, A., & Gustafson, J. (1983). Translocations and modifications of chromosomes in triticales 3 wheat hybrids. *Theor Appl Genet*, 64, 239-248.
104. Lukaszewski, A., Rybka, K., Korzun, V., Malyshev, S., Lapinski, B., & Whitkus, R. (2004). Genetic and physical mapping of homoeologous recombination points involving wheat chromosome 2B and rye chromosome 2R. *Genome*, 47, 36–45.
105. Maddox, P. S., Oegema, K., Desai, A., & Cheeseman, I. M. (2004). ‘‘Holo’’er than thou: Chromosome segregation and kinetochore function in *C. elegans*. *Chromosome Research*, 12, 641–653.
106. Mago, R., Spielmeyer, W., Lawrence, G., Ellis, J., & Pryor, A. (2004). Resistance genes for rye stem rust (SrR) and barley powdery mildew (Mla) are located in syntenic regions on short arm of chromosome 1. *Genome*, 47, 112-121.
107. Marston, A. L. (2014). Chromosome Segregation in Budding Yeast: Sister Chromatid Cohesion and Related Mechanisms. *Genetics*, 196(1), 31–63.
108. McCleery, R., Watt, T., & Hart, T. (2007). *Introduction to Statistics for Biology* (3rd edn. pub.). Boca Raton, FL: Chapman and Hall/CRC.
109. McClintock, B. (1978). Mechanisms that rapidly reorganize the genome. *Stadler Genet Symp.*, 10, 25-48.

110. McDonald, J. (2014). *Handbook of Biological Statistics* (3rd ed. pub.). Baltimore: Sparky House Publishing.
111. McKim, K., Jang, J. K., & Manheim, E. (2002). Meiotic Recombination and Chromosome Segregation in *Drosophila* Females. *Annual Review of Genetics*, 36, 205-232.
112. Mehra, P. (1986d). Induced meiotic reductions in root-tips IV. Concluding remark. *Cytologia*, 51, 467-472.
113. Mehra, P., & Dhiman, N. (1986a). Induced meiotic reduction in root-tips. I. Effect of purine derivatives. *Cytologia*, 51, 439-448.
114. Mehra, P., & Dhiman, N. (1986b.). Induced meiotic reductions in root-tips II. Effect of purine derivatives and DNA. *Cytologia*, 51, 449-456.
115. Mehra, P., Dhiman, N., & Kumari, L. (1986c). Induced meiotic reductions in root-tips III. Effect of pyrimidine derivatives, and RNA. *Cytologia*, 51, 457-466.
116. Menzel, M. (1952). Polygenomic hybrids in *Gossypium*. III. Somatic reduction in phenotypically-altered branches of a three-species hexaploid. *Am. J. Bot.*, 39, 625-633.
117. Meyer, R. E., Chuong, H., Hild, M., Hansen, C., Kinter, M., & Dawson, D. (September 2015 p.). Ipl1/Aurora-B is necessary for kinetochore restructuring in meiosis I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.*, 26(17), 2986–3000.
118. Miki, B., & McHugh, S. (2004). Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol.*, 107(3), 193-232.
119. Miller, T. (1984). The homoeologous relationship between the chromosomes of rye and wheat. Current status. *Can J Genet Cytol*, 26, 578-589.
120. Molinier, J., Ries, G., Bonhoeffler, S., & Hohna, B. (2004). Interchromatid and interhomolog recombination in *Arabidopsis thaliana*., *Plant Cell*, 16(2), 342–352.

121. Morgante, M., Hanafey, M., & Powell, W. (2002). Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, 30(2), 194-200.
122. Mudunkothge, J., & Krizek, B. (2014). The GUS reporter system in flower development studies. *Methods Mol Biol.*, 1110, 295-304.
123. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473–479.
124. Musacchio, A., & Salmon, E. D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 379-393.
125. Muscat, C., Torre-Santiago, K., Tran, M., Powers, J. A., & Wignall, S. M. (2015). Kinetochore-independent chromosome segregation driven by lateral microtubule bundles. *eLife*, 4, 1-24.
126. Nicklas, R. (1997). How cells get the right chromosomes. *Science*, 275, 632–637.
127. Nicklas, R., Ward, S., & Gorbsky, G. (1995). Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint. *J. Cell Biol.*, 130, 929–939.
128. Niizeki, H., & Fukui, K. (1978). Somatic reduction of chromosome number in wild rice, *Oryza alta* (CCDD species) following treatment with parafluorophenylalanine. *Japanese J. Breeding*, 28(2), 188–189.
129. Niizeki, H., & Fukui, K. (1983). Elimination of somatic chromosomes in strawberry plants by treatment with para-fluorophenylalanine. *Japan J. Breed.*, 33(1), 55–61.
130. Nogales, E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem.*, 69, 277-302.
131. Otto, S., & Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.*, 34, 401-437.

132. Palmer, J. E., & Widholm, J. (1975). Characterization of Carrot and Tobacco Cell Cultures Resistant to p-Fluorophenylalanine. *Plant Physiology*, 56, 233-238.
133. Peplowska, K., Wallek, A., & Storchova, Z. (2014). Sgo1 Regulates Both Condensin and Ipl1/Aurora B to Promote Chromosome Biorientation. *PLoS Genet.*, 10(6), 1-14.
134. Peters, J.-M., & Hauf, S. (2006). Meiosis and Mitosis: Molecular Control of Chromosome Separation. *eLS.*, 1-7.
135. Pezza, R. J. (2015). Mechanisms of chromosome segregation in meiosis – new views on the old problem of aneuploidy. *FEBS Journal*, 282(13), 2424–2425.
136. Puchta, H., & Hohn, B. (2012). *In planta* somatic homologous recombination assay revisited: a successful and versatile, but delicate tool,. *Plant Cell*, 24(11), 4324–4331.
137. Röder, M., Plaschke, J., König, S., Börner, A., Sorrells, M., Tanksley, S., & Ganal, M. (1995). Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.*, 246, 327-333.
138. Rakoczy-Trojanowska, M., & Bolibok, H. (2004). Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 9(2), 221-238.
139. Rana, R. (1965). Somatic reduction in an intervarietal hybrid of chrysanthemum. *Japan. J. Genetics*, 40, 199-201.
140. Ronchi, V., Giorgetti, L., Tonelli, M., & Martini, G. (1992). Ploidy reduction and genome segregation in cultured carrot cell lines. I. Prophase chromosome reduction. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 30(2), 107–114.
141. Ronchi, V., Giorgetti, L., Tonelli, M., & Martini, G. (1992). Ploidy reduction and genome segregation in cultured carrot cell lines. II. Somatic meiosis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 30(2), 115-119.

142. Rosellini, D. (2012). Selectable Markers and Reporter Genes: A Well Furnished Toolbox for Plant Science and Genetic Engineering. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(5), 401-453.
143. Ruchaud, S., Carmena, M., & Earnshaw, W. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 798-812.
144. Ruvalcaba-Ruiz, D., Palomino, G., Martinez, J., Mendez, I., & Rodriguez-Garay, B. (2012). In vitro induction of a trisomic of Agave tequilana Weber var. Azul (Agavaceae) by para-fluorophenylalanine treatment. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 48(1), 144–152.
145. Sakuno, T., Tada, K., & Watanabe, Y. (2009). Kinetochore geometry defined by cohesion within the centromere. *Nature* :, 458, 852–858.
146. Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
147. Sanders, M., & Franzke, C. (1962). Somatic reduction of tetraploid sorghum to diploid mutants following colchicine treatment. *Nature*, 196, 696-698.
148. Sanei, M., Pickering, R., Kumke, K., Nasuda, S., & Houben, A. (2011). Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids . *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 108(33), 498-505.
149. Sarangapani, K., Akiyoshi, B., Duggan, N., Biggins, S., & Asbury, C. L. (April 2013 p.). Phosphoregulation promotes release of kinetochores from dynamic microtubules via multiple mechanisms. *PNAS*, 110(18), 7282–7287.
150. Sattler, M., Carvalho, C., & Clarindo, W. (2016). The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, 243(2), 281–296.
151. Schuermann, D., Molinier, J., Fritsch, O., & B., H. (2005). The dual nature of homologous recombination in plants. *Trends Genet.*, 21(3), 172-81.

152. Schvartzman, J., Sotillo, R., & Benezra, R. (February 2010 p.). Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nat Rev Cancer*, 10(2), 102-15.
153. Schwarzscher, T., & Heslop-Harrison, J. (2000). *Practical in situ hybridization*. Oxford: BIOS.
154. Sept, D. (2007). Microtubule Polymerization: One Step at a Time. *Current Biology*, 17(17), R764–R766.
155. Shaner, N., Lin, M., McKeown, M., & Steinbach, P. H. (2008). Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat Methods.*, 5(6), 545-551.
156. Sharma, S., & Raina, S. (2005). Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes. *Cytogenet Genome Res.*, 109, 15-26.
157. Shchapova, A. (1971). On the karyotype pattern and the chromosome arrangement in the interphase nucleus. *Tsitologia*, 13, 1157-1164.
158. Shcherban, A. (2015). Repetitive DNA sequences in plant genomes. *Russ J Genet Appl Res*, 5(3), 159-167.
159. Simantel G.M., R. J. (1963). Colchicine-induced somatic chromosome reduction in sorghum II. Induction of plants homozygous for structural chromosome markers originally heterozygous in two pairs. *J. Heredity*, 54, 221-228.
160. Simantel, G., & Ross, J. (1963). Colchicine-induced somatic chromosome reduction in sorghum III. Induction of plants homozygous for structural chromosome markers in four pairs. *J. Heredity*, 54, 277-284.
161. Siskens, J., Stivens, E., & Donally, G. (1972). Effects of p-dl-fluorophenylalanine on mitosis and the mitotic spindle. *Experimental Cell Research*, 73(1), 25-32.

162. Snapp, E. L. (2009). Fluorescent Proteins: A Cell Biologist's User Guide. *Trends Cell Biol.*, 19(11), 649–655.
163. Stallings, R. (2007). Are chromosomal imbalances important in cancer? *Trends Genet.*, 23, 278–283.
164. Stevens, D., Gassmann, R., Oegema, K., & Desai, A. (2011). Uncoordinated loss of chromatid cohesion is a common outcome of extended metaphase arrest. *PLoS ONE*, 6(8), 1-13.
165. Stockwell, V., & Duffy, B. (2012). Use of antibiotics in plant agriculture. *Rev Sci Tech.*, 31(1), 199-210.
166. Storey, W. (1968). Somatic reduction in cycads. *Science*, 159, 648-650.
167. Sundar, I., & Sakthivel, N. (2008). Advances in selectable marker genes for plant transformation. *Journal of Plant Physiology*, 165(16), 1698—1716.
168. Svitashhev, S., Vershinin, A., Trunova, S., Pershina, L., & Shumny, V. (1995). Molecular analysis of the genomes of wide hybrids in cereals. *Hereditas*, 122, 25-31.
169. Sybenga, J. (1983). Rye chromosome nomenclature and homoeology relationships. *Z Pflanzenzuchtg*, 90, 297–304.
170. Sybenga, J. (2000). Somatic segregation in rice. *Genome*, 43(4), 720-722.
171. Sytnyk, K., Zimina, O., Vdovychenko, Z., Spyrydonov, V., Melnychuk, M., & Parii, M. (2012). Somatic segregation: genetic evidences, consequences and applications. *Acta Hort.*, 961, 495– 502.
172. Taketa, S., Kato, J., & Taketa, K. (1995). High crossability of wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) with bread wheat and the differential elimination of barley chromosomes in the hybrids. *Theor Appl Genet.*, 91, 1203-1209.
173. Tanaka, T. (2010). Kinetochore–microtubule interactions: steps towards bi-orientation. *EMBO J.*, 29, 4070-4082.

174. Tautz, D., Trick, M., & Dover, G. (1986). Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, 322(6080), 652-656.
175. Thompson, S. L., & Compton, D. A. (2011). Chromosome missegregation in human cells arises through specific types of kinetochore-microtubule attachment errors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(44), 17974-8.
176. Umbreit, N., Gestaut, D., Tien, J., Vollmar, B., Gonen, T., Asbury, C., & Davis, T. (2012). The Ndc80 kinetochore complex directly modulates microtubule dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(40), 16113-16118.
177. Valárik, M., Bartos, J., Kovárová, P., Kubaláková, M., de Jong, J., & Dolezel, J. (2004). High-resolution FISH on super-stretched flow-sorted plant chromosomes. *Plant J.*, 37(6), 940-950.
178. Vanrobays, E., Thomas, M., & Tatout, C. (2013). Heterochromatin Positioning and Nuclear Architecture. y D. E. Evans, K. Graumann, & J. A. Bryant, *Annual Plant Reviews: Plant Nuclear Structure, Genome Architecture and Gene Regulation* (T. 46, cc. 157-190). Oxford, UK: Wiley & Sons Ltd.
179. Vergnaud, G., & Denoeud, F. (2000). Minisatellites: Mutability and Genome Architecture. *Genome Research.*, 10, 899-907.
180. Vershinin, A. (2006). Epigenetics of Specific Chromosome Regions. *Russian Journal of Genetics*, 42(9), 998-1010.
181. Vershinin, A., & Heslop-Harrison, J. (1998). Comparative analysis of the nucleosomal structure of rye, wheat and their relatives. *Plant Mol Biol.*, 36, 149–161.
182. Vershinin, A., Alkhimova, E., & Heslop-Harrison, J. (1996). Molecular diversification of tandemly organized DNA sequences and heterochromatic chromosome regions in some *Triticeae* species. *Chromosome Res.*, 4, 517–525.

183. Vershinin, A., Alkhimova, O., Heslop-Harrison, J., Potapova, T., & Omelianchuk, N. (2001). Different patterns in molecular evolution of the *Triticeae*. *Hereditas*, 135, 153-60.
184. Vershinin, A., Salina, E., & Svtashev, S. (1992). Is there a connection between genomic changes and wide hybridization? *Hereditas*, 116, 213-217.
185. Vershinin, A., Schwarzacher, T., & Heslop-Harrison, J. (1995). The large-scale organization of repetitive DNA families at the telomeres of rye chromosomes. *Plant Cell*, 7, 1823-1833.
186. Verzijlbergen, K., Nerusheva, O., Kelly, D., Kerr, A., Clift, D., de Lima Alves, F., et al. (2014). Shugoshin biases chromosomes for biorientation through condensin recruitment to the pericentromere. *elife*, 3:e01374, 1-26.
187. Vorozhko, V., Emanuele, M., Kallio, M., Stukenberg, P. T., & Gorbsky, G. (2008). Multiple mechanisms of chromosome movement in vertebrate cells mediated through the Ndc80 complex and dynein/dynactin. *Chromosoma*, 117(2), 169-179.
188. Vrána, J., Cápál, P., Cíhalíková, J., Kubaláková, M., & Doležel, J. (2016). Flow Sorting Plant Chromosomes. *Plant Cytogenetics*, 1429, 119-34.
189. Vrana, J., Kubalakova, M., Simkova, H., Cihalikova, J., Lysak, M., & Dolezel, J. (2000). Flow-sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics*, 156, 2033-2041.
190. Walczak, C., Cai, S., & Khodjakov, A. (2010). Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11, 91-102.
191. Wang, C., Ho, C., Hseu, M., & Chen, C. (2010). The subtelomeric region of the *Arabidopsis thaliana* chromosome IIIR contains potential genes and duplicated fragments from other chromosomes. *Plant Mol. Biol.*, 74(1-2), 155-166.

192. Wang, D., Guo, Y., Wu, C., Yang, G., Li, Y., & Zheng, C. (2008). Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in *Arabidopsis* and rice. *BMC Genom.*, 9, 44.
193. Wang, R.-C., Li, X.-M., & Chatterton, N. (1999). Loss of heterozygosity and accelerated genotype fixation in rice hybrids. *Genome*, 42(5), 789–796.
194. Wang, R.-C., Li, X.-M., & Chatterton, N. (2001). A proposed mechanism for loss of heterozygosity in rice hybrids. *Euphytica*, 118, 119-126.
195. Wang, R.-C., Li, X.-M., & Chatterton, N. (2006). Cytological evidence for assortment mitosis leading to loss of heterozygosity in rice. *Genome*, 49, 556-557.
196. Weaver, B., & Cleveland, D. (2006). Does aneuploidy cause cancer? *Curr Opin Cell Biol.*, 18(6), 658-67.
197. Welburn, J., Vleugel, M., Liu, D., Yates, J. R., Lampson, M. A., Fukagawa, T., & Cheeseman, I. (2010). Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Mol Cell.*, 38(3), 383–392.
198. Wijnker, E., & Schnittger, A. (2013). Control of the meiotic cell division program in plants. *Plant Reprod.*, 26(3), 143–158.
199. Wittmann, T., Hyman, A., & Desai, A. (2001). The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat Cell Biol.*, 3(1), 28-34.
200. Wolfe, K. (2001). Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nat. Rev. Genet.*, 2, 333-341.
201. Yanagida, M. (March 2005 p.). Basic mechanism of eukaryotic chromosome segregation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360(1455), 609-621.
202. Yousafzai, F., Al-Kaff, N., & Moore, G. (2010). The molecular features of chromosome pairing at meiosis: the polyploid challenge using wheat as a reference. *Functional & Integrative Genomics*, 10(2), 147–156.

203. Yun, C., Hasegawa, H., Nanamiya, H., Terakawa, T., & Tozawa, Y. (2009). Novel bacterial N-acetyltransferase gene for herbicide detoxification in land plants and selection marker in plant transformation. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 73(5), 1000-6.
204. Zamariola, L., Tiang, C., De Storme, N., Pawlowski, W., & Geelen, D. (2014). Chromosome segregation in plant meiosis. *Front Plant Sci.* 279, 5(279), 1-19.
205. Zhang, X., Henriques, R., S.S., L., Niu, Q., & Chua, N. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, 1(2), 641-646.
206. Ziemienowicz, A. (2001). Plant selectable markers and reporter genes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 23(3), 363–374.
207. Zimina, O., Parii, M., & Alkhimova, O. (2016). Loss of heterozygosity at individual loci in *Arabidopsis thaliana* regenerants cultured with para-fluorophenylalanine. *Cytology and Genetics*, 50(5), 278–284.
208. Zimina, O., Sytnik, E., Parii, M., & Alkhimova, O. G. (2011). Study of somatic segregation in *Arabidopsis cells* cultured in vitro. *Biopolymers & Cell*, 27(4), 327.
209. Zimina, O., Vorobiova, I., Voloshchuk, T., Zaika, L., & Alkhimova, O. (2012). DMSO and izatizon contribute to plant immunity. *Mater. online XVI Intern. Sci. Pract. Conf. 'Problems and ways of modern public health development'*, 187-188.