

ВТРАТА ГЕТЕРОЗИГОТНОСТІ ОКРЕМИХ ЛОКУСІВ В РЕГЕНЕРАНТАХ *ARABIDOPSIS THALIANA*, КУЛЬТИВОВАНИХ НА СЕРЕДОВИЩІ З ПАРА-ФТОР-ФЕНІЛАЛАНІНОМ

О.В. ЗІМІНА¹, М.Ф. ПАРІЙ², О.Г. АЛХІМОВА¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ
E-mail: come2olya@gmail.com

² Національний університет біоресурсів і природокористування, Київ

Точна сегрегація хромосом є життєво важливою для видоутворення і формування гібридів. Метою роботи було дослідження поведінки й успадкування хромосом материнського і батьківського геномів в регенерантах арабідопсису, отриманих з культивованих *in vitro* клітин на середовищі з пара-фтор-фенілаланіном (ПФФА). Для цього використовували модельний гібрид *Arabidopsis thaliana* між екотипами *Columbia* і *Landsberg erecta*, хромосоми яких легко відрізняти за допомогою 12 підібраних SSLP-маркерів. В результаті роботи проаналізовано вплив ПФФА на калюсоутворення і регенерацію рослин. Отримано 20 регенерантів, культивованих на середовищі з ПФФА, з яких у трьох рослин аналіз за ДНК-маркерами показав втрату гетерозиготності в шести локусах. Для розуміння того, як і коли встановлюються механізми, що приводять до належного розподілу хромосом у видів і гібридів, необхідно дослідження різних моделей організмів.

Ключові слова: екотипи *Arabidopsis thaliana*, пара-фтор-фенілаланін, втрата гетерозиготності, SSLP-маркери, хромосомні локуси.

Вступ. Дослідженню процесів, які призводять до гаплоїдизації і/або гомозиготації геному в соматичних клітинах рослин, культивованих *in vitro*, приділяють велику увагу вже впродовж декількох десятиліть. З практичної точки зору з цих клітин отримують дорослі рослини та гомозиготні лінії. Відомо, що зменшення числа хромосом в соматичних клітинах відбувається спонтанно при культивуванні *in vitro* або при дії різних хімічних індукторів на рослинні тканини [1]. 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 [2]. Наслідком тако-

го явища може бути втрата гетерозиготності окремих локусів або повна гомозиготація [3, 4]. Відомо, що однією з хімічних речовин, яка може впливати на мітоз та призводити до редукції числа хромосом, є пара-фтор-фенілаланін (ПФФА) — аналог фенілаланіну, який конкурує з природною амінокислотою та інтеркалюється в білки замість неї [5]. 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 оброблених ПФФА культивованих клітинах виникає деяка нестабільність і структурні аномалії в мітотичному веретені. Всі ці ефекти ПФФА мають пригнічувальну дію на поділ клітин та сприяють проходженню аномальних мітозів. Так, під дією ПФФА на вищі рослини були помічені зміни плоідності геному або зменшення числа хромосом, що призводило до гаплоїдизації або анеуплоїдії [6]. Результати досліджень в даній області в основному ґрунтувалися 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 якою є генетична конституція цих рослин в порівнянні з вихідною. Для дослідження дії ПФФА на організацію та поведінку клітин в культурі *in vitro* нами створено модельний гібрид *Arabidopsis thaliana* між екотипами *Columbia* і *Landsberg erecta* [7], хромосоми яких легко відрізняти за допомогою

© О.В. ЗІМІНА, М.Ф. ПАРІЙ, О.Г. АЛХІМОВА, 2016

ДНК-маркерів [8]. В регенерантах, отриманих з культивованих *in vitro* клітин на середовищі з додаванням ПФФА, можливо таким чином оцінити зміни за окремими локусами в кожній хромосомі та відстежити поведінку батьківських геномів.

Матеріали і методи. Підбір концентрації ПФФА для калюсоутворення та регенерації. На даному етапі вивчали вплив ПФФА на утворення калюсу в культурі клітин *A. thaliana*, культивованих *in vitro* на живильних середовищах, а також на регенераційну здатність калюсу в присутності різних концентрацій ПФФА. Для експерименту використовувалися лінії *A. thaliana* еко типу Landsberg *erecta* (№ 1298, NASC) і Columbia (№ 1093, NASC). Насіння стерилізували 2 хв в 70 % ЕтОН, потім 10 хв у розчині «Білизни» (1:2) і промивали 5–6 разів у стерильній дистильованій воді. Пророщування відбувалось в умовах 16-годинного світлового періоду. Для індукції калюсу на кореневих експлантах використовували живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС) з додаванням фітогормонів за методикою Chen et al. [9]. Була перевірена лінійка концентрацій, мг/л: 1 – 5 – 10 – 15 – 17 – 18 – 19 – 20 – 25 – 50. Як контроль використовували середовище без ПФФА. Частоту утворення калюсу для обох еко типів визначали як співвідношення кількості експлантів, що продукують калюс, до загальної кількості висаджених експлантів. Експеримент проводився в трьох повторностях. Графік залежності частоти калюсоутворення від концентрацій ПФФА будувався за допомогою програм Excel та PAST3 з використанням поліноміального регресійного аналізу [10, 11]. Надійність регресійної моделі визначали за коефіцієнтом кореляції R та критерієм Фішера [11], достовірність отриманих результатів вважали статистично значимими за $P \leq 0,05$.

Створення гібридів та отримання регенерантів. З метою створення модельного гібриду були використані трансгенні лінії *A. thaliana* еко типу Landsberg *erecta* та Columbia [7]. Для гібридизації використовували лінію Columbia зі стійкістю до канаміцину і лінію Landsberg *erecta* зі стійкістю до фосфінотрицину. Щоб вирівняти темпи росту проростків перед посівом, проводили яровизацію насіння протягом двох діб при температурі 4–6 °С. Проростки вирощували в умовах закритого ґрунту (рН 5,6–5,8) і 16-годинного світлового періоду. Кастрацію і примусову гібридизацію здійснювали під бінокулярним мікроскопом.

Стерилізоване насіння висівали на агаризоване середовище МС з додаванням 25 мг/л канаміцину і 7,5 мг/л фосфінотрицину (РРТ), щоб відібрати гібридне насіння. Пророщували в умовах 16-годинного світлового періоду в стерильних умовах при температурі 24 °С. Відібрані гібриди вводили в культуру за протоколом Chen et al. [9] 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 1 мг/л індоліл-масляної кислоти без ПФФА. Підрошені рослини збирали для виділення ДНК.

Цитологічні спостереження. 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-diamidino-2-phenylindole). Давлені препарати переглядали під флуоресцентним мікроскопом Carl Zeiss Axio Scope A.1 з фільтром для DAPI. Достовірність відмінностей між дослідними варіантами і контролем для мітотичного індексу (МІ) визначали за методом χ^2 , а для частоти мейозоподібних поділів за точним критерієм Фішера [10, 11].

Аналіз геномів за допомогою SSLP-маркерів. Послідовності праймерів для SSLP аналізу, інформація про умови реакції ПЛР, а також розміри відповідних поліморфних фрагментів для кожного з розглянутих еко типів встановлено раніше [8]. Всього було підібрано 12 маркерів SSLP: для 1–4-ї хромосом по одному маркеру на кожне плече і для 5-ї хромосоми – по два маркери на плече. Для одного з мікросателітів (5-й маркер, хромосома 3) не ампліфікується фрагмент, характерний для еко типу Columbia, що може бути пов'язано з делецією в хромосомі даного еко типу. В нашій роботі цей маркер використовувався як нуль-алель. Тотальну

ДНК для проведення реакції ПЛР виділяли з рослинних тканин методом СТАБ [12]. Якість і концентрацію ДНК визначали на спектрофотометрі SPECTRA max PLUS384.

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті досліджень визначено оптимальну концентрацію ПФФА для подальшого експерименту з культивування гібридів *A. thaliana*. Грунтуючись на даних по культивуванню тканин інших рослин [13], перевірили лінійку концентрацій від 1 до 50 мг/л (рис. 1). На 7-й день в контролі без ПФФА на всіх експлантах утворився жовтуватий калюс. ПФФА на середовищі з низькими концентраціями (1, 5, 10 мг/л) не чинив видимої негативної дії на зростання калюсу і розвиток пагонів. Частота утворення калюсу не відрізнялась від контролю і дорівнювала 100 %, проте з концентраціями 20, 25, 50 мг/л експланти білішали, калюс майже не утворювався і як наслідок не відбувалась регенерація. На чашках з 15 мг/л ПФФА калюс утворювався повільніше, ніж на чашках з контролем, з частотою близько 80 %. Нами перевірено ще дві концентрації між 15 та 20 мг/л, щоб визначити максимальну дозу ПФФА, яка має видимий ефект на поділ клітин, але при якій ще можлива регенерація рослин. Чашки з ПФФА в концентраціях 17 та 18 мг/л показали частоту калюсоутворення на рівні 60 та 47 % відповідно (табл. 1).

Під час культивування експлантів на середовищі з ПФФА відбувалось зменшення росту калюсу в залежності від концентрації ПФФА.

Таким чином, під впливом ПФФА у дозах 15 мг/л і вище чітко видно інгібування поділу клітин і утворення калюсу, але ще можливою

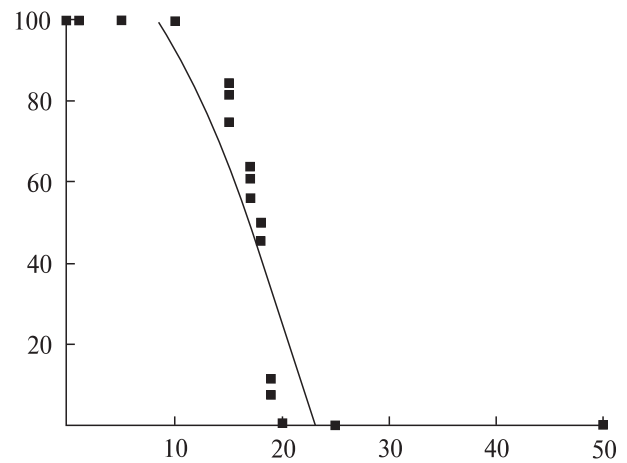


Рис. 1. Вплив ПФФА (по горизонталі – концентрація, мг/л) на частоту утворення калюсу корневих експлантів *A. thaliana* (по вертикалі, %). Поліноміальна крива 3-го порядку, $R^2 = 0,89$, $F = 86,5$, $P < 0,01$

залишається здатність до морфогенезу. Починаючи з концентрації 19 мг/л, зростання калюсу різко уповільнюється або взагалі зникає, таким чином унеможливується розвиток пагонів. Для подальших дослідів вибрали концентрацію 18 мг/л (рис. 2), оскільки в присутності такої дози дія ПФФА на поділ клітин була достатньо помітною, проте зростання калюсу і регенерація рослин пригнічувались не повністю.

Отримане гібридне насіння арабідопсису використовували для культивування рослин на середовищі з ПФФА. Щоб уникнути помилкового самозапилення, для гібридизації використали трансгенні лінії Columbia і Landsberg *erecta* [7]. Оскільки вони мають селективний

Таблиця 1. Вплив ПФФА на частоту утворення калюсу та регенерацію пагонів

Концентрація ПФФА, мг/л	Кількість експлантів, шт.		Частота утворення калюсу		Кількість експлантів з пагонами, шт.		Частота регенерації	
	всього	з калюсом	%	± Sp	всього	пагонів	%	± 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. Таблиця поєднує дані трьох незалежних експериментів, Sp – похибка частки.

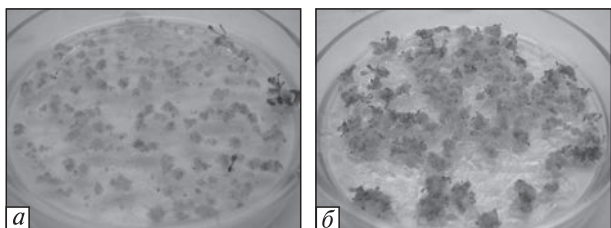


Рис. 2. Регенерація пагонів з калюсу на культивованому середовищі з ПФФА 18 мг/л (а) та в контролі (б)

ген стійкості до канаміцину та PPT, це дозволило за допомогою додавання в живильне середовище відповідних селективних чинників відібрати гібридні рослини, тобто ті, що перекресно запилились і мають маркерні гени. В результаті культивування калюсу, що утворився на кореневих експлантах, та регенерації з нього пагонів отримали 20 регенерантів на середовищі з ПФФА в концентрації 18 мг/л та 20 – з контрольних чашок. Генотипування рослин за допомогою 12 SSLP-маркерів показало результати, наведені у табл. 2.

Для всіх рослин, що регенерували на контрольних чашках, ампліфікувались фрагменти, характерні для обох батьківських ліній, тобто спостерігалась гетерозиготність за всіма досліджуваними локусами. З 20 рослин, отриманих на середовищі з ПФФА, 17 виявились також гібридними за всіма маркерами. Однак для інших трьох рослин SSLP-аналіз за шістьма локусами з 12 показав ознаки, характерні тільки для материнської або тільки для батьківської ліній. Для всіх трьох рослин відбулася втрата гетерозиготності за одними й тими ж локусами, причому за 1, 3, 4, 11, 12-м маркерами за-

значається однакова належність локусу до батьківського екотипу Columbia, а за 2-м – до материнського Landsberg *erecta* (рис. 3). Цей збіг можна пояснити тим, що клони виникли з однієї клітини-попередника, яка набула іншу генотипову конституцію, що відмінна від вихідних рослин, гібридних за всіма локусами.

Відомо, що під впливом ПФФА на мітоз клітин в культурі *in vitro* відбувається втрата хромосом, або гаплоїдизація [5, 6], що може бути причиною втрати генетичного матеріалу одної з батьківських ліній. Аналіз розподілу алелів по хромосомах *A. thaliana* показав, що гомозиготація локусів на обох плечах за материнським генотипом Columbia відбулась тільки для 2-ї хромосоми – локуси 3 та 4 (рис. 4). Можна було б вважати гомологічну батьківську хромосому від Ler втраченою, а отримані рослини – анеуплоїдами, але для доказів відсутності цілої хромосоми необхідно провести цитофлуорометричний аналіз. В той же час 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 бачимо фрагменти тільки від генотипу Columbia, а локуси 9 та 10 залишилися гетерозиготними. У випадку 1-ї хромосоми на одному плечі отримали фрагмент від лінії Columbia (локус 1), на іншому – від Ler (локус 2). Аналогічне явище – гомозиготацію у пагонів рису спостерігали й інші дослідники [3, 4]. Автори схиляються до того, що пагони, у яких виявлена втрата гетерозиготності окремих локусів, з'явилися внаслідок асортативного мітозу або сегрегації гомологічних хромосом в ме-

Таблиця 2. Генотипування регенерантів за допомогою SSLP-маркерів

Варіант	1-а хромосома		2-а хромосома		3-я хромосома		4-а хромосома		5-а хромосома			
									коротке плече		довге плече	
	Маркер											
	1	2	3	4	5 *	6	7	8	9	10	11	12
Контроль, 20 рослин	Col/ Ler	Col/ Ler	Col/ Ler	Col/ Ler	Ler	Col/ Ler	Col/ Ler	Col/ Ler	Col/ Ler	Col/ Ler	Col/ Ler	Col/ Ler
ПФФА 18 мг/л, 3 рослини	Col	Ler	Col	Col	Ler	Col/ Ler	Col/ Ler	Col/ Ler	Col/ Ler	Col/ Ler	Col	Col

Примітка. Col – алель від екотипу Columbia, Ler – алель від екотипу Landsberg *erecta*. * Нуль-алель.

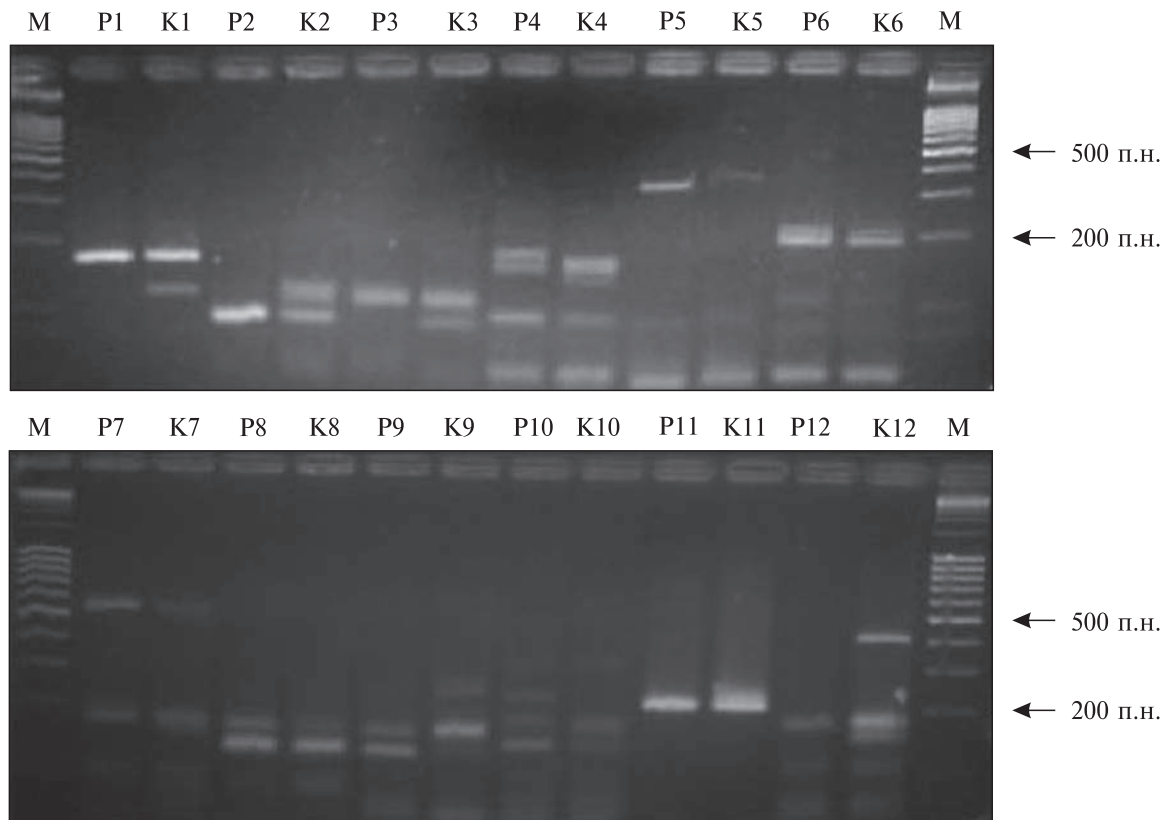


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації з праймерами до послідовностей маркерних локусів: М – маркер MassRuler™ #SM0304, Р – регенерант, К – контроль, 1–12 – маркерні локуси

ристематичних клітинах. В результаті цього кожна клітина отримала по одному з гомологів батьківських ліній, що і призвело до гомозиготації локусів. Італійські вчені в своїх роботах по культивуванню *in vitro* клітин моркви також пов'язують випадки гомозиготації з аналогічним явищем хромосомної сегрегації та мейозоподібними поділами в культивованих *in vitro* клітинах моркви [2]. Свої припущення во-

ни підтверджують цитологічним аналізом поділу клітин моркви, який виявляв фігури, схожі на перший поділ мейозу. Аналогічна цитологічна картина відображена у роботі по культивуванню калюса арабідопсису на середовищі С-1 [9]. Спостерігали до 3,2 % гаплоїдних клітин, до 7,3 % випадків так званого редукційного групування хромосом (somatic chromosome reductional grouping), а також клітини з сома-

Таблиця 3. Результати порівняльного цитологічного аналізу калюсних клітин в контролі та експерименті

Тканина	Кількість, шт.		Мітотичний індекс		Клітини з мейозоподібними поділами, шт.	Частота мейозоподібних поділів	
	клітин	поділів	%	± Sp		%	± 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**	0,9

Примітка. Sp – похибка частки. * За критерієм χ^2 $P < 0,05$; ** За точним критерієм Фішера $P < 0,05$.

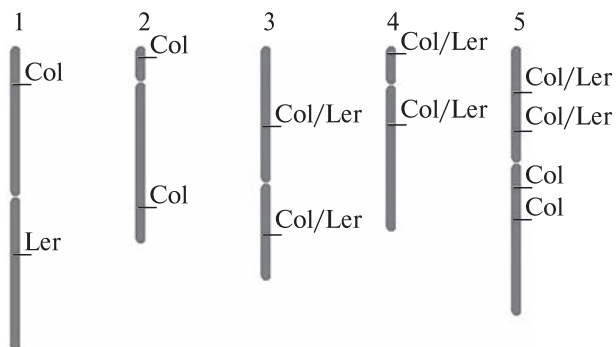


Рис. 4. Розподіл SSLP маркерів по хромосомах 1–5 в результаті гомозиготації окремих локусів

тичним мейозом. В наших експериментах цитологічний аналіз клітин арабідопсису, культивованих на середовищі С-1 без ПФФА, показав 1,9 % клітин та 2,0 % на середовищі з ПФФА, які можна віднести до досліджуваного явища (табл. 3).

Зростання МІ в калюсних клітинах порівняно з інтактною рослиною слід очікувати внаслідок дії фітогормонів і постійної проліферації клітин. Із додаванням ПФФА в концентрації 18 мг/л зменшувалася кількість проаналізованих анафаз у зв'язку із значним зниженням кількості мітозів в клітинах. Зниження МІ під впливом ПФФА скоріше відбувалось внаслідок його цитостатичної дії на клітини.

Ми спостерігали бівалентоподібні структури, число яких дорівнювало п'яти, що відповідає числу бівалентів в мейозі у арабідопсису ($n = 5$), а також анафазні клітини з групами, в яких можна припустити розходження хромосом по 5, а не по 10, як має бути в мітозі у арабідопсису ($2n = 10$) (рис. 5).

При цитогенетичному аналізі точний підрахунок числа хромосом арабідопсису вельми проблематичний через їхній малий розмір. Подібні труднощі можуть призводити до викривлення реальної ситуації при інтерпретації спостережуваних фігур. Так, китайські дослідники [9] прямо говорять про те, що вони не змогли оцінити кількість клітин з соматичним мейозом і свої статистичні дані засновували на кількості гаплоїдних клітин та клітин з редуційним групуванням хромосом.

Грунтуючись на отриманих нами даних, достатньо складно однозначно сказати, яким чином поділилася клітина-попередник: чи відбувся в ній мейозоподібний поділ з розходженням гомологічних хромосом, або ж пройшов звичайний мітоз з розподілом хроматид дочірніми клітинами. На нашу думку в обох випадках поясненням отримання регенерантів такого розподілу ознак від гомозиготних батьківських ліній може бути рекомбінація між двома гомологічними хромосомами.

Мітотична рекомбінація досліджена у багатьох живих організмів [14, 15], включаючи вищі рослини [16], і пов'язується з важливими аспектами 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 [17]. Відомо, що більшість спонтанних кросинговерів ініціюються подвійними розривами в ланцюзі ДНК [15, 18]. Рекомбінаційна репарація розриву потребує матрицю-зразок, якою може висту-

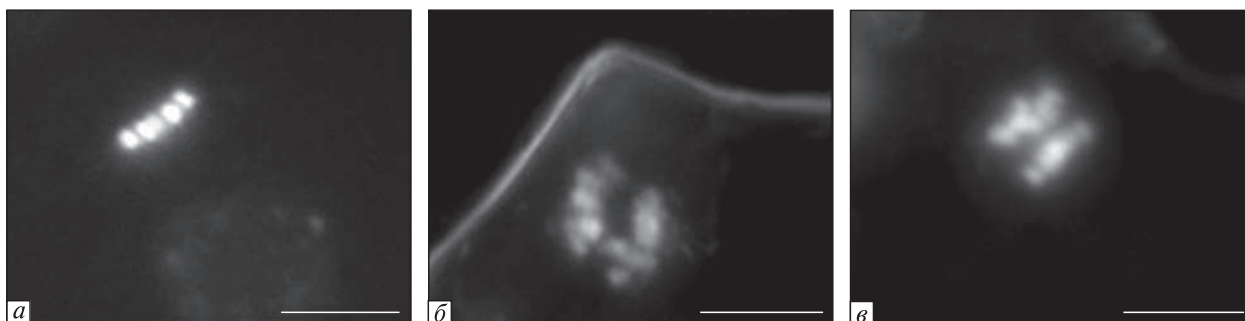


Рис. 5. Цитологічний аналіз препаратів хромосом калюсних клітин, культивованих на середовищі з ПФФА: а – метафаза з бівалентоподібними структурами і числом хромосом $n = 5$; б, в – клітини на стадії анафазі з удвічі зменшеним числом хромосом. Масштаб – 5 мкм

пати гомологічна хромосома. В результаті така подія може призводити до виникнення клітин з конверсією генів або втратою однієї з алельних послідовностей в локусах, що беруть участь в соматичному кросинговері [15]. Наші дані підтверджують дану теорію.

Гетерозиготність локусів 6–10 свідчить про факт наявності генетичного матеріалу одночасно як від материнської, так і від батьківської ліній. Так, якщо припустити випадок мейозоподібного поділу з розходженням гомологів, то цей факт може свідчити про рекомбінації між хромосомами. У випадку ж мітозу втрата одного алеля в локусах 1–4 та 11, 12 і одночасною наявністю алелів від обох батьків в інших локусах, очевидно, також потребує перебудов в хроматидах, які може забезпечити рекомбінація між хроматидами гомологічних хромосом. В результаті рекомбінаційних перебудов при розходженні хроматид гарантовано неоднаковий розподіл генетичного матеріалу між дочірними клітинами.

В контрольному середовищі без ПФФА на цитологічних препаратах спостерігали випадки аномального поділу соматичних клітин, проте нам не вдалося отримати рослини, в яких би фіксувалися якісь зміни за генотипом або розбіжність гомологічних хромосом за типом мейозу. Дані цитологічного аналізу (1,9 %) свідчать про те, що вірогідність отримати рослини, які утворились з відповідних клітин, дуже маленька. Така різниця в контролі та експерименті може бути викликана дією ПФФА, який пригнічує поділ клітин та може збільшувати частоту аномальних мітозів в калюсі. Наші дані підтверджують гіпотезу, висловлену ще в 70-х роках Константиновим, який, ґрунтуючись на власних дослідженнях по впливу різних хімічних реагентів на мітоз у рослин, припустив, що практично будь-який фактор, затримуючий 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.

Особливий інтерес має бути спрямований на визначення в геномі арабідопсису певних сайтів рекомбінації між деякими хромосома-

ми. З великою ймовірністю такі транслокації можуть бути генеровані через фізіологічний дволанцюговий розрив і систему репарації під час мейозу [19]. 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 арабідопсису [20]. Так, було показано, що проксимальна від центромери теломер-асоційована ділянка послідовностей 3-ї хромосоми екотипу Col містила два нещодавно ідентифікованих потенційних гени [21], а проксимальна від теломери ділянка тієї ж хромосоми мала короткі дупліковані фрагменти з 1, 2, 3-ї хромосом, 3-я ж хромосома іншого екотипу – з хромосоми 5. Кожен з дуплікованих фрагментів зазнав дивергенції відносно ектопічного фрагмента. Невеликі ділянки гомологічних нуклеотидів знайдені у фланкуючих послідовностях як в дуплікованих фрагментах, так і у відповідних ектопічних послідовностях ДНК [20]. 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.

Багато питань все ж залишаються неясними, а саме яку плідність мають отримані рослини. Ми плануємо продовжувати дані дослідження, задіяти FISH-аналіз, дослідити сегрегацію хромосом в наступних поколіннях, використовуючи інші модельні об'єкти. Індукція зміни геномної конституції 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.

LOSS OF HETEROZYGOSITY OF INDIVIDUAL LOCI IN *ARABIDOPSIS THALIANA* REGENERANTS CULTURED WITH PARA-FLUOROPHENYLALANINE

O.V. Zimina, M.F. Parii, O.G. Alkhimova

Institute of Molecular Biology & Genetics NAS of Ukraine, Kyiv

National University of Life & Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

Precise chromosome segregation is vital for speciation and hybrid formation. The aim of the work was to study

the chromosomes behaviour and inheritance of maternal and paternal genomes in *Arabidopsis* regenerants derived from *in vitro* cultured cells on the medium with PFFA. The *Arabidopsis thaliana* model hybrid between Columbia and Landsberg *erecta* ecotypes was developed, which chromosomes were easy to distinguish using the 12 SSLP selected markers. Also, the influence of PFFA on the callus formation and regeneration of plants was analysed. 20 regenerated plants cultured with PFFA were derived, three of which were shown to lose the heterozygosity in six loci by DNA markers analysis. Different models are certainly required to understand how and when the mechanisms leading to proper chromosome segregation are established in species and hybrids.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Sytnyk, K., Vdovychenko, Zh., Spirydonov, V., Melnychuk, M., Parii, M., and Zimina, O., Somatic segregation: genetic evidences, consequences and applications, *Acta Hort.*, 2012, no. 961, pp. 495–502.
- Giorgetti, L., Vergara, M.R., Evangelista, M., Lo Schiavo, F., Terzi, M., and Nuti Ronchi, V., On the occurrence of somatic meiosis in embryogenic carrot cell cultures, *Mol. Gen. Genet.*, 1995, vol. 246, no. 6, pp. 657–662.
- Wang, R.R.-C., Li, X.-M., and Chatterton, N.J., Loss of heterozygosity and accelerated genotype fixation in rice hybrids, *Genome*, 1999, vol. 42, no. 5, pp. 789–796.
- Sybenga, J., Somatic segregation in rice, *Genome*, 2000, vol. 43, no. 4, pp. 720–722.
- Ruvalcaba-Ruiz, D., Palomino, G., Martinez, J., Mendez, I., and Rodriguez-Garay, B., In vitro induction of a trisomic of *Agave tequilana* Weber var. Azul (Agavaceae) by *para*-fluorophenylalanine treatment, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 2012, vol. 48, no. 1, pp. 144–152.
- Wijnker, E., and Schnittger, A., Control of the meiotic cell division program in plants, *Plant Reprod.*, 2013, vol. 26, no. 3, pp. 143–158.
- Zimina, O.V., Sytnyk, E.S., Vdovychenko, Zh.V., Alkhimova, O.G., Spirydonov, V.G., and Parii, M.F., Creation of *Arabidopsis thaliana* transgenic lines for study chromosome segregation phenomenon, *Factory eksperimentalnoy evolyutsii organizmov*, 2011, vol. 11, pp. 263–268 (in Russian).
- Zimina, O.V., Sytnyk, E.S., Parii, M.F., and Alkhimova, O.G., Multiplex polymerase chain reaction for genotyping of *Arabidopsis thaliana* ecotypes using sslp markers, *Biotechnol. Acta*, 2014, vol. 7, no. 4, pp. 80–84.
- Chen, Y.H., Zhang, L.H., Geng, Y.X., and Chen, Z.H., Meiosis-like reduction during somatic embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 2001, vol. 37, no. 5, pp. 654–657.
- McCleery R.H., Watt, T.A., and Hart, T. *Introduction to Statistics for Biology*, London, New York: Chapman and Hall/CRC, 2007.
- McDonald, J.H., *Handbook of Biological Statistics*, 3rd ed., Baltimore, 2008.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 2012.
- Niizeki, H., and Fukui, K., Elimination of somatic chromosomes in strawberry plants by treatment with *para*-fluorophenylalanine, *Japan J. Breed.*, 1983, vol. 33, no. 1, pp. 55–61.
- LaFave, M.C., and Sekelsky, J., Mitotic recombination: Why? When? How? Where? *PLoS Genet.*, 2009, vol. 5, no. 3, e1000411.
- Lee, P.S., Greenwell, P.W., Dominska, M., Gaweł, M., Hamilton, M., and Petes, T.D., A fine-structure map of spontaneous mitotic crossovers in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS Genet.*, 2009, vol. 5, no. 3, pp. 1–16.
- Puchta, H., and Hohn, B., In planta somatic homologous recombination assay revisited: a successful and versatile, but delicate tool, *Plant Cell*, 2012, vol. 24, no. 11, pp. 4324–4331.
- Molinier, J., Ries, G., Bonhoeffler, S., and Hohna, B., Interchromatid and interhomolog recombination in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell*, 2004, vol. 16, no. 2, pp. 342–352.
- Gisler, B., Salomon, S., and Puchta, H., The role of double-strand break-induced allelic homologous recombination in somatic plant cells, *Plant J.*, 2002, vol. 32, no. 3, pp. 277–284.
- Alkhimova, O.G., Mazurok, N.A., Potapova, T.A., Zakian, S.M., Heslop-Harrison, J.S., and Vershinin, A.V., Diverse patterns of the tandem repeats organization in rye chromosomes, *Chromosoma*, 2004, vol. 113, no. 1, pp. 42–52.
- Wang, C.T., Ho, C.H., Hseu, M.J., and Chen, C.M., The subtelomeric region of the *Arabidopsis thaliana* chromosome IIIIR contains potential genes and duplicated fragments from other chromosomes, *Plant Mol. Biol.*, 2010, vol. 74, no. 1–2, pp. 155–166.
- Wang, D., Guo, Y., Wu, C., Yang, G., Li, Y., and Zheng, C., Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in *Arabidopsis* and rice, *BMC Genom.*, 2008, vol. 9, pp. 44.

Надійшла 19.11.15