

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»**

На правах рукописи

БОГДАНОВА ВЕРА СЕРГЕЕВНА

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ
НЕСОВМЕСТИМОСТИ У ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.).**

03.02.07 – генетика

**Диссертация
на соискание ученой степени
доктора биологических наук**

Новосибирск – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 7 |
| Актуальность проблемы..... | 7 |
| Степень разработанности темы | 9 |
| Цель и задачи исследования | 10 |
| Научная новизна работы | 11 |
| Теоретическая и практическая значимость работы..... | 12 |
| Методология и методы диссертационного исследования | 14 |
| Основные положения, выносимые на защиту..... | 15 |
| Степень достоверности результатов, апробация работы. | 15 |
| Публикации..... | 16 |
| Структура и объем диссертации..... | 16 |
| Личный вклад автора | 16 |
| Благодарности | 16 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ | 18 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ НЕСОВМЕСТИМОСТЬ У РАСТЕНИЙ: ПРОЯВЛЕНИЯ, ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ..... | 20 |
| 1.1. Эволюционная значимость ядерно-цитоплазматического конфликта..... | 20 |
| 1.2. Фенотипическое описание ядерно-цитоплазматического конфликта..... | 21 |
| 1.2.1. Ядерно-цитоплазматический конфликт у энотеры | 21 |
| 1.2.2. Ядерно-цитоплазматический конфликт у пассифлоры | 22 |
| 1.2.3. Ядерно-цитоплазматический конфликт у зантедексии | 23 |
| 1.2.4. Ядерно-цитоплазматический конфликт у цибридов пасленовых | 24 |
| 1.2.5. Проявление ядерно-цитоплазматического конфликта на разных стадиях жизни растения..... | 26 |

| | |
|---|----|
| 1.2.6. Ядерно-цитоплазматическое взаимодействие у злаков | 27 |
| 1.3. Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости | 29 |
| 1.3.1. Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости у злаков | 29 |
| 1.3.2. Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости у однолетней люцерны (<i>Medicago truncatula</i>)..... | 37 |
| 1.3.3. Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости у акации | 39 |
| 1.3.4. Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости у энотеры | 40 |
| 1.3.5. Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости у зантедексии | 42 |
| 1.3.6. Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости у других растений..... | 43 |
| 1.4. Молекулярно-генетические основы ядерно-цитоплазматической несовместимости..... | 44 |
| 1.4.1. Молекулярно-генетические основы ядерно-цитоплазматической несовместимости у пасленовых | 44 |
| 1.4.2. Молекулярно-генетические основы ядерно-цитоплазматической несовместимости у энотеры | 46 |
| 1.5. Заключительные замечания | 47 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 49 |
| 2.1. Общие замечания | 49 |
| 2.2. Видимые маркеры | 49 |
| 2.3. Молекулярные маркеры | 50 |
| 2.4. Образцы гороха | 53 |
| 2.5. Выращивание растений | 56 |
| 2.6. Скрещивание линий гороха | 56 |

| | |
|--|----|
| 2.7. Подсчет фертильности пыльцы | 56 |
| 2.8. Приготовление препаратов мейотических и митотических хромосом..... | 57 |
| 2.9. Популяция рекомбинантных инбредных линий (РИЛ) и картирование генов несовместимости..... | 57 |
| 2.10. Выделение ДНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР), расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции | 60 |
| 2.11. Выделение РНК, синтез кДНК, определение нуклеотидных последовательностей | 61 |
| 2.12. Выделение пластидной ДНК | 62 |
| 2.13. Высокопроизводительное секвенирование на платформе Ion Torrent PGM..... | 64 |
| 2.14. Сборка пластидных геномов..... | 64 |
| 2.15. Идентификационные номера в публичных базах данных..... | 65 |
| ГЛАВА 3. ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ ЯДЕРНО- ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ НЕСОВМЕСТИМОСТИ У ГОРОХА..... | |
| 3.1. Фенотипические проявления ядерно-цитоплазматического конфликта | 67 |
| 3.2. Связь ядерно-цитоплазматического конфликта с наследованием пластид | 70 |
| 3.3. Влияние ядерно-цитоплазматического конфликта на ультраструктуру хлоропластов | 78 |
| 3.4. Нарушения мейоза как проявление ядерно-цитоплазматической несовместимости..... | 81 |
| ГЛАВА 4. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЯДЕРНО- ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ НЕСОВМЕСТИМОСТИ У ГОРОХА... 90 | |
| 4.1. Выявление ядерных генетических факторов, участвующих в конflikте ядра и пластид..... | 91 |
| 4.2. Особенности наследования генов <i>Scs1</i> и <i>Scs2</i> | 99 |

| | |
|--|-----|
| 4.3. Фенотипическое проявление генов <i>Scs1</i> и <i>Scs2</i> | 102 |
| 4.4. Маркеры и линии, использованные для генетического анализа | 104 |
| 4.5. Влияние аллельного состояния <i>Scs1</i> на жизнеспособность мужских гаметофитов..... | 107 |
| 4.6. Влияние аллельного состояния <i>Scs1</i> на жизнеспособность спорофитов | 109 |
| 4.7. Влияние аллельного состояния <i>Scs2</i> на жизнеспособность мужских гаметофитов..... | 111 |
| 4.8. Влияние аллельного состояния <i>Scs2</i> на жизнеспособность спорофитов | 114 |
| 4.9. Картирование локуса <i>Scs1</i> | 118 |
| 4.10. Картирование локуса <i>Scs2</i> | 122 |
| 4.11. Существование генов, взаимодействующих с <i>Scs2</i> | 126 |
| ГЛАВА 5. ГЕНЫ-КАНДИДАТЫ НА РОЛЬ УЧАСТНИКОВ ЯДЕРНО- ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО КОНФЛИКТА У ГОРОХА | 131 |
| 5.1. Общая характеристика реконструированных пластидных геномов | 131 |
| 5.2. Поиск пластидных генов-кандидатов, вовлеченных в ядерно- цитоплазматический конфликт | 133 |
| 5.3. Поиск ядерных генов, функционально связанных с пластидными генами-кандидатами..... | 134 |
| 5.4. Структура аллелей <i>accD</i> | 136 |
| 5.5. Позиция локуса <i>Vscr3</i> на генетической карте | 141 |
| 5.6. Структура аллелей <i>Vscr3</i> | 143 |
| 5.7. Потенциальные взаимодействия генов-кандидатов..... | 145 |
| 5.8. Репродуктивная совместимость представителей рода горох в свете данных о строении субъединиц ацетил-коА карбоксилазы..... | 150 |
| 5.9. Ядерные локусы, потенциальные участники конфликта..... | 154 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 157 |

| | |
|--------------------------------------|-----|
| ВЫВОДЫ..... | 162 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 164 |
| ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ | 180 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ | 183 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Улучшение сельскохозяйственных культур является составной частью процесса возделывания растений. Однако культивируемые в настоящее время сорта имеют ограниченное генетическое разнообразие. Дикие сородичи многих культурных растений существуют в природе и являются потенциальными источниками генетических ресурсов (Вавилов, 1960), в связи с чем были созданы специальные центры по сохранению генетического разнообразия (Tanksley, McCouch, 1997). Развитие молекулярно-генетических методов и их применение в селекции растений способствовало интрогрессии определенных генов и генетических блоков от диких видов и местных форм к культурным сортам (McCouch, 2004; Hajjar, Hodgkin, 2007). Подобные подходы к селекции и связанные с ними исследования большей частью направлены на улучшение показателей урожайности, устойчивости к болезням и адаптации к глобальным изменениям климата (Fernie et al., 2006).

Первые же попытки межвидового скрещивания встретились с существенными проблемами, включающими несовместимость между дикими родичами и культурными сортами, стерильность гибридов в первом и последующих поколениях, сниженная жизнеспособность, уменьшение рекомбинации между хромосомами двух видов, а также генетическое сцепление локусов, дающих негативный эффект на хозяйственно-ценные признаки (Fernie et al., 2006). У некоторых растений были исследованы генетические основы несовместимости культурных форм с дикими сородичами. У кукурузы описаны системы аллелей, определяющих взаимодействие прорастающих пыльцевых зерен с тканями пестика и формирующих пре-зиготические барьеры при скрещивании кукурузы с теосинте (Lu et al., 2014). Около 50 генов, создающих пост-зиготические репродуктивные барьеры между подвидами, подробно описаны у риса, некоторые из молекулярных продуктов этих генов охарактеризованы (см.

обзор Ouyang et al., 2010). У некоторых растений отдаленной гибридизации препятствуют барьеры в виде ядерно-цитоплазматической несовместимости, наиболее известным случаем которой, пожалуй, является цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС), проистекающая из конфликта ядерного генома с митохондриальным (см. обзор Chase, 2007). Также нередки случаи конфликта ядерных и пластидных геномов при отдаленных скрещиваниях. В свою очередь геномный конфликт играет существенную роль в формировании репродуктивной изоляции (Johnson, 2010) по модели Бейтсона-Добжанского-Мюллера, то есть коадаптация генов разных клеточных геномов, разделение которых при отдаленном скрещивании приводит к внутриклеточному конфликту (Orr, 1996).

В соответствии с современными тенденциями в селекции растений перенос генетического материала от диких сородичей актуален и для зерновых бобовых (Sharma et al., 2013). Горох имеет большое разнообразие диких сородичей, представляющих богатый потенциал как доноры хозяйственно-ценных признаков, таких как устойчивость к разным видам грибных патогенов (Wroth, 1998; Fondevilla et al., 2007; 2011), устойчивость к гороховой зерновке (Clement et al., 2002; Byrne et al. 2008; Aryamanesh et al., 2014).

Степень разработанности темы. К моменту настоящего исследования была подробно описана несовместимость пластидных и ядерных геномов, возникающая при скрещиваниях разных видов энотеры (Greiner et al., 2011). Было выдвинуто предположение об идентичности участника ядерно-пластидного конфликта со стороны хлоропластного генома, что стало возможным в результате тотального секвенирования 5 хлоропластных геномов энотеры (Greiner et al., 2008 b). Однако генетический анализ ядерных генов, участвующих в конфликте, не проводился.

Значительный прогресс в понимании ядерно-пластидного конфликта был достигнут в случае цибридов (гибридов соматических клеток)

пасленовых. При анализе соматических гибридов беладонны и табака было показано, что нарушение функции хлоропластов табака связано с отсутствием у беладонны ядерного гена, осуществляющего редактирование мРНК хлоропластного гена, кодирующего альфа-субъединицу АТФазы (Schmitz-Linneweber et al., 2005). В присутствии обоих ядерных геномов – табака и беладонны – редактирование не нарушено. Возможные участники конфликта со стороны ядерного генома остаются неизвестными.

Напротив, для ядерно-цитоплазматического конфликта, возникающего в отдаленных скрещиваниях пшеницы, был проведен генетический анализ с целью локализации участников со стороны ядерного генома. Было выдвинуто предположение о дигенном контроле несовместимости (Ohtsuka, 1991). Впоследствии было показано, что совместимость ядра и цитоплазмы определяется системой двух ядерных генов *scs* и *Vi* (Anderson, Maan, 1995). Ген *Vi* был локализован в геноме пшеницы с точностью до хромосомного плеча (Anderson, Maan, 1995), ген *scs* же был картирован более точно, были определены ближайшие окаймляющие его микросателлитные маркеры на расстоянии 8,2 и 5,8 сМ. После удаления части растений, выглядящих как двойные кроссоверы, эти расстояния были сокращены до 2,3 и 0,6 сМ (Simons et al., 2003). Генетический анализ для локализации гена *scs* с использованием RAPD маркеров проводился независимой группой исследователей (Asakura et al., 1997). С развитием молекулярно-генетических методов и расшифровкой полных ядерных геномов разных растений генетический анализ локуса *scs* существенно продвинулся. Ориентировочная длина участка хромосомы 1D, на котором может содержаться *scs*, была сокращена до 1,1 Мб. На основании синтении геномов пшеницы, риса, сорго (*Sorghum* Moench.), коротконожки (*Brachypodium* P.Beauv.) в этом районе предсказаны 16 генов (Michalak de Jimenez et al., 2013). Участник (или участники) конфликта со стороны цитоплазматического, вероятно, митохондриального, генома (Aksyonova et al., 2005) остаются неизвестны.

Посевной горох (*Pisum sativum* L.) имеет диких сородичей, представляющих богатый потенциал в качестве доноров хозяйственно-ценных признаков, таких как устойчивость к разным видам грибных патогенов (Wroth, 1998; Fondevilla et al., 2007; 2011) или гороховой зерновке (Clement et al., 2002; Byrne et al. 2008; Aryamanesh et al., 2014). Однако, при скрещивании культурного гороха с дикими формами у гибридов часто возникают нарушения морфологии в виде уменьшения размеров растений, хлорофилльной недостаточности, снижена фертильности пыльцы (Лутков, 1930; Ben-Ze'ev, Zohary, 1973). В ходе работ, предшествующих настоящему исследованию, было обнаружено, что фенотип гибридов различался в реципрокных скрещиваниях, что указывало на нарушение взаимодействия ядра и цитоплазмы при отдаленной гибридизации. Для изучения ядерно-цитоплазматического конфликта у гороха была подобрана удобная модель, которая позволяла в первом же поколении гибридов регистрировать множественные, хорошо заметные глазом проявления конфликта. В качестве такой модели выступали гибриды с участием культурного гороха (*P. sativum* subsp. *sativum* L.) и линии дикорастущего го гороха ВИР320, принадлежащей подвиду *Pisum sativum* subsp. *elatius* (Bieb.) Schmalh. Принадлежность модельных линий к одному и тому же виду гороха, *P. sativum*, делала возможным проведение гибридологического анализа.

Исходя из вышеизложенного, цель и задачи настоящей работы были следующие.

Цель и задачи исследования. Целью работы было исследование генетической основы ядерно-цитоплазматического конфликта, происходящего при скрещивании культурного гороха (*P. sativum*. L. subsp. *sativum*) с дикими сородичами, принадлежащими тому же виду (*Pisum sativum* subsp. *elatius* (Bieb.) Schmalh.).

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Описать аномалии фенотипа растений, полученных от скрещивания культурной и дикорастущей формы гороха.
2. Определить клеточный компартмент, ответственный за формирование конфликта цитоплазмы с ядерным геномом.
3. Провести генетический анализ ядерно-цитоплазматического конфликта и определить минимальное число ядерных генов, участвующих в конфликте.
4. Изучить особенности наследования ядерных локусов, участвующих в формировании конфликта.
5. Провести генетическое картирование ядерных генов, участвующих в формировании конфликта.
6. Определить и проаннотировать нуклеотидные последовательности пластидных геномов, совместимых и несовместимых с ядерным геном группы сцепления III культурного гороха.
7. Выдвинуть гены-кандидаты на роль участников ядерно-цитоплазматического конфликта.

Научная новизна работы. В настоящем исследовании впервые описано фенотипическое проявление ядерно-цитоплазматического конфликта у гороха, на модели скрещивания дикорастущего гороха, относящегося к подвиду *P. sativum* subsp. *elatius*, с культурными представителями *P. sativum* subsp. *sativum*. Показано, что данный конфликт связан с несовместимостью ядерного генома культурного гороха с пластидным, но не митохондриальным геномом дикорастущего го гороха. Методом генетического анализа впервые показано, что данный конфликт определяется по меньшей мере двумя комплементарными ядерными генами, обозначенными *Scs1* и *Scs2*. В ходе дальнейшего генетического анализа показано, что аллель *Scs1*, происходящий от культурного гороха, на фоне цитоплазмы от ВИР320 является леталью для спорофитов и мужских гаметофитов, и аллель *Scs2*, происходящий от культурного гороха, снижает жизнеспособность мужских гаметофитов, а в гомозиготе приводит к возникновению фенотипа с ярко

выраженной ядерно-цитоплазматической несовместимостью. Локусы *Scs1* и *Scs2* локализованы в группах сцепления III и V, соответственно. Определена и впервые проаннотирована нуклеотидная последовательность хлоропластных геномов пяти линий гороха, одной культурной и четырех диких, имеющих пластиды совместимые и несовместимые с ядерным геном *Scs1* культурного гороха. На основании биоинформатического анализа полученных последовательностей выдвинуты гены-кандидаты на роль участников конфликта ядра и цитоплазмы, со стороны пластидного генома это ген *accD*, кодирующий бета субъединицу карбоксилтрансферазы, входящей в состав пластидной ацетил-коА-карбоксилазы, и со стороны ядерного генома – ген *Vcsp3*, кодирующий белок-переносчик биотина и карбоксила, участвующий в работе того же ферментного комплекса. Тем самым впервые описан конфликт ядерного и пластидного генома за счет нарушения белок-белкового взаимодействия. Подобный механизм несовместимости является теоретически ожидаемым, но до сих пор не был описан (Burton et al., 2013). Полученные результаты позволили впервые представить модель ядерно-цитоплазматической несовместимости, включающей как ядерные, так и пластидные гены.

Теоретическая и практическая значимость работы. Изучение генетических основ репродуктивной изоляции представляет собой важную задачу эволюционной биологии. Гены, которые вносят вклад в ограничение генного потока между популяциями, могут быть названы генами видообразования (Rieseberg, Blackman, 2010), они могут участвовать в формировании презиготических или постзиготических репродуктивных барьеров, таких как сниженная жизнеспособность и фертильность гибридов. С этой точки зрения описанный в данной работе феномен ядерно-цитоплазматической несовместимости, состоящий в нарушении хлорофилльной пигментации, снижении фертильности пыльцы, общем снижении жизнеспособности гибридов между культурным и диким горохом,

представляет собой типичный постзиготический репродуктивный барьер. Таким образом, описанные в данной работе гены имеют важную эволюционную функцию, являясь генами видообразования.

Часто наблюдается снижение жизнеспособности гибридов, связанное с нарушением функционирования пластид или митохондрий, поскольку органеллы в значительной степени зависят от белков, кодируемых в ядре (Burton et al., 2013). Несовместимость внутриклеточных геномов может проявляться на уровне взаимодействия белка, кодируемого в ядре, с органелльным белком, ДНК или РНК. Для растений в литературе описаны нарушения взаимодействия белка с митохондриальной РНК (Chase, 2007; Yamagata et al., 2010) и пластидной РНК (Schmitz-Linneweber et al. 2005). Также описан гипотетический случай нарушения взаимодействия кодируемой в ядре полимеразы с промоторным участком пластидной ДНК (Greiner et al. 2008 b). В настоящей работе впервые представлена модель нарушения белок-белкового взаимодействия между субъединицами ферментного комплекса, кодируемыми в ядре и пластидах. Кроме того, данная модель позволяет исследовать генетическими методами функционирование важнейшего фермента липидного обмена – пластидной ацетил-коА-карбоксилазы.

С практической точки зрения, знание о генетической системе, контролирующей совместимость или несовместимость в скрещиваниях разных форм гороха, существенно облегчит планирование селекционных программ, вовлекающих диких сородичей гороха в качестве доноров хозяйственно-ценных признаков.

Созданная в ходе работы серия рекомбинантных инбредных линий (РИЛ) на основе гибридизации культурного и дикорастущего гороха может быть использована для генетического картирования, и в настоящее время используется с этой целью коллегами из Университета Палацкого, Чешская Республика (договор о сотрудничестве № 018-ЭАО).

Методология и методы диссертационного исследования. Основным методологическим подходом в данной работе является гибридологический анализ, то есть изучение закономерности наследования признаков в скрещиваниях с использованием удобной для решения поставленной задачи экспериментальной модели. В данной работе такой моделью являются гибриды культурного гороха с представителями различных эволюционных линий дикорастущего гороха. Используемая модель изучения ядерно-цитоплазматической несовместимости позволяет уже в первом поколении гибридов регистрировать признаки конфликта внутриклеточных геномов, в сильно выраженных случаях это отчетливо заметно глазом: множественные нарушения морфологии и хлорофилльной пигментации, резко сниженная плодовитость растений. Также использован цитологический анализ с помощью светового микроскопа для анализа течения митоза и мейоза, а также фертильности пыльцы после окрашивания ацетокармином. Применялось высокопроизводительное секвенирование пластидных геномов на платформе Ion Torrent. Обработка данных производилась с использованием современного программного обеспечения.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Ядерно-цитоплазматический конфликт при скрещивании дикорастущей и культурной форм гороха возникает за счет несовместимости ядерного и пластидного генома.
2. Ядерно-цитоплазматический конфликт возникает при участии как минимум двух несцепленных ядерных генов *Scs1* и *Scs2*, взаимодействующих по модели доминантной комплементации.
3. Наследование аллелей ядерного локуса *Scs1* имеет особенности, связанные с летальностью мужских гаметофитов и спорофитов.
4. Гены, кодирующие субъединицы ферментного комплекса ацетил-коА-карбоксилазы, могут быть номинированы в качестве генов-кандидатов на роль участников ядерно-цитоплазматического конфликта.

Степень достоверности результатов, апробация работы. Достоверность результатов определяется большим числом проведенных экспериментов и публикациями в международных и отечественных журналах. Достоверность локализации генов, контролирующих ядерно-цитоплазматический конфликт, доказана использованием большого числа растений и нескольких картирующих популяций, полученных на основе рекомбинантных инбредных линий. Особенности наследования аллелей локусов ядерно-цитоплазматической несовместимости подтверждаются совокупностью результатов по анализу генетического расщепления в разных скрещиваниях и в ряду поколений. Достоверность групповых различий по признакам аномалий мейоза и фертильности пыльцы подтверждена стандартными методами статистической обработки результатов.

Результаты работы были представлены на Российско-французской конференции «Проблемы и перспективы биотехнологии растений» (Новосибирск, 2008), Международной конференции по генетике, геномике и биотехнологии растений (Новосибирск, 2010), Конференции ВОГиС «Проблемы генетики и селекции». Курсы повышения квалификации научно-

педагогических кадров по генетике с основами селекции, медицинской генетики и эволюции (Новосибирск, 2013).

Публикации. Общее число работ по теме диссертации, включая сборники трудов конференций, составляет 19, в том числе 15 статей в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 198 страницах компьютерного текста, содержит 12 таблиц и 30 рисунков. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 3 глав с изложением результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, содержащего 136 источников, из них 15 отечественных, а также имеет приложение, содержащее 1 таблицу.

Личный вклад автора. Диссертационная работа является результатом исследований, проведенных в ИЦиГ СО РАН в период с 2005 по 2015 гг. Автору принадлежит постановка цели и задач исследования, обработка, интерпретация и обобщение результатов. Молекулярно-генетическая часть экспериментальной работы и анализ полученных результатов, а также биоинформатическая обработка результатов высокопроизводительного секвенирования выполнены автором самостоятельно. Определение нуклеотидных последовательностей кДНК и микроскопический анализ митоза и мейоза проведен в сотрудничестве с коллегами из лаборатории генетики и эволюции бобовых растений ИЦиГ СО РАН. Выделение хлоропластной ДНК и получение первичных данных высокопроизводительного секвенирования выполнены в сотрудничестве с коллегами из ЦКП «Центр геномных исследований» ИЦиГ СО РАН.

Благодарности. Исследования, проведенные в данной работе, были поддержаны бюджетным проектом VI.53.1.3, грантами РФФИ № 99-04-49970, 07-04-00111-а, 10-04-00230-а., 13-04-00516А, интеграционным комплексным проектом No10-2, выполняемым по заказу Президиума СО РАН "Природа Академгородка: результат полувековой эксплуатации" (2007-

2008), интеграционным комплексным проектом Ноб, выполняемым по заказу Президиума СО РАН "Динамика экосистем Академгородка: мониторинг и разработка рекомендаций по рациональному использованию" (2009-2010), проектом РАН "Происхождение и эволюция биосферы", Государственным контрактом №. 02.512.11.2254 Российского Агентства по науке и инновациям (2008-2009), проектом Президиума РАН по программе "Биоразнообразие" (2009-2011), грантом № 30.27 Президиума РАН по программе "Живая природа: современное состояние и проблемы развития" (2013-2014).

В работе использовалось оборудование Центров Коллективного пользования: "Лаборатория искусственного выращивания растений" ИЦиГ СО РАН, "Центр геномных исследований" ИЦиГ СО РАН, "Микроскопический анализ биологических объектов" ИЦиГ СО РАН, "Геномика" ИЦиГ СО РАН, "Сибирский суперкомпьютерный центр" СО РАН.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ВИР – также в обозначениях коллекционных образцов; Всесоюзный Институт Растениеводства (в настоящее время Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова», г. Санкт-Петербург).
- ПААГ – полиакриламидный гель.
- п.о. – пары оснований.
- ПЦР – полимеразная цепная реакция.
- РИЛ – рекомбинантная инбредная линия.
- сМ – сантиморган.
- Трис – трис(гидроксиметил)аминометан $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$.
- ЦКП – центр коллективного пользования.
- ЦМС – цитоплазматическая мужская стерильность.
- ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$.
- AFLP – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (от англ. Amplified Fragment Length Polymorphism).
- ВССР – белок переносчик биотина и карбоксила (от англ. Biotin carboxyl carrier protein).
- BSA – бычий сывороточный альбумин (от англ. Bovine Serum Albumin).
- CAPS – полиморфизм длины амплифицированной ДНК после обработки эндонуклеазами рестрикции (от англ. Cleaved Amplified Polymorphic Sequence).
- СТАВ – цетилтриметил бромид аммония (от англ. N-cetyl-N,N,N-trimethylammonium bromide).
- ENA – Европейская база нуклеотидных последовательностей (от англ. European Nucleotide Archive).
- HEPES – N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоная кислота (от англ. N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid).

- JI – в обозначениях коллекционных образцов, коллекция Исследовательского центра John Innes Centre (Великобритания).
- L – в обозначениях коллекционных образцов, коллекция Г. Лампрехта.
- LG – группа сцепления (от англ. Linkage Group).
- M – моль (для обозначения концентраций растворов).
- mM – миллимоль (для обозначения концентраций растворов).
- P – в обозначениях коллекционных образцов, коллекция Ф. Мёльбауэра.
- PI – в обозначениях коллекционных образцов, коллекция центра интродукции растений в Pullman (США) (от англ. Plant Introduction).
- pmol – пикомоль (для обозначения концентраций растворов).
- NCBI – Национальный центр биотехнологической информации США (от англ. National Center for Biotechnological Information).
- PEG – полиэтиленгликоль (от англ. Polyethylene glycol).
- RAPD – случайно амплифицированная полиморфная ДНК (от англ. Random Amplified Polymorphic DNA).
- SDS – додецилсульфат натрия (от англ. Sodium Dodecyl Sulfate).
- ТАЕ – трис-ацетатный буфер (от англ. Tris, Acetate, EDTA – трис, ацетат, ЭДТА).
- ТВЕ – трис-боратный буфер (от англ. Tris, Borate, EDTA – трис, борат, ЭДТА).
- TE – Трис и ЭДТА-содержащий буфер (от англ. Tris-EDTA).
- WL – в обозначениях коллекционных образцов, коллекция Института растениеводства Weibullsholm Landskrona (Швеция).
- WT – в обозначениях коллекционных образцов, коллекция селекционного центра Wiatrowo (Польша).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ НЕСОВМЕСТИМОСТЬ У РАСТЕНИЙ: ПРОЯВЛЕНИЯ, ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ

1.1. Эволюционная значимость ядерно-цитоплазматического конфликта.

Межвидовые гибриды, а иногда и гибриды растений одного вида, но из разных популяций часто стерильны, нежизнеспособны или несут фенотипические аномалии. Неблагоприятные признаки гибридов, в их совокупности называемые несовместимостью гибридов, примечательны тем, что они действуют как репродуктивные барьеры при видообразовании, а также имеют необычные генетические и эволюционные характеристики (Johnson, 2010). Обычно несовместимость гибридов возникает не за счет единичных генетических событий, а за счет нарушения взаимодействий между несколькими генами. Эта модель взаимодействия, справедливая для большого числа описанных случаев несовместимости гибридов, носит название модели Бейтсона-Добжанского-Меллера (Bateson–Dobzhansky–Muller, или BDM), по именам исследователей, внесших значительный вклад в ее формулировку в начале XX века (Ort, 1996; Johnson, 2002). Эта модель сводится к тому, что несовместимость гибридов возникает в тех случаях, когда в разных локусах существуют аллели, которые не были проверены эволюцией на возможность слаженного взаимодействия, но в результате гибридизации оказываются сведены в одном организме, приводя к неэффективному взаимодействию и отбору против генотипов, сочетающих некоторые комбинации аллелей в нескольких локусах. В ряде случаев были описаны гены, ответственные за снижение приспособленности гибридов (hybrid breakdown) (см. обзоры Войлоков, Тихенко, 2009; Johnson, 2010, Rieseberg, Blackman, 2010; Maheshwari, Barbash 2011). По мере накопления данных возникает искушение поискать ответ на вопрос, существуют ли определенные типы генов, предрасположенные к созданию гибридной

несовместимости (Burton et al., 2013). Хотя явной закономерности не прослеживается, в обзорах последнего времени отмечается большое число случаев, когда снижение приспособленности гибридов связано с нарушениями функции митохондрий и хлоропластов (Johnson, 2010; Greiner et al., 2011; Burton et al., 2013). В настоящем обзоре литературы основное внимание уделено случаям ядерно-цитоплазматической несовместимости с акцентом на несовместимость ядра и пластид, фенотипическое описание, генетический анализ и молекулярно-генетические основы внутриклеточного межгеномного конфликта.

1.2. Фенотипическое описание ядерно-цитоплазматического конфликта.

Конфликт ядра и пластид был описан у различных видов растений, относящихся к 14 родам (Greiner et al., 2011). При этом более или менее систематическое изучение конфликта, помимо простой констатации, проводилось лишь у небольшого числа видов и родов.

1.2.1. Ядерно-цитоплазматический конфликт у энотеры.

Одним из наиболее подробно описанных случаев является несовместимость геномов ядра и пластид (пластома) при скрещиваниях представителей различных видов рода *Oenothera* L.. На материале 14 дикорастущих видов *Oenothera* сравнивали фенотипы растений, несущих ядерно-цитоплазматические комбинации, сочетающие один и тот же ядерный геном и разные варианты пластид. В результате были выделены 5 типов пластома, I - V, и три типа геномов А, В, С, которые давали совместимые сочетания лишь в 12 случаях из 30 возможных (Stubbe, 1959).

Если путем искусственного скрещивания получают растения, несущие пластом и геном в комбинации, которая не встречается в природе, у таких растений часто наблюдаются аномалии развития, наиболее заметным проявлением которых является тот или иной вид хлорофилльной недостаточности. У растений, имеющих совместимую комбинацию генома и

пластома, листья зеленые, тогда как несовместимые комбинации приводят к появлению бледных, желтых, желто-зеленых, сероватых, белых секторов на листьях (Stubbe, 1959; 1989). В особо выраженных случаях несовместимость приводит к нарушению деления пластид и подавлению клеточного деления (Stubbe, 1963). У растений, несущих пластидные геномы I, II, III, IV, в сочетании с ядерным геномом А, были подробно исследованы структура хлоропластов, содержание хлорофилла, активность транспорта электронов. Сочетания генома А с пластомами I, II, IV считаются совместимыми, из них сочетание А-I, и иногда А-II встречаются в природе, сочетание А-III является несовместимым, такие растения несут белые сектора, которые могут зеленеть в дальнейшем (Schötz, 1958). Хлоропласты из белых участков листа имели нарушенную структуру, тилакоидные мембраны были фрагментированы, крахмальные гранулы отсутствовали. Восстановление зеленой окраски было связано с восстановлением структуры хлоропластов. Было показано, что листья с несовместимой комбинацией геном-пластом, в том числе зеленые участки листьев, содержат меньше хлорофилла, у них снижено соотношение типов хлорофилла а/в, а также активность фотосистем PSI и PSII (Glick, Sears, 1994). Однако, обмен пластомами не затрагивал кинетических параметров основного фермента фотосинтеза, рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилазы/оксигеназы (EC 4,1.1.39), указывая на то, что пластидный ген, кодирующий большую субъединицу этого фермента, не претерпел значительных изменений в ходе эволюции пластома в роде *Oenothera* (Dauborn, Brüggemann, 1996).

1.2.2. Ядерно-цитоплазматический конфликт у пассифлоры.

Такие фенотипические проявления ядерно-цитоплазматического конфликта, как нарушения нормальной зеленой окраски разной степени выраженности, низкое содержание хлорофилла, нарушение структуры тилакоидов были описаны и у других объектов, например, декоративных

растений пассифлоры, *Passiflora* L. (Mráček, 2005) и зантедексии, *Zantedeschia* Spreng. (родственник каллы) (Yao, Cohen, 2000).

Скрещивания различных видов пассифлоры показали, что у гибридов, полученных с участием *Passiflora menispermifolia* Kunth., возникали сектора с нарушенной хлорофилльной пигментацией, их цвет варьировал от белого до бледно-зеленого. Сильно выраженная несовместимость наблюдалась при скрещивании видов *P. menispermifolia* × *P. oerstedii* Mast. У таких гибридов в белых участках листьев содержались недифференцированные пропластиды, в которых накапливались пузырьчатые структуры, а тилакоидные мембраны были рудиментарны. Наблюдалось снижение количества мРНК, транскрибируемой с генов *psaA*, относящегося к фотосистеме I, и *psbA*, относящегося к фотосистеме II, тогда как количество мРНК гена *petA*, относящегося к цитохромному комплексу b6f, было повышено. Был проведен вестерн-блот анализ шести белков, кодируемых хлоропластными генами, в результате чего было показано, что кодируемые в пластидах белки *psaA*, *psaD*, *petB*, и *atpA* не выявлялись, а количество белкового продукта гена *petA* было сильно снижено. Интересно, что, несмотря на повышенное количество мРНК гена *petA*, белковый продукт был представлен слабо и, по-видимому, в виде непротессированного предшественника с более высоким молекулярным весом, чем в норме (Mráček, 2005).

1.2.3. Ядерно-цитоплазматический конфликт у зантедексии.

У межвидовых гибридов зантедексии *Zantedeschia odorata* P.L. Perry × *Z. aethiopica* (L.) Spreng. ядерно-цитоплазматический конфликт приводил к появлению, белых, желтовато-зеленых, бледно-зеленых секторов на листьях (Yao et al., 1994). Пластиды в бледно-зеленых секторах происходили от *Z. aethiopica*; пластиды в белых секторах, происходящие от *Z. odorata*, не формировали ни проламеллярных тел, ни ламеллярных мембран в темноте, ни гран на свету. Подобным образом, в белых секторах гибридов *Trifolium*

repens L. × *T. hybridum* L. отсутствовали внутренние мембраны хлоропластов (Przywara et al. 1989).

В участках листа с нарушениями хлорофилльной окраски наблюдалось снижение количества мРНК ряда генов, продукты которых функционируют в составе хлоропластов, в том числе трех пластидных (*rbcL*, *psbA*, *23s rRNA*) и двух ядерных генов (*cab*, *rbcS*). Хотя в белых секторах уровень мРНК был сильно снижен, он все же выявлялся при нозерн-блот гибридизации. Зеленые сектора на листьях растений с выраженным конфликтом, хотя и имели видимую глазом нормальную окраску, демонстрировали сниженный уровень мРНК изученных генов. Наиболее сильно снижался уровень мРНК, транскрибируемой с гена *rbcL* (Yao, Cohen, 2000).

1.2.4. Ядерно-цитоплазматический конфликт у гибридов пасленовых.

Как правило, у растений из разных родов гибридизация половым путем не идет, однако, в некоторых случаях, например, у представителей семейства пасленовых (*Solanaceae*) достаточно легко происходит регенерация растений из культур гибридных клеток. У таких растений для изучения взаимодействия неродственных ядра и цитоплазмы получали так называемые цбриды (гибриды соматических клеток, как правило, клеток мезофилла) путем слияния протопластов с последующей регенерацией растений, у которых из-за элиминации одного из клеточных ядер ядерный и пластидный геном происходили от разных видов или родов растений. Так, при соматической гибридизации клеток картофеля (*Solanum tuberosum* L.) цбриды, сочетающие ядро *S. tuberosum* и цитоплазму дикорастущих представителей рода *Solanum*, образовывались не во всех комбинациях. Оказалось, что невозможно получить цбриды, сочетающие ядро картофеля и хлоропласты *S. polyadenium* Greenm., а также ядро картофеля и митохондрии *S. tarijense* J.G. Hawkes. Совместимость чужеродных ядра и цитоплазмы в цбридах в целом соответствовала степени родства хлоропластов (Perl et al., 1991). Также оказалось невозможно получить цбриды, сочетающие ядерный геном

табака (*Nicotiana tabacum* L.) и хлоропласты картофеля (*S. tuberosum*) (Thanh et al. 1988), из-за сильно выраженной ядерно-цитоплазматической несовместимости, которую можно было скомпенсировать за счет рекомбинации пластидной ДНК видов донора и реципиента (Thanh, Medgyesy, 1989). Были получены также межродовые цибриды, которые, несмотря на отдаленность родства ядра и хлоропластов, имели нормальную зеленую окраску, как например, при слиянии ядерного генома *N. tabacum* и хлоропластов петунии (*Petunia hybrida* hort. ex E. Vilm.) (Glimelius, Bonnett, 1986; Dragoeva et al., 1998), *Salpiglossis sinuata* Ruiz et Pav. (Thanh et al. 1988), *Lycium*, *Nolana*, *Physochlaine* (Babiychuk et al., 1995), *Atropa*, *Scopolia* (Babiychuk et al., 1995; Zubko et al., 1996). Хотя хлоропласты этих растений и имели зеленую окраску, при анализе хлорофилл-связывающих белков у цибридов, имеющих ядро *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. и пластиды *Atropa belladonna* L., выяснилось, что наряду с нормальными полипептидами фотосистемы II в клетках присутствовали укороченные полипептиды (Babiychuk et al., 1995), у цибридов *N. tabacum* и *A. belladonna* также было сильно снижено количество по крайней мере одного из основных полипептидов тилакоидов (27 kDa), вероятно, хлорофилл a/b связывающего белка (Kushnir et al., 1987). Общее содержание хлорофилла в клетке, особенно у молодых листьев, так же как максимальная фотохимическая эффективность фотосистемы II, были снижены и у цибридов, несущих хлоропласты *Salpiglossis sinuata* (Peter et al., 1999). У цибридов, сочетающих хлоропласты картофеля *S. tuberosum* и ядерный геном паслена *Solanum nigrum* L., во втором поколении была снижена биомасса и содержание углеводов, при этом содержание белка и натрия оставалось неизменным, а содержание калия было повышено (Hassanein et al., 1998). Эти данные свидетельствуют о нарушенной кооперации геномов ядра и хлоропластов, хотя и не слишком сильно выраженной. Ядерно-цитоплазматический конфликт наблюдался также при слиянии протопластов табака (*N. tabacum*) и белены (*Hyoscyamus niger* L.). У регенерантных

растений, сочетающих ядерный геном табака, хлоропласты белены и рекомбинантные митохондрии, наблюдался комплексный, матерински-наследуемый синдром, включающий задержку прорастания семян, сильное снижение содержания хлорофилла и каротиноидов в семядолях и листьях, измененную морфологию семядолей и листьев, карликовость.

Недостаточность пигментов и задержка в развитии были отнесены на счет несовместимости генома и пластома, тогда как прочие аномалии - на счет несовместимости ядерного и митохондриального геномов (Zubko et al., 2001).

У цибридов, сочетающих ядро табака и пластиды другого вида белены, *N. tabacum* (+*Hyoscyamus aureus* L.), наблюдалась слабо выраженная хлорофилльная недостаточность, и по мере роста растения становились зелеными и были фертильны, по-видимому, за счет чисто ядерно-пластидной несовместимости, без влияния митохондриального генома (Zubko et al., 2002).

Цибриды, сочетающие ядерный геном табака и пластом красавки (*Atropa belladonna*) (Кушнир и др., 1986; Kushnir et al., 1987) были нормального зеленого цвета, у них даже не было нарушено содержание хлорофилла, соотношение хлорофиллов *a/b* и фотохимическая эффективность (Peter et al., 1999). В то же время, у реципрокных цибридов, сочетающих ядерный геном красавки (*A. belladonna*) и пластом табака (*N. tabacum*), был сильно выражен конфликт неродственных ядра и хлоропластов. Такие растения обладали хлорофилльной недостаточностью в форме альбинизма (Бабийчук и др., 1990; Kushnir et al., 1991). Электронно-микроскопическое исследование показало, что их пластиды были мельче, чем в норме, и лишены упорядоченных тилакоидных мембран, имея вместо них везикулярные структуры (Herrmann et al., 2003).

1.2.5. Проявление ядерно-цитоплазматического конфликта на разных стадиях жизни растения.

Несовместимость ядерного и пластидного геномов затрагивает в первую очередь структуру и функцию хлоропластов, что выражается в нарушениях хлорофилльной окраски растений, но проявления конфликта этим не ограничиваются. Зачастую страдает фертильность пыльцы и жизнеспособность зародышей (Stubbe, 1963).

У энотеры выделяют три типа ядерного генома и 5 типов пластомеров, разные комбинации которых могут быть совместимыми или несовместимыми (Stubbe, 1959). В несовместимых комбинациях пыльца может выглядеть нормально, но при этом лишена способности к прорастанию (Göpel, 1970). У растений, несущих несовместимую комбинацию генома В и пластомера IV, исследовали свойства пыльцы. Если пыльца, несущая сочетание геном-пластомер типа В-I, В-II, В-III, имела крахмальные зерна угловатой или веретеновидной формы, то у пыльцы В-IV крахмальные зерна были почти круглые. Такая пыльца почти не формировала пыльцевых трубок, но эта инактивация была неполной, некоторые пыльцевые зерна иногда прорастали и приводили к формированию семян, однако спорофиты, гомозиготные по комбинации В-IV, практически всегда были нежизнеспособны. Если такие растения иногда вырастали, то давали нормальные с виду, но пустые семена (Stubbe, Steiner, 1999). В некоторых случаях было зарегистрировано снижение фертильности пыльцы за счет нерасхождения хромосом в мейозе (Chapman, Mulcahy, 1997). Если в норме у энотеры наблюдается двуродительское наследование пластид, то при ядерно-цитоплазматическом конфликте дисфункция пыльцы приводила к снижению частоты переноса отцовских пластид к потомству (Chiu, Sears, 1993).

1.2.6. Ядерно-цитоплазматическое взаимодействие у злаков.

У злаков довольно много и тщательно изучали эффект замещения цитоплазмы при бэк-кроссировании, которое приводило к формированию так называемых аллоплазматических линий, сочетающих ядерный геном пшеницы *Triticum aestivum* L. и цитоплазму разных видов *Aegilops* L. (Kihara, 1951). Наиболее обычным проявлением замещения цитоплазмы являлась мужская стерильность, хотя не всегда было понятно, за счет какого компонента цитоплазмы возникал конфликт, пластидного или митохондриального. Вероятно, оба эти компонента имеют влияние на фертильность растений при замещении цитоплазмы путем возвратных скрещиваний. У ячменно-пшеничных гибридов, сочетающих цитоплазму ячменя с ядерным геномом пшеницы, часто наблюдалась стерильность. Однако, при бэк-кроссировании появление фертильных форм коррелировало с гетероплазмией и повышением доли как митохондриальных, так и хлоропластных маркеров, происходящих от пшеницы (Aksyonova et al., 2005; Першина и др., 2014). При этом восстановлению фертильности способствовали аллели ядерных генов, происходящих от сорта Пиротрикс 28, но не Саратовская 29 (Першина и др., 2012). Подобным образом, почти исключительно отцовские варианты митохондриальной ДНК были представлены у гибридов, сочетающих цитоплазму ржи с ядерным геномом пшеницы, так называемых секалотритикум (Синявская и др., 2005). По ходу того, как в течение 7-8 поколений самоопыления после второго бэк-кросса растения обретали фертильность, хлоропластная ДНК также обогащалась отцовской формой, что делало эти гибриды похожими по составу ядерной и цитоплазматической ДНК на реципрокную комбинацию, так называемую тритикале (Синявская и др., 2004).

У аллоплазматических гибридов, полученных от скрещивания более близкородственных видов и родов, сочетающих цитоплазму *Aegilops* и ядерный геном мягкой пшеницы, фертильность пыльцы сильно страдала,

падающая вплоть до нуля уже после 4 поколения бэк-красса, при этом сохранялась нормальная женская фертильность (Tsunewaki, 1993; Tsunewaki et al., 1996). ДНК органелл при этом наследовалась строго по материнской линии. Также, как и в случае ячменно-пшеничных гибридов, разные сорта пшеницы по-разному реагировали на замещение цитоплазмы (Tsunewaki, 1993), и цитоплазма от разных сортов и видов пшеницы и *Aegilops* имела разный эффект на фертильность пыльцы (Tsunewaki et al., 1996), а также на появление мозаичной окраски листьев (Mukai, Tsunewaki, 1976).

Наблюдались и другие проявления ядерно-цитоплазматического взаимодействия, такие как пистиллоидия, образование беззародышевых семян, появление гаплоидных и близнецовых проростков, снижение жизнеспособности растений, задержка колошения (Tsunewaki, 1993), уменьшенный размер растений (Ohtsuka, 1991; Simons et al., 2003).

Масштабный анализ транскриптома показал, что у растений аллоплазматических линий, сочетающих ядро от мягкой пшеницы, *T. aestivum*, с цитоплазмой близких родственников, *Ae. uniaristata* Vis. и *Ae. tauschii* Coss., и более дальнего родственника, *Hordeum chilense* Roem. et Schult., по сравнению с эуплазматическими контрольными линиями, изменена транскрипция большого числа генов, от 11, в присутствии цитоплазмы *Ae. uniaristata* до 540, в присутствии цитоплазмы *H. chilense*. В разных аллоплазматических линиях набор генов с измененной экспрессией различался, при этом 7 генов были общими для всех трех источников чужеродной цитоплазмы, два из них, у которых экспрессия была повышена, кодировали фермент матуразу с локализацией в хлоропластах и митохондриях, и пять генов со сниженной экспрессией принадлежали хлоропластному геному (Crosatti et al., 2013).

1.3. Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости.

1.3.1. Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости у злаков.

Для выяснения генетических основ ядерно-цитоплазматического конфликта у злаков были использованы случаи несовместимости некоторых видов пшеницы с цитоплазмой *Ae. tauschii* (цитируемые авторы использовали название *Ae. squarrosa* L.) (Ohtsuka, 1991) и *Ae. longissimum* (Anderson, Maan, 1995).

Была получена серия аллоплазматических линий на основе цитоплазмы *Ae. tauschii* с ядерным геномом разных представителей культурной пшеницы, относящейся к группам спельты (геномный состав AABBDD), эммер (геномный состав AABB), пшеницы Тимофеева (геномный состав AAGG) (Ohtsuka, 1991). В ходе бэк-кроссирования пылью гексаплоидных пшениц (AABBDD), к шестому поколению фертильность и нормальная конфигурация хромосом (21 бивалент) восстанавливались, не было заметных морфологических или физиологических нарушений. В случае использования пшеницы типа эммер (AABB) в качестве рекуррентного родителя фертильность растений уже к четвертому поколению падала до такой степени, что дальнейшее бэк-кроссирование становилось невозможно. Опыт можно было продолжить лишь после того, как в четвертом поколении были обнаружены два исключительных растения с хромосомной конфигурацией 14 бивалентов + 2 унивалента ($n=30$), одно из которых было использовано в качестве материнского растения для дальнейшего бэк-кроссирования. После шестого поколения, несмотря на продолжающееся бэк-кроссирование, сохранялась конфигурация хромосом 14 бивалентов + 1 унивалент ($n=29$). Таким образом, все полученные аллоплазматические линии с цитоплазмой *Ae. . tauschii* и ядерным геномом тетраплоидных пшениц с геномным составом AABB несли одну добавочную хромосому, при этом они имели сильно сниженную фертильность пыльцы (в среднем 25%), низкую сменную

фертильность при бэк-кроссировании (в среднем 24%) и крайне низкую (0-4%) семенную фертильность при самоопылении, за исключением линии с ядерным геномом *T. turgidum* L.. Эти данные свидетельствовали о том, что для совместимости ядерных геномов типа AABB с цитоплазмой *Ae. tauschii* было необходимо наличие генетических факторов, локализованных в добавочной хромосоме. Спорофиты и мужские гаметофиты без добавочной хромосомы погибали. Гибель спорофитов проявлялась в появлении абортивных семян. Наличие двух добавочных хромосом приводило к появлению карликовых растений. Анализ набора аллоплазматических моно-трисомных линий пшеницы сорта Chinese Spring, у которых одна из хромосом набора D была замещена на гомеологичную хромосому из набора A или B привел к заключению, что генетический фактор или факторы, ответственные за совместимость ядра и цитоплазмы, находятся в хромосоме 1D. Эквивалентные фактор(ы), обеспечивающие совместимость с цитоплазмой *Ae. tauschii* также присутствовали в хромосоме 1C *Ae. caudata* L. и в геноме тетраплоидных пшениц типа пшеницы Тимофеева (AAGG) (Ohtsuka, 1991).

Добавочная хромосома 1D, обеспечивающая совместимость тетраплоидных геномов типа AABB с цитоплазмой *Ae. tauschii*, может попадать либо не попадать в женские гаметы (не следуя при этом менделевским соотношениям). Вследствие этого при опылении аллоплазматических линий пыльцой рекуррентного родителя, не несущего добавочной хромосомы, в потомстве наблюдалось расщепление, формировались жизнеспособные семена (несущие хромосому 1D, $2n=29$, $3n=44$) и абортивные семена (не несущие хромосому 1D, $2n=28$, $3n=42$). При опылении пыльцой некоторых тетраплоидных пшениц класс зародышей, не несущих хромосому 1D, формировал жизнеспособные, но невыполненные семена, из которых вырастали карликовые растения. При выращивании на холоду (осенняя и зимняя посадка в поле) у них развивалась мозаичная хлорофилльная окраска. Линии, которые при использовании в качестве

источника пыльцы давали начало abortивным семенам, были отнесены к типу I и классифицированы как несовместимые с цитоплазмой *Ae. tauschii*. Линии, которые порождали невыполненные, но жизнеспособные семена, были классифицированы как частично совместимые с цитоплазмой *Ae. tauschii* и отнесены к типу III. Тип II, полностью совместимый с *Ae. tauschii*, был представлен пшеницами типа пшеницы Тимофеева. Возможность получения карликовых растений, существующих без добавочной хромосомы, позволила провести генетический анализ, то есть анализ расщепления фенотипов в разных скрещиваниях, в частности с несовместимыми линиями (тип I) и частично совместимыми (тип III). В потомстве от скрещиваний появлялись карликовые и ослабленные растения, которые могли проявлять или не проявлять мозаичную хлорофилльную окраску. По результатам анализа фенотипов постулировалось наличие расщепления по двум ядерным генам. Было сделано заключение, что один из ядерных генов, обозначенный *Cp*, был вовлечен во взаимодействие с хлоропластами, он имел аллельное состояние *Cp1* у несовместимых линий, и аллельное состояние *Cp2* у частично совместимых линий. Гомозиготы *Cp1 Cp1* погибали, приводя к появлению abortивных семян, гетерозиготы *Cp1 Cp2* имели мозаичную хлорофилльную окраску и давали невыполненные семена, гомозиготы *Cp2 Cp2* имели нормальную хлорофилльную окраску. Второй ядерный ген, как предполагалось, имел отношение к размерам и жизнеспособности растений, он был обозначен *Cv*, имел аллельное состояние *Cv1* у несовместимых линий, и аллельное состояние *Cv2* у частично совместимых линий. Гомозиготы *Cv1 Cv1* были карликовыми, гетерозиготы *Cv1 Cv2* были слабыми растениями в отсутствие мозаицизма хлорофилльной окраски (у гомозигот *Cp2 Cp2*) либо карликовыми, если при этом имели мозаичную хлорофилльную окраску (у гетерозигот *Cp1 Cp2*), гомозиготы *Cv2 Cv2* были слегка ослабленными растениями (Ohtsuka, 1991). Для дальнейшего генетического анализа фактор(ы), обеспечивающий совместимость генома *T. timopheevii* с цитоплазмой *Ae. tauschii*, обозначенный *Ncc-tmp* (от англ. Nucleus-cytoplasm

compatibility – timopheevii, совместимость ядра и цитоплазмы - тимофеевская) и, вероятно соответствующий описанному Ohtsuka (1991) аллелю *Sp3*, был перенесен в геном *T. durum* Desf. сорта Langdon путем скрещивания и последующего бэк-кроссирования с использованием пыльцы Langdon на фоне цитоплазмы *Ae. tauschii*. В отсутствие добавочной хромосомы 1D линия сохраняла в своем геноме фактор *Ncc-tmp*, который был необходим для формирования жизнеспособных семян. Были подобраны RAPD (от англ. Random Amplified Polymorphic DNA – случайно амплифицированная полиморфная ДНК) маркеры, сцепленные с фактором совместимости, происходящим от *T. timopheevii* Zhuk., 4 маркера селективно амплифицировались из геномов, несущих *Ncc-tmp* (Asakura et al., 1997, a). Один из маркеров S13₈₃₀ амплифицировался из генома *T. timopheevii* и *T. durum*, но не *Ae. tauschii* (Asakura et al., 1997, a). Благодаря этому свойству была определена его хромосомная локализация с использованием серии дисомных линий сорта Langdon, у которых одна из хромосом набора А или В была замещена на гомеологичную хромосому набора D. Саузерн-блот гибридизация геномной ДНК дисомных линий с использованием в качестве пробы меченого зонда S13₈₃₀ показала, что специфический сигнал пропадает из генома *T. durum* cv. Langdon вместе с замещением хромосомы 1А на хромосому 1D. Тем самым *Ncc-tmp* фактор был соотнесен с хромосомой 1А и обозначен *Ncc-tmp1A* (Asakura et al., 1997, b). Были проведены анализирующие скрещивания, чтобы определить, есть ли дополнительные факторы несовместимости в G геноме *T. timopheevii* (Asakura et al., 1997, b; 2000). Для этого получали гибриды *T. timopheevii* и *T. durum* на фоне цитоплазмы *Ae. tauschii*. Такие гибриды гетерозиготны по факторам совместимости, при этом аллели, полученные от *T. timopheevii* функциональны и доминантны, а аллели от *T. durum* не функциональны, то есть не обеспечивают совместимости с цитоплазмой *Ae. tauschii*. Если эти гетерозиготы ввести в анализирующее скрещивание в качестве доноров цитоплазмы, а в качестве источника пыльцы использовать виды пшеницы,

несущие рецессивные аллели факторов совместимости, можно определить расщепление совместимых и несовместимых аллелей, что фенотипически выражается как соотношение выполненных и abortивных семян. Если исходная совместимая линия имеет один локус совместимости, и, соответственно, гетерозигота несет один совместимый доминантный аллель, то в результате бэк-кросса ожидается расщепление 1 : 1. Если исходная совместимая линия имеет два локуса совместимости, в геноме А и в геноме G, гетерозигота несет два совместимых доминантных аллеля, и в потомство бэк-кросса может попасть либо аллель из генома А, либо аллель из генома G, либо оба, либо ни одного. Первые три варианта, в отличие от последнего, связаны с формированием жизнеспособных семян, и ожидается расщепление 3 : 1, хотя возможны отклонения за счет того, что хромосомы генома G не всегда передаются в следующее поколение. Проведенный анализ расщепления в потомстве от анализирующих скрещиваний показал, что геном G *T. timopheevii* содержит функциональный аллель фактора ядерно-цитоплазматической совместимости, который был обозначен *Ncc-tmp1G* (Asakura et al., 2000).

Для более точного определения локализации фактора *Ncc-tmp1A* была проведена Саузерн-блот гибридизация ДНК-клонов хромосомы 1А *T. durum* сорта Langdon, у которого этот фактор был интрогрессирован от *T. timopheevii*. Использование в качестве зонда меченых RAPD маркеров, тесно сцепленных с *Ncc-tmp1A* (Asakura et al., 1997, b), показало, что данный локус вместе с прилегающим районом длиной около 9 сМ располагается в околоцентромерном районе хромосомы 1А (Asakura et al., 2000). Такое расположение генов совместимости, вероятно, консервативно среди злаков. Генетический фактор, обеспечивающий совместимость генома мягкой пшеницы (сорт Chinese Spring) с цитоплазмой ржи *Secale cereale* L., по-видимому, расположен в околоцентромерном районе хромосомы 1R ржи (Murata et al., 1992).

Другая серия экспериментов была связана с генетическим анализом факторов, обеспечивающих совместимость геномов тетраплоидных пшениц с цитоплазмой *Aegilops longissima* Schweinf. et Muschl. Как и в случае с цитоплазмой *Ae. tauschii*, была получена совместимая линия *T. turgidum* путем интрогрессии гена совместимости, обозначенного *scs* (от англ. species cytoplasm specific – видо-специфичная цитоплазма), от *T. timopheevii*. В присутствии интрогрессированного аллеля, *scs^{ti}*, формировались жизнеспособные семена, но при этом же наблюдалась полная мужская стерильность (Maan, 1992, a). Восстановление фертильности наблюдалось при интрогрессии еще одного гена, обозначенного *Vi* (от англ. vitality – жизненность) (Maan, 1992, b), который, по-видимому, возник в результате мутации в локусе типа *Rf* (от англ. Restoration of fertility – восстановление фертильности при ЦМС) у аллоплазматической линии мягкой пшеницы, имеющей цитоплазму от *Ae. cylindrica* Host (Maan, 1992, c). Был проведен гибридологический анализ, при котором в потомстве от скрещиваний наблюдалось расщепление по генам *scs* и *Vi*. Были подобраны RFLP-маркеры (от англ. Restriction Fragment Length Polymorphism – полиморфизм длины фрагментов рестрикции), которые косегрегировали с *scs* и *Vi*. По результатам анализа ген *Vi* был локализован в дистальной части хромосомного плеча 1BS, и ген *scs* – в хромосомном плече 1AL вблизи от центромеры (Anderson, Maan, 1995), практически там же, где независимо интрогрессированный *Ncc-tmp1A* (Asakura et al., 1997, b). Весьма вероятно, что *Ncc-tmp1A*, обеспечивающий совместимость ядерного генома *T. turgidum* с цитоплазмой *Ae. tauschii*, и *scs^{ti}*, обеспечивающий совместимость с цитоплазмой *Ae. longissima*, представляют собой один и тот же локус (Asakura et al., 2000).

Локализация *scs^{ti}* на генетической карте была проведена по результатам расщепления в потомстве от скрещивания аллоплазматических линий, что могло давать искажения частот генотипов из-за их сниженной жизнеспособности (Anderson, Maan, 1995). Поэтому было проведено картирование *scs^{ti}* с использованием эуплазматических линий, имеющих

цитоплазму твердой пшеницы. Одна из родительских линий была представлена исходным сортом Langdon (с замещенной хромосомой 1A от *T. dicoccoides*) и вторая – гомозиготной линией с интрогрессированным аллелем *scs^{ti}* от *T. timopheevii*. У полученных в результате такого скрещивания потомков F₂ определяли генотип путем анализирующего скрещивания в качестве доноров пыльцы с тестерной аллоплазматической линией, имеющей цитоплазму от *Ae. longissimum* и ядерный геном твердой пшеницы, несущий одну копию аллеля *scs^{ti}*. Растения F₂, несущие две функциональные копии *scs^{ti}* при скрещивании давали только выполненные жизнеспособные семена, растения с одной функциональной копией *scs^{ti}* (гетеро- или, возможно, гемизиготы) давали расщепление 3 : 1 выполненных семян к щуплым, нежизнеспособным, и растения, лишенные функциональной копии *scs^{ti}*, давали расщепление 1 : 1 выполненных семян к щуплым. Также у всех растений анализировали аллельное состояние ДНК-маркеров типа RFLP, AFLP (от англ. Amplified Fragment Length Polymorphism – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов), микросателлитов. На основании полученных данных была построена генетическая карта околоцентромерного района хромосомного плеча 1AL, на которую был нанесен локус *scs* и ближайшие к нему окаймляющие микросателлитные маркеры, *Xbcd12* и *Xbcd1449-1A.2* на расстоянии 2,3 и 0,6 сМ, соответственно. Эти расстояния были получены после удаления из анализа 11 растений, которые представляли собой двойных кроссоверов (Simons et al., 2003). В дальнейшем численность картирующей популяции была увеличена до 2158 растений, и разработаны дополнительные молекулярные маркеры на основе синтении геномов пшеницы и расшифрованных геномов *Oryza* и *Brachypodium*. В итоге была получена генетическая карта участка хромосомы 1A. На карту были поставлены ближайшие к *scs^{ti}* маркеры, *Xwmc120* и *Xtc252572-2-a* на расстоянии 0,52 и 0,61 сМ, соответственно (Seth, 2009).

Как обсуждалось выше, присутствие в геноме тетраплоидной пшеницы дополнительной хромосомы 1D, происходящей от *Aegilops* или *T. aestivum*, необходимо для сосуществования в аллоплазматических линиях генома AABB и цитоплазмы *Aegilops* (Ohtsuka, 1991; Maan, 1992, a). Генетический фактор, обеспечивающий совместимость хромосомы 1D мягкой пшеницы с цитоплазмой *Ae. longissima*, обозначенный *scs^{ae}*, был картирован при помощи метода "радиационных гибридов" в 1DL хромосомном плече (Hossain et al., 2004, a). Для этого использовали аллоплазматическую линию пшеницы *T. turgidum*, у которой часть хромосомы 1A была замещена на практически целую хромосому 1D от *T. aestivum* (Hossain et al., 2004, b). Под действием радиации в хромосомах происходят разрывы, при этом какие-то фрагменты хромосом теряются, другие – сохраняются. Чтобы компенсировать эффект потери части материала хромосом, растения, выращенные из облученных семян, скрещивали с эуплазматической линией *T. turgidum* (геномный состав AABB), в результате чего получались гетерозиготные растения, так называемые радиационные гибриды, у которых вредоносный эффект разрывов хромосом из геномов A и B был скомпенсирован присутствием нормальных хромосом. Однако добавочная хромосома 1D оказывалась в гемизиготе, поэтому нарушения ее целостности не были скомпенсированы. В частности, под действием радиации некоторые фрагменты хромосомы терялись, что определялось анализом молекулярных маркеров, специфичных для хромосомы 1D. Поскольку аллель *scs^{ae}* обеспечивает совместимость с цитоплазмой *Ae. longissima*, он с необходимостью присутствовал у всех жизнеспособных растений. Восемь молекулярных маркеров, покрывающих участок около 8,3 Мб, которые также неизменно присутствовали у радиационных гибридов, определили положение локуса *scs* в хромосомном плече 1DL (Hossain et al., 2004, a). Впоследствии в анализ радиационных гибридов были вовлечены новые маркеры, и была использована эуплазматическая линия *T. turgidum*, у которой 1A хромосома была замещена на 1D. У растений, выращенных из

облучения семян, определяли аллельное состояние локуса *scs* по результатам скрещивания и расщепления фенотипа семян (выполненные против щуплых), а также наличие или отсутствие молекулярных маркеров, специфичных для хромосомы 1D. В результате ориентировочная длина участка хромосомы 1D, на котором может содержаться *scs^{ae}*, была сокращена до 1,1 Мб. На основании синтении геномов пшеницы, риса, сорго (*Sorghum*), коротконожки (*Brachypodium*) в этом районе предсказаны 16 генов (Michalak de Jimenez et al., 2013).

1.3.2. Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости у однолетней люцерны (*Medicago truncatula*).

Асимметрия в фенотипах потомков наблюдалась при реципрокных скрещиваниях двух местных форм однолетней люцерны *Medicago truncatula* Gaertn., происходящих из Израиля. При опылении темнолистной формы пыльцой светлолистной, формировались гибриды, у которых хлорофилльная окраска варьировала от почти бесцветной до бледно-зеленой и зеленой. Встречались листья с бледными и зелеными секторами. Растения обладали низкой семенной продуктивностью, 2-3 семени на боб против 8-9 у родительских форм. Потомки от реципрокного скрещивания выглядели нормально, иногда можно было наблюдать темно-зеленые сектора. На определенной фазе развития возникали бледные листья, которые впоследствии зеленели. Содержание хлорофилла у обоих типов гибридов было снижено по сравнению с родительскими формами, в том числе светлолистной. У потомков, где материнской была темнолистная форма, содержание хлорофилла было примерно в 2,5 раза ниже, чем у реципрокных гибридов. Завязываемость семян была одинаково низкой, 2-3 семени на боб (Lilienfeld, 1962). После серии бэк-кроссов были получены линии, предположительно имеющие цитоплазму от одной линии и ядро от второй. Поскольку они имели нормальную хлорофилльную окраску, автор (Lilienfeld, 1962) считал, что ядерные геномы функционировали в чужой цитоплазме так

же хорошо, как и в собственной, при этом неявно предполагалось, что цитоплазма наследовалась по материнской линии.

Были проведены скрещивания мозаичных растений с нормальными зелеными растениями из исходной линии и получены расщепления, соответствующие менделевскому соотношению 3 : 1, что позволило сделать вывод о наличии одного ядерного гена, который приводил к ядерно-цитоплазматической несовместимости и появлению мозаичных растений (Lilienfeld, 1965). Впоследствии было показано, что у *M. truncatula* хлоропласты наследуются от обоих родителей (Matsushima et al., 2008), поэтому вывод Lilienfeld (1962) о нормальном фенотипе линий с чужеродными ядром и цитоплазмой не может считаться окончательным без дополнительной проверки источника пластид. Что касается моногенного наследования ядерно-цитоплазматической несовместимости, автор (Lilienfeld, 1965) отмечал значительную вариабельность соотношения фенотипических классов в разных скрещиваниях, что хорошо согласуется с не-менделевским характером наследования цитоплазмы.

1.3.3. Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости у акации.

Проводились скрещивания двух видов таннино-носных акаций, зеленой, (*Acacia decurrens* Willd.) и черной, (*A. mollissima* Willd.) с целью повышения качества таннина. Улучшения коммерческих свойств добиться не удалось, но в результате скрещиваний были получены генетические данные (Moffett, 1956). При межвидовом скрещивании образовывались малоплодовитые гибриды F₁, которые имели хлорофилльную недостаточность разной степени выраженности. По мере роста растений восстанавливалась нормальная голубовато-зеленая окраска, что затрудняло классификацию растений на хлортичные и нормальные. Фенотипы растений от двух направлений скрещивания были похожи. При расщеплении в F₂ хлорофилльная окраска варьировала в более широких пределах, от белой и очень бледно-зеленой до

зеленой и голубовато-зеленой, размах этой вариабельности был тем больше, чем бледнее была окраска исходного растения F_1 . Явных менделевских соотношений не было выявлено, возможно, в связи с трудностями в классификации фенотипа. Таким образом, данные по расщеплению в F_2 не позволяли сделать определенные выводы о генетической основе гибридного хлороза. Были проведены возвратные скрещивания, в которых гибрид F_1 от скрещивания зеленой акации с черной опыляли пыльцой черной акации либо зеленой. При опылении черной акацией подавляющее большинство потомков имели нормальную хлорофилльную окраску, хотя встречались и хлортичные растения. При опылении же зеленой акацией, которая была донором цитоплазмы гибридных растений, используемых в качестве материнских, в потомстве наблюдалось расщепление фенотипов, похожее на расщепление в F_2 . При этом была высока доля (ок. 37%) химер, как секторных так и периклиналильных. На основании данных по расщеплению в разных типах скрещиваний был сделан вывод, что геном зеленой акации содержит генетический фактор(ы), вызывающий нестабильность хлорофилльной окраски (появление химер), при этом его действие связано не с угнетением функции пластид из чужеродной цитоплазмы, а с не вполне правильным взаимодействием продуктов ядерных аллелей, происходящих от зеленой и черной акации (Moffett, 1965). Как и в случае с однолетней люцерной, данный вывод нельзя считать окончательным до выяснения источника цитоплазмы.

1.3.4. Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости у энотеры.

У энотеры были проведены анализирующие скрещивания для выяснения генетических основ возникновения гибридного хлороза в несовместимых комбинациях разных типов ядерных и цитоплазматических геномов. Ядерные геномы, встречающиеся у близкородственных видов энотеры можно классифицировать на три типа, А, В и С, а пластидные геномы

(пластомы) - на пять типов, I - V (Stubbe, 1959). Разные комбинации геномов и пластомов имеют разные степени совместимости. Так, при скрещивании видов, имеющих геном А и пластом I, *Oenothera hookeri* Torr. et A. Gray или *O. elata* Kunth с видом *O. argillicola* Mack., имеющим геном С и пластом V, образуются гетерозиготы по геномам А и С, имеющие пластом I или V в зависимости от направления скрещивания. Такие гибриды, полученные от обоих направлений скрещивания, имеют сильно выраженный хлороз и погибают на стадии проростков из-за несовместимости генома А с пластомом V и генома С с пластомом I. Поэтому получить F₂ от таких скрещиваний невозможно. Эта трудность была преодолена посредством использования промежуточного партнера, линии *O. argillicola*, у которой пластом V был замещен на пластом IV (Stinson, 1960), обладающий широкой совместимостью. Когда эту линию скрещивали с *O. elata*, получались гибриды, гетерозиготные по геномам А, С и несущие пластиды от обоих родителей. Части растений, имеющие пластом IV, были зелеными, а участки имеющие пластом I, были хлоротичными, но на них образовывались цветки, которые можно было использовать для дальнейших бэк-кроссов. Таким образом было получено потомство от возвратного скрещивания А,С x А,А на фоне пластома I. Потомки были либо зелеными, либо имели различную степень хлороза, которую, к сожалению, было трудно оценить, в том числе из-за того, что растения с возрастом зеленели. Тем не менее, их классифицировали на номальные и хлортичные и путем цитологического анализа мейотических клеток определяли, какие из хромосом набора С (участвующие в формировании кольца из шести хромосом, кольца из четырех хромосом, свободных бивалентов) были ассоциированы с хлортичным фенотипом. По результатам анализа был сделан вывод, что присутствие индивидуальных чужеродных хромосом не приводило к развитию хлороза, но различные их комбинации давали разную степень хлороза, который был тем сильнее, чем больше сторонних хромосом присутствовало в геноме гибридов, и поэтому наиболее всего страдали

гибриды F_1 . Подобные же результаты были получены и в другом скрещивании, призванном оценить влияние хромосом набора А на совместимость с пластомом V, А,С x С, С на фоне пластома V (van der Meer, 1974).

Проводился генетический анализ несовместимости генома А и пластома III, которая в указанной комбинации проявляется в виде хлорофилльной недостаточности, пропадающей по мере роста растений (окраска типа *virescent*), что позволяет получать и изучать расщепление в потомстве. Было проведено скрещивание линий *O. elata* (геном А) с *O. grandiflora* L. Hér. ex Aiton. (геном В), при этом обе родительские линии имели пластом III, перенесенный путем скрещиваний от *O. glazioviana* Micheli. Были получены растения F_2 , у которых анализировали большое число молекулярных маркеров с целью создания генетической карты *Oenothera*. Часть растений имела нормальную зеленую окраску, а часть – хлорофилльную недостаточность разной степени. К сожалению, определить точное соотношение зеленых и не-зеленых растений не удалось из-за трудностей в классификации, но было ясно, что в популяции F_2 происходило расщепление по меньшей мере двух ядерных фактора, приводящих к несовместимым ядерно-пластидным комбинациям. Анализ молекулярных маркеров позволил поставить один из таких фактора на генетическую карту хромосомы 4 и второй – хромосомы 7 (Rauwolf, 2008).

В литературе имеются указания, что у энотеры два ядерных гена, *lor* и *fl*, в комбинации *lor lor Fl Fl* приводят к возникновению эмбриональной летальности при несовместимости генома и пластома. Гомозиготные растения *lor lor*, не погибают, но имеют сильную хлорофилльную недостаточность (Renner, 1943, цит. по Greiner et al., 2011).

1.3.5. Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости у зантедексии.

У декоративного растения зантедексии ядерно-цитоплазматический конфликт возникает при скрещивании вечнозеленого вида *Z. aethiopica* (AE) с представителями группы видов с зимним покоем, в частности, *Z. odorata* P.L. Perry (OD), у гибридов F₁ от разных направлений скрещивания пластиды OD дают фенотип albina и пластиды AE – фенотип virescent (Yao et al., 1994). Для выяснения генетических основ несовместимости были получены F₁ от скрещивания этих видов, а затем было изучено соотношение фенотипов с нарушением хлорофилльной окраски при расщеплении в F₂, либо в возвратных скрещиваниях. В популяции F₂ от скрещивания AE × OD возникали зеленые, зеленеющие (virescent) и белые растения, хотя в F₁ все растения были зеленеющие, что свидетельствовало о расщеплении ядерных генов, вовлеченных в конфликт. Различить зеленые и зеленеющие растения было сложно, а число белых растений, которые существовали лишь в культуре на питательных средах (Yao et al., 1995), составило 18 из 58 (около 1/3) культивированных зародышей. В возвратном скрещивании (AE × OD) × OD доля белых растений составила 5/25 (не противоречит 1/4), и в скрещивании OD × (AE × OD) - 53/98 (не противоречит 1/2), при этом в расщеплении наблюдались также зеленеющие (virescent) растения. Эти данные указывают на то, что в возникновении конфликта ядра и пластид у зантедексии участвуют минимум два ядерных гена (Yao et al., 2000).

1.3.6. Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости у других растений.

При скрещиваниях разных видов вечнозеленых азалий из рода *Rhododendron* L. (EV, от англ. evergreen – вечнозеленый) с желтоцветковой формой японского рододендрона *R. japonicum* (A. Gray) Kron (JP, от англ. japaneese – японский) наблюдалась односторонняя ядерно-

цитоплазматическая несовместимость. Большинство потомков являлись альбиносами из-за несовместимости EV-пластид с JP-ядерным геномом, и нормальные зеленые растения возникали лишь в том случае, если пластидная ДНК наследовалась от JP по отцовской линии (Ureshino et al., 1999).

Скрещивание диплоидных форм, 2х EV (геномный состав EE) \times 2х JP (геномный состав JJ), дает потомство типа albina с геномной конституцией EJ. Были проведены скрещивания рододендронов разной ploидности, 4х EV \times 4х JP и 2х EV \times 4х JP, что дает потомства с геномной конституцией EEJ и EJ, соответственно, у них также наблюдалась несовместимость ядра и пластид. Это свидетельствовало о том, что геном JP несет доминантный фактор или факторы, подавляющие развитие хлоропластов EV. Однако растения с геномной конституцией EEJ от скрещивания 4х EV \times 2х JP имели зеленую окраску, хотя и несли материнские пластиды EV. Таким образом, несовместимость пластид EV с ядерным геномом JP могла быть скомпенсирована повышением доли EV в ядерном геноме потомков (Ureshino et al., 2010).

1.4. Молекулярно-генетические основы ядерно-цитоплазматической несовместимости.

Молекулярно-генетические основы несовместимости ядерного генома с пластидным были изучены в двух случаях, у цибридов пасленовых и у энотеры. У табака был установлен пластидный фактор, вызывающий ядерно-цитоплазматическую несовместимость. Ядерные участники конфликта не были описаны.

1.4.1. Молекулярно-генетические основы ядерно-цитоплазматической несовместимости у пасленовых.

Один из наиболее ярких примеров ядерно-цитоплазматической несовместимости представляют собой цибриды пасленовых, полученные путем слияния протопластов с дальнейшей регенерацией в культуре клеток.

Например, растения, несущие ядерный геном красавки (*Atropa belladonna*) и хлоропласты табака (*Nicotiana tabacum*) вообще лишены хлорофилльной пигментации (фенотип типа albino) (Бабийчук и др., 1990; Kushnir et al., 1991). У таких растений были изучены молекулярно-генетические основы несовместимости с применением генетического подхода (Schmitz-Linneweber et al., 2005). Культуры клеток с несовместимой комбинацией ядра (*A. belladonna*) и хлоропластов (*N. tabacum*) обрабатывали мутагеном нитрозометилмочевинной с целью получения мутаций, которые вернули бы клеткам хлорофилльную окраску. Действительно, были получены три независимые мутации, которые приводили к появлению зеленой окраски. Путем переноса хлоропластов между культурами клеток с интактными ядрами было показано, что эти мутации произошли в геноме хлоропластов. Ранее был просеквенирован геном пластид красавки и выявлены участки, отличные от пластидного генома табака, то есть участки, потенциально вовлеченные в конфликт (Schmitz-Linneweber et al., 2002). Эти фрагменты пластидного генома табака были просеквенированы у мутантов, которые обрели совместимость с ядерным геномом красавки. У трех мутантных линий были обнаружены нуклеотидные замены, специфичные для каждой линии, а также замена, общая для всех линий, превращающая 264-й кодон в гене *atpA*, кодирующем альфа субъединицу АТФазы, из ССС (пролин) в СТС (лейцин). В норме у табака основание цитозина, которое подверглось мутации, редактируется на уровне мРНК с превращением его в урацил, тем самым превращая ССС-Pro кодон в СUC-Leu. У красавки же лейцин кодируется на уровне ДНК кодоном СТС (Schmitz-Linneweber et al., 2002). Таким образом, идентифицированная мутация не меняла аминокислотной последовательности белка AtpA, но отменяла необходимость редактирования РНК. У растений с ядром красавки и пластидами табака транскрипт *atpA* не редактировался, а поскольку имеются свидетельства тому, что редактирующие факторы закодированы в ядре (Воск, 2000), то по всей вероятности, геном красавки лишен фактора, способного редактировать

цитозин в 264-м кодоне гена *atpA*. Поэтому этот кодон так и остается ССС, и полипептид, который считывается с неотредактированной мРНК, содержит аминокислотную замену лейцина на пролин в 264-й позиции, L264P.

Внедрение мутаций в пластидный геном табака с применением техники трансформации хлоропластов показало, что лейцин в 264-й позиции необходим для нормальной работы АТФазы и что отмена необходимости редактирования мРНК гена *atpA* при замене С на Т приводит к восстановлению зеленой окраски цибридов, в противном случае имеющих фенотип *albino*. Таким образом, фенотип растений с несовместимой комбинацией ядра красавки и хлоропластов табака определяется главным образом невозможностью редактировать специфичный сайт в транскрипте, считываемом с гена *atpA*, кодирующего альфа субъединицу АТФазы (Schmitz-Linneweber et al., 2005).

1.4.2. Молекулярно-генетические основы ядерно-цитоплазматической несовместимости у энотеры.

У энотеры выделяют три типа ядерных геномов (А, В, С) и пять типов (I - V) пластидных геномов (пластомов), которые в разных сочетаниях дают совместимые либо несовместимые комбинации (Stubbe, 1959; 1989). Была сделана попытка определить молекулярные детерминанты в геноме пластид, вовлеченные в ядерно-цитоплазматическую несовместимость. Были определены полные нуклеотидные последовательности всех пяти типов пластидных геномов (Greiner et al., 2008, a), после чего сопоставлялись варианты нуклеотидных последовательностей с паттерном совместимости/несовместимости их носителей. Если какой-либо вариант первичной структуры ДНК обнаруживался во всех пластомах, совместимых с определенным геномом (например, А), а все несовместимые пластомы имели другой структурный вариант, то такой локус считался кандидатом на роль участника ядерно-цитоплазматического конфликта (Greiner et al., 2008, b). К сожалению, межвидовая изменчивость пластомов оказалась слишком высока,

при попарном сравнении выявлялось несколько тысяч различий. Путем сопоставления нуклеотидных последовательностей пластидных геномов, участвующих в совместимых и несовместимых комбинациях с одним и тем же ядерным геномом, число потенциальных участников конфликта было сведено к 19 белок-кодирующим локусам и 63 промоторным участкам в межгенных промежутках, из которых 38 составили предсказанные сайты связывания РНК-полимеразы, кодируемой в пластидах (PEP, от англ. Plastid-encoded Polymerase) и 25 – предсказанные сайты связывания РНК-полимеразы, кодируемой в ядре (NEP, от англ. Nuclear-encoded Polymerase). Участие в конфликте некоторых генов, например, кодирующих субъединицы НАДФ дегидрогеназы, было сочтено менее вероятным, поскольку было показано, что их выключение в пластидном геноме табака путем мутагенеза не приводило к заметным изменениям фенотипа (Burrows et al., 1998), хотя этот вывод и оспаривался (Kofer et al. 1998). Для сужения спектра кандидатов авторы применили ряд достаточно произвольных критериев, таких, как слишком высокая изменчивость нуклеотидных последовательностей или отсутствие замен в функциональных сайтах белков, и исключили из анализа один из пластомеров, поскольку несовместимость с его участием была выражена значительно сильнее, чем в остальных комбинациях. Поскольку в одной из несовместимых комбинаций растения имели хлорофилльную недостаточность, и у них была снижена активность фотосистемы II, авторы номинировали в качестве кандидата на роль фактора, приводящего к несовместимости пластомера I с геномом АВ (то есть гетерозиготой по геномам А и В) межгенный промежуток *clpP-psbB*, содержащий делецию 148 пар оснований, которая затронула промотор гена *clpP* для NEP полимеразы и предсказанный промоторный элемент гена *psbB* для PEP полимеразы, расположенные на разных цепях ДНК (Greiner et al., 2008, b).

1.5. Заключительные замечания.

Исторически клеточные органеллы, митохондрии и хлоропласты происходят от эндосимбиотических бактерий (см. например, обзоры Малахов, 2003; Reyes-Prieto et al., 2007; Howe et al., 2008; Keeling, 2010; Green, 2011), и это отражается в том, что они сохраняют собственный геном, необходимый, но недостаточный, чтобы обеспечить полноценное функционирование своих носителей, поэтому они зависят от внутриклеточных межгеномных взаимодействий (Даниленко, Давыденко, 2003). При этом хлоропласты и митохондрии являются своеобразными "энергетическими центрами": в хлоропластах за счет солнечной энергии идет производство питательных веществ, которые затем используются митохондриями для производства АТФ из сахаров путем окислительного фосфорилирования. Поэтому даже небольшие нарушения работы органелл могут существенно повлиять на функционирование организма.

Между клеточными геномами осуществляются многочисленные связи, как на уровне взаимодействия белков, составляющих ферментные комплексы, так и на уровне взаимодействия белков с ДНК и РНК в процессах регуляции репликации, транскрипции, редактирования, трансляции в геномах органелл. В изолированных популяциях идет коэволюция, в ходе которой ядерные гены и гены органелл "подгоняются" друг к другу, а при гибридизации отдаленных родственников обнаруживаются несоответствия между генами разных клеточных компартментов, что приводит к несовместимости. Вследствие нарушения функций органелл происходит уменьшение производства АТФ или фотосинтетической продукции (Burton et al., 2013), что приводит к снижению приспособленности гибридов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Общие замечания.

При обозначении произведенных скрещиваний материнская линия всегда указывается первой, например, WL1238 x ВИР320 означает, что на рыльце цветка из линии WL1238 наносили пыльцу ВИР320.

Для обозначения аллелей, происходящих от тех или иных линий, используется символ гена с подчеркиком и номером родительской линии, например, *PhlC_1238* и *PhlC_320*.

2.2. Видимые маркеры.

Видимыми называли такие маркеры, аллельное состояние которых определялось визуально, без дополнительных манипуляций. В работе использованы следующие аллели видимых маркеров: *a* (отсутствие антоциановой окраски), *le* (укороченный стебель), *tl-w* (листочки вместо усиков), *d* (отсутствие антоцианового кольца в пазухах прилистников), *wb* (отсутствие воскового налета на прилистниках), *gp* (желтые бобы), *b* (розовые цветки), *k* (редуцированные крылья цветка), *m* (отсутствие мраморной окраски семенной оболочки), *U-st* (антоциановые штрихи на семенной оболочке), *st* (редуцированные прилистники). Описание маркеров и их отнесение к группам сцепления можно найти на сайте <http://data.jic.bbsrc.ac.uk/cgi-bin/pgene/default.asp>.

2.3. Молекулярные маркеры.

Использованные в работе молекулярные маркеры перечислены в Таблице 1.

Таблица 1. Молекулярные маркеры, использованные для генетического анализа, идентификационные номера последовательностей, использованных для разработки праймеров, последовательности праймеров, эндонуклеазы рестрикции, выявляющие полиморфизм между аллелями WL1238 и ВИР320.

| Обозначение | Описание маркера | Идентификационный номер в публичных базах данных | Группа сцепления | Последовательности прямого и обратного праймеров (5' → 3') | Эндонуклеаза рестрикции |
|-----------------|---|--|------------------|--|-------------------------|
| <i>aatC</i> | <i>Medicago sativa</i> aspartate aminotransferase (AAT1) | L25334 | III | AATTGAGTGCTAAG CTTATTTTT GATCCAGATGGGGC AGAACCA | <i>Bst</i> NSI |
| <i>uni</i> | <i>Pisum sativum</i> UNIFOLIATA (UNI) | AF035163 | III | GGAGGCTTGGAGGA ACTTTTTCA CAATGCAATGCGTA ACAGTGAAC | <i>Taq</i> I |
| <i>Rnp33*</i> | <i>Pisum sativum</i> 33 kDa ribonucleoprotein | AF255058 | III | ATGTCTGTAACTTC CACCCT CTGTCTTCAGCAAC ACTTACT | <i>Tru</i> 9I |
| <i>Gsn</i> | <i>Pisum sativum</i> putative glutamine synthetase | AM238618 | III | CATCATCCAACGAT CCACAG CTGAATGGATCCTT AAAAATGG | <i>Taq</i> I |
| <i>PhlC*</i> | <i>Pisum sativum</i> phospholipase C | AF280748 | III | CACAGAGAATGAAG CACAATC TTCCATACCCCTGTC AAGGAAAC | <i>Hpa</i> II |
| <i>AJ832139</i> | <i>Pisum sativum</i> <i>sym7</i> gene for GRAS family protein | AJ832139 | III | ACAGAACCACCGTC CTTGAC AATAGGTGCACTAG TTTTAGCC | <i>Mnl</i> I |

Продолжение Таблицы 1.

| Обозначение | Описание маркера | Идентификационный номер в публичных базах данных | Группа сцепления | Последовательности прямого и обратного праймеров (5' → 3') | Эндонуклеаза рестрикции |
|--------------|---|--|------------------|--|-------------------------|
| <i>Vccp3</i> | TSA: <i>P. sativum</i> peapol_rep_c25 373 transcribed RNA sequence homologous to XM_003600953 <i>Medicago truncatula</i> Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase mRNA | GAMJ01025269 | III | GAGACTGAAATCG CTGAACTG GTATGTATTGATA CCAGAAGCC | <i>Fsp4HI</i> |
| <i>Cbl</i> | <i>Pisum sativum</i> calcineurin B-like protein | AY883569 | III | CCTCTCAACCCTCA AAATCATAAC ACATTGACACGTT GACACCAAT | <i>AcuI</i> |
| <i>Gpt</i> | <i>Pisum sativum</i> glucose-6-phosphate/phosphate-translocator precursor (GPT) | AF020814 | III | AAGGTTTTGGTCG GAAAGTT GTAGCTGAATTAG GGTTGCATGACT | <i>Bst4CI</i> |
| <i>Vc-3</i> | Pea vicilin | X14076 | III | AAAGTTGACAATT CCTAAAA CACTGAGTACAAC AAGGA | —** |
| <i>cri</i> | <i>Pisum sativum</i> MYB-related transcription factor PHAN1 | AF299140 | V | CCCATTTCAACTTC CTCTCTTC GCATTGCATCAAC CCCTAAT | <i>TaqI</i> |
| <i>Met2</i> | <i>Pisum sativum</i> MET mRNA for type 2 metallothionein | AB176565 | V | AACTGTGGTTGCG GTA CTAGC TTATTCTATAACTC CAAAAGGGCG | <i>RsaI</i> |

Продолжение Таблицы 1.

| Обозначение | Описание маркера | Идентификационный номер в публичных базах данных | Группа сцепления | Последовательности прямого и обратного праймеров (5' → 3') | Эндонуклеаза рестрикции |
|-------------|--|--|------------------|--|-------------------------|
| <i>Nca</i> | <i>P. sativum</i> shoot apical meristem ESTs similar to XP_002513380 Nucleolar complex-associated protein, putative [<i>R. communis</i>] | FG533805 + GH720541 | V | TAATGCTGTGCGACG ATAGG TAGGCCTGCATCACTG AACA | <i>HspAI</i> |
| <i>scr</i> | <i>Pisum sativum</i> PsSCR mRNA for SCARECROW | AB048713 | V | AATGCAAGGCTTACA ATGGC CCGAGCTACTCCAAC CACC | <i>TaqI</i> |
| <i>pnp</i> | <i>P. sativum</i> polynucleotide phosphorylase (pnp) mRNA | AF010578 | V | GCCAATCCCACCCTTC TAA CTCCCCATCCGTAAC GTAA | <i>TaqI</i> |
| <i>Apy</i> | <i>P. sativum</i> gene for apyrase, complete cds. | AB088208 | V | ATGCCTGCAATCACTT CCTC ACCATTCCAAATTCCA CCAA | <i>TaqI</i> |
| <i>rbcL</i> | Pea chloroplast gene for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase | X03853 | Plastid | TTATTATACTCCTGAC TATCAAACC TACAGAATCATCTCCA AATATCTCG | <i>HspAI</i> |
| <i>trnK</i> | <i>P. sativum</i> chloroplast, complete genome | NC_014057 c3379-4025 | Plastid | ATGTCGTATCAACGGT GAATTCTAA GAGATCTAGATCGTTC TAAATATAC | <i>Bsc4I</i> |
| <i>coxI</i> | pea mitochondrial <i>coxI</i> gene for cytochrome oxidase subunit I | X14409 | Mitochondria | TGGTAATTGGTCTGTT CCGATTCT CCACTGCTTGAAGTGA TTGTTACG | <i>PsiI</i> |

* – Праймеры любезно предоставлены Ф.А.Коноваловым (МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва).

** – Отсутствие продукта в линии WL1238.

2.4. Образцы гороха.

Все образцы гороха, использованные в данной работе, представляли собой высокоинбредные линии, прошедшие не менее 7-8 поколений самоопыления.

1) Тестерные и лабораторные линии гороха.

WL1238. Тестерная линия из коллекции Weilbullsholm, Landskrona (Швеция).

Маркирована аллелями *le, tl-w, d, wb, gp, b, k, m, U-st*.

WL1072. Тестерная линия из коллекции Weilbullsholm, Landskrona (Швеция).

Маркирована аллелями *gp, b, st*.

WL851. Тестерная линия из коллекции Weilbullsholm, Landskrona (Швеция).

Маркирована аллелями *le, tl-w, b, k, st*.

Спринт-1. Линия получена скрещиванием образца ВИР7036 (Непал) с сортом *Avanti* и дальнейшим инбридингом в течение 20 поколений.

RT-1. Линия получена скрещиванием тестерной линии WL1018 с образцом дикорастущего гороха ВИР320 и дальнейшим инбридингом в течение 10 поколений. Несет видимые маркеры *le, tl-w, a*.

2) Образцы, происходящие из дикой природы, в скобках указаны место происхождения и синонимы, если имеются.

2а) Образцы, полученные из коллекции ВИР (Ленинград, СССР):

ВИР320 (Палестина), ВИР1851 (Грузия), ВИР2123 (происхождение не указано), ВИР2521 (Палестина, Кинерет, = WL2034), ВИР2524 (Израиль, Галилея, = WL1488), ВИР4014 (Азербайджан, Ленкорань).

2б) Образцы из коллекции Г.Лампрехта (получено от Н.Видена, Cornell University, Geneva, США).

L100 (Израиль, Бе'ер-Шева, = 712 из работы Ben-Ze'ev, Zohary, 1973; = JI3273; = PI560069), L99 (Израиль, Иерусалим, = 711 из работы Ben-Ze'ev, Zohary, 1973; = JI3272; = PI560068).

2в) Образцы, полученные из коллекции John Innes Center (Norwich, Великобритания).

J11794 (Израиль, Голанские высоты, = 716 из работы Ben-Ze'ev, Zohary, 1973), J11096 (Греция, г. Афон).

2г) Образцы из коллекции линий, использованных в работе Ben-Ze'ev, Zohary, 1973; (получено от Н. Поланса, США).

721 (Израиль, г. Кармель, =J13262; =L104; =PI560058).

2д) Образцы из коллекции Ф. Мельбауэра, США (получено от Н. Видена, Cornell University, Geneva, США).

P002 (Турция), P008 (Турция), P012 (Турция), P016 (Турция).

2е) Образцы, полученные из коллекции центра интродукции растений Университета штата Вашингтон в Pullman США.

PI273209 (неизвестно), PI343993 (Турция).

2ж) Образцы, полученные из коллекции Weilbullsholm, Landskrona (Швеция).

WL2123 (Израиль, долина Иордана), WL805 (Турция, Анатолия).

2з) Образцы, полученные из коллекции селекционного центра Wiatrowo (Польша).

WT301 (*P. fulvum*, Палестина)/

2и) Образцы, собранные О.Э.Костериным и Ю.А.Трусовым.

CE1 (Крым, Симеиз; =J12629).

3) Коллекционные образцы культурного гороха, в скобках указано место происхождения.

ВИР1451 (Архангельская обл.), ВИР1915 (Афганистан), ВИР2759 (*P. abyssinicum*, Йемен), ВИР3429 (Египет), ВИР3439 (Египет), ВИР4871(Грузия), ВИР4911 (Тибет, Лхаса), ВИР5414 (Эфиопия), ВИР7036 (Непал), ВИР7327 (Турция), ВИР7328 (Турция), P014(Турция).

4) Коллекционные образцы, о которых неясно, являются ли они дикими либо культурными.

ВИР2998 (Грузия, из Рижского Ботанического сада), ВИР320* (линия выделена из гетерогенного образца ВИР320, Палестина,), ВИР3115 (Италия, Катания, = WL2028), ВИР7329 (Турция).

5) Линии, созданные в ходе работы для проведения генетического анализа

Таблица 2. Аллельное состояние молекулярных маркеров, 1238 или 320, унаследованное от одной из исходных линий, WL1238 или ВИР320, соответственно, и аллельное состояние видимых маркеров в линиях, использованных для картирования генов несовместимости *Scs1* и *Scs2*.

| Линия | Пластинный маркер | Локусы ядерно-цитоплазматической несовместимости | | Маркеры LGIII | | |
|----------------|-------------------|--|-------------|---------------|-------------|-----------------|
| | | <i>rbcL</i> | <i>Scs1</i> | <i>Scs2</i> | <i>PhlC</i> | <i>AJ832139</i> |
| РИЛ-32, 33, 65 | 1238 | 320 | 1238 | 320 | 320 | <i>St</i> |
| РИЛ-37 | 1238 | 1238 | 320 | 1238 | 1238 | <i>St</i> |
| РИЛ-78, 106 | 1238 | 320 | 1238 | 320 | 320 | <i>St</i> |
| gp37 | 320 | 320 | 320 | 320 | 320 | <i>St</i> |
| st320 | 320 | 320 | 320 | 320 | 320 | <i>st</i> |

Продолжение Таблицы 2

| Линия | Маркеры LGV | | | | | | Видимые маркеры | |
|----------------|-------------|-----------|------------|------------|------------|------------|-----------------|-------------|
| | <i>Met2</i> | <i>gp</i> | <i>Nca</i> | <i>scr</i> | <i>pnp</i> | <i>Apy</i> | <i>k</i> | <i>tl</i> |
| РИЛ-32, 33, 65 | 1238 | <i>gp</i> | 1238 | 1238 | 1238 | 1238 | <i>K</i> | <i>tl-w</i> |
| РИЛ-37 | 1238 | <i>gp</i> | 1238 | 1238 | 1238 | 1238 | <i>k</i> | <i>Tl</i> |
| РИЛ-78, 106 | 1238 | <i>gp</i> | 1238 | 1238 | 1238 | 1238 | <i>k</i> | <i>tl-w</i> |
| gp37 | 1238 | <i>gp</i> | 1238 | 320 | 320 | 320 | <i>K</i> | <i>Tl</i> |
| st320 | —* | <i>Gp</i> | — | — | — | — | <i>K</i> | <i>Tl</i> |

* не определяли

2.5. Выращивание растений.

Растения выращивали в гидропонной теплице ЦКП "Лаборатория искусственного выращивания растений" ИЦиГ СО РАН с поливом три раза в день питательным раствором Кнопа (кальций азотнокислый – 1,0 г/л, калий азотнокислый – 0,25 г/л, калий фосфорнокислый однозамещенный – 0,25 г/л, магний сернокислый – 0,25 г/л, калий хлористый – 0,125 г/л, железо хлористое - 0,125 г/л). Освещение: 8 часов дневной свет/16 часов лампами РСП44-1000 интенсивностью 10-12 тыс. люкс. В качестве грунта использовали смесь керамзит/вермикулит (как вариант – прокаленный речной песок).

2.6. Скрещивание линий гороха.

Лодочку цветков незадолго до приобретения ими антоциановой окраски вскрывали пинцетом и удаляли нераскрывшиеся пыльники. После этого на рыльце пестика пинцетом наносили пыльцу, взятую из раскрывшихся цветков линии-донора либо сразу, либо на следующий день, иногда дважды.

2.7. Подсчет фертильности пыльцы.

Для подсчета фертильности пыльцы лодочку цветка гороха надрезали пинцетом, переносили созревшую пыльцу вместе с пыльниками на предметное стекло в каплю ацетокармина (раствор 1 г кармина / 100 мл 45% уксусной кислоты), перемешивали, подогревали на спиртовке и накрывали покровным стеклом. Фертильность пыльцевых зерен определяли по интенсивной карминово-красной окраске при наблюдении под микроскопом, увеличение $\times 100-400$. Стерильными считали неокрашенные пыльцевые зерна (Паушева, 1988, С. 208). С одного растения брали в среднем 3 цветка, в каждом из которых подсчитывали 100-300 пыльцевых зерен. Среднюю фертильность пыльцы растения определяли как частное от деления числа фертильных пыльцевых зерен во всех подсчитанных цветках к общему числу подсчитанных зерен на данном растении, выражали в процентах либо в долях

от единицы. Микроскопический анализ выполняли с использованием оборудования ЦКП "Микроскопический анализ биологических объектов" ИЦиГ СО РАН.

2.8. Приготовление препаратов мейотических и митотических хромосом.

Для приготовления препаратов мейотических хромосом бутоны длиной не более 3 мм фиксировали в смеси ледяной уксусной кислоты и 96% этилового спирта (1:3) 24 ч при 2-4 °С. Пыльники переносили на предметное стекло в каплю ацетокармина, подогревали, накрывали покровным стеклом и придавливали.

Для приготовления препаратов митотических хромосом бутоны длиной 3 мм помещали в альфа-бромнафталин при 2-4 °С на 24 ч. Затем бутоны, ополоснув в воде, фиксировали в смеси ледяной уксусной кислоты и 96% этилового спирта (1:3) 24 ч при 2-4°С. Лепестки венчика (Abe et al., 2005) переносили на предметное стекло в каплю ацетокармина, подогревали и, накрыв покровным стеклом, готовили давленные препараты.

Наблюдения вели при помощи микроскопа AXIOCAM MAC (Carl Zeiss, Germany), изображение фиксировали на цифровую камеру HAL 100 с использованием программы AXIO VISION на оборудовании ЦКП "Микроскопический анализ биологических объектов" ИЦиГ СО РАН.

2.9. Популяция рекомбинантных инбредных линий (РИЛ) и картирование генов несовместимости.

Картирующая популяция РИЛ была создана на основе скрещивания WL1238 x ВИР320. Около 100 растений F₂ размножали путем самоопыления с отбором одного случайно взятого семени для вклада в следующее поколение, вплоть до F₆ (Рис. 1).

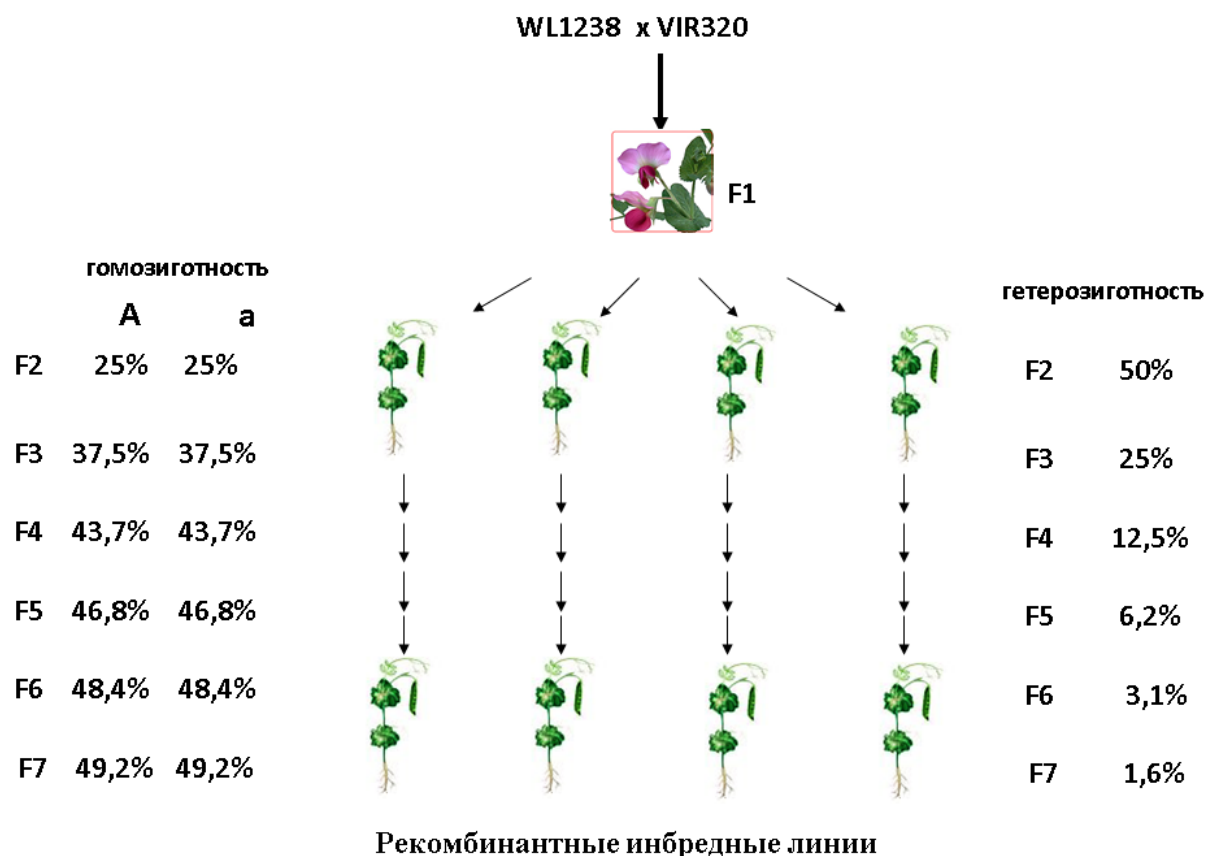


Рис. 1. Схема получения картирующей популяции рекомбинантных инбредных линий.

В поколении F_6 определяли совместимость ядерного генома растений индивидуальных РИЛ с цитоплазмой от ВИР320. Как правило, два растения F_7 использовали в качестве источника пыльцы в скрещивании, и объединенные данные служили характеристикой соответствующей линии F_6 . Фенотипирование линий РИЛ в отношении ядерно-цитоплазматической несовместимости проводили путем их скрещивания в качестве источника пыльцы с линией ВИР320 в качестве донора цитоплазмы, индуцирующей ядерно-цитоплазматический конфликт (Рис. 2). Комбинация ядерного генома и цитоплазмы считалась несовместимой, если ее носители обладали недостаточной хлорофилльной окраской, которая варьировала от белой до очень бледно-зеленой, и измененной морфологией листовых органов в виде редукции листовых пластинок и прилистников.

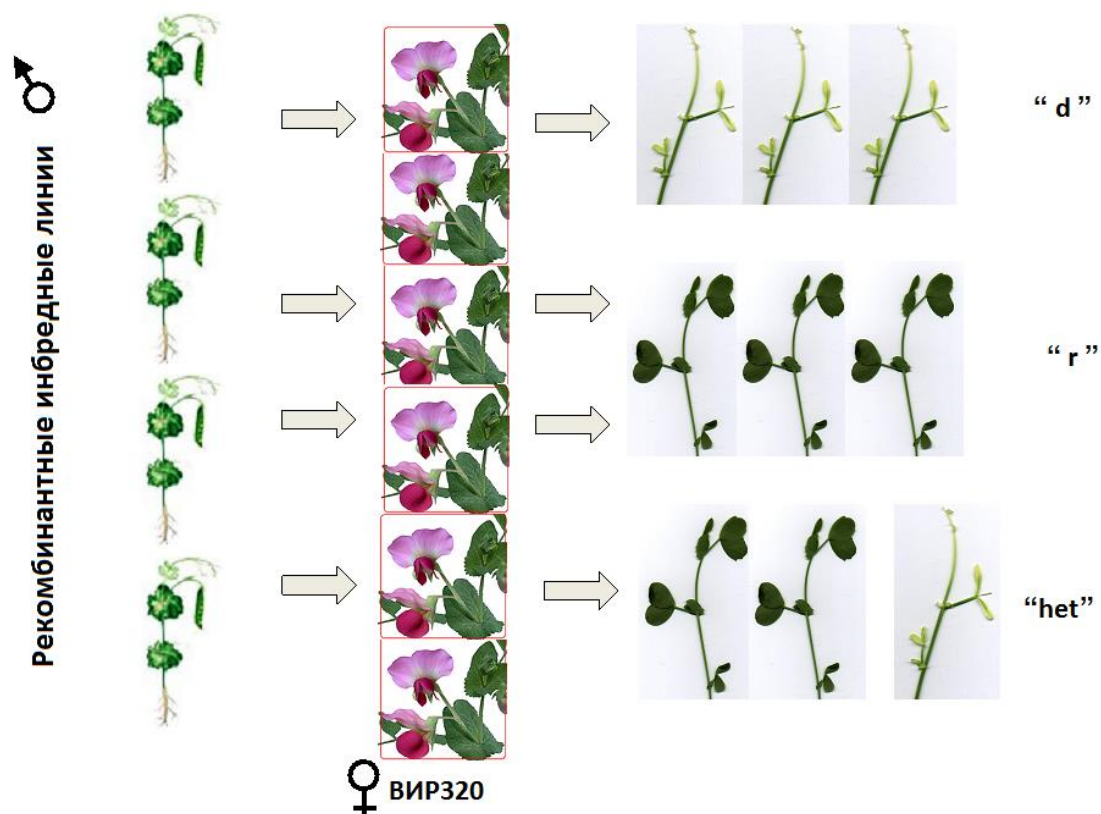


Рис. 2. Схематическое изображение скрещиваний для анализа расщепления по признаку ядерно-цитоплазматической совместимости индивидуальных РИЛ из картирующей популяции с цитоплазмой VIR320. "d" (от англ. dominant) – доминантный фенотип, "r" (от англ. recessive) – рецессивный фенотип, "het" (от англ. heterozygous) – гетерозигота.

Для оценки генетической дистанции между изучаемыми маркерами использовали формулу Холдейна $r = R/(2 - 2R) \times 100$, где r – расстояние на генетической карте в сантиморганах (сМ), R – доля рекомбинантных линий (Haldane, Waddington, 1931). Генетическую карту LGIII (от англ. Linkage Group, группа сцепления) и LGV строили с использованием программы Mapmaker 3.0 (Lander et al., 1987), доступной для свободного скачивания по адресу <http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio/qtl/mapmaker/>.

2.10. Выделение ДНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР), расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции.

Около 100 мг листьев (корней) протирали тефлоновым пестиком через чайное ситечко из нержавеющей стали с ячейкой 1 x 1 мм² в емкость (подставка под чайное ситечко), содержащую 1,5 мл 0,15М раствора NaCl, гомогенат помещали в пробирку типа Eppendorf емкостью 1,5 мл на льду. Для выделения ДНК из семян около 10 мг муки размешивали в 1,5 мл 0,15М раствора NaCl непосредственно в пробирке объемом 1,5 мл. После центрифугирования при 4000g в течение 5 мин. супернатант отбрасывали, и осадок суспендировали стерильной зубочисткой в 200 µl буфера для экстракции (100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, 0,5% SDS по объему) и выдерживали 30 мин. при комнатной температуре. После центрифугирования в течение 5 мин. при 8000g для дальнейшей очистки ДНК к супернатанту добавляли равный объем (200 µl) 5М раствора LiCl, перемешивали и оставляли на льду в течение 15 мин. Далее смесь центрифугировали 5 мин. при 8000g, супернатант собирали и осаждали 2,5 объемами (1 мл) 96% этанола в течение 2 ч при -20 °С либо равным объемом изопропанола в течение 30 мин. при комнатной температуре. Осадок собирали центрифугированием при 8000g в течение 10 мин, промывали 75% этанолом, еще раз центрифугировали при 8000g в течение 5 мин, супернатант удаляли, осадок сушили при 50 °С в течение 10 мин и затем растворяли в 50 µl деионизованной воды. Для удаления нерастворимых примесей образцы центрифугировали, и супернатант переносили в свежие пробирки. Присутствие примесей не влияло на дальнейшие реакции. Около 10 нг геномной ДНК использовали для ПЦР-амплификации при следующих условиях: первоначальная денатурация при 94 °С 2 мин. 30 сек., 5 циклов, включающих 30 сек. при 93 °С, 1 мин. при 58 °С, 1 мин. 30 сек. при 70 °С, затем 35 циклов, включающих 20 сек. при 93 °С, 1 мин. при 56 °С, 1 мин. при 72 °С, окончательная элонгация 3 мин. при 72 °С. Реакцию проводили в

объеме 20 µl в пробирках объемом 0,5 мл при концентрации MgCl₂ от 2,5 до 4 mM, dNTP - 0,2 mM каждого, праймеры - 0,5 pmol/µl каждого. В ПЦР-реакциях использовали следующие ДНК-полимеразы: Taq, SmartTaq производства "Лаборатория Медиген", Новосибирск, Taq производства Лаб. иммуногенетики ИЦиГ СО РАН (впоследствии ИМКБ СО РАН, Новосибирск). Использовали амплификатор БИС (Кольцово, Россия). Продукты ПЦР-реакции анализировали в 0,8% агарозном геле в буфере TAE (40mM Трис-ацетат, 1mM ЭДТА) с добавлением 0,5 мкг бромистого этидия на 1 мл геля. 5-15 µl реакционной смеси использовали для расщепления ПЦР-продукта подходящими эндонуклеазами рестрикции (Таблица 1) в соответствии с рекомендациями производителя (СибЭнзим, Новосибирск).

Продукты расщепления эндонуклеазами анализировали в 1,5% агарозном геле либо в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) в буфере TBE (89mM Трис, 89mM борной к-ты, 2 mM ЭДТА). ПААГ после электрофореза окрашивали раствором бромистого этидия в TBE (0,5 мкг/мл), ДНК визуализировали и фотографировали в ультрафиолетовом свете с использованием оборудования ЦКП Функциональной геномики ИЦиГ СО РАН.

2.11. Выделение РНК, синтез кДНК, определение нуклеотидных последовательностей.

Суммарную РНК выделяли из молодых листьев с использованием набора для выделения РНК "SV Total RNA Isolation System" (Promega, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Синтез кДНК проводили с использованием QT праймера 5'-

CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTT

TTT (Frohman, 1994) и M-MLV обратной транскриптазы (Promega, США) в

соответствии с рекомендациями производителя. Два прямых праймера,

Ps_bccp-F2 (5'-СТААТГАААГТГГСГГАААТС), Ps_bccp-F3 (5'-

СГААГСАТТГГАГСААСАААС), и два обратных праймера, Ps_bccp-R2 (5'-

CATTCACATAAGACGCGTAATAAGG), Ps_bccp-R3 (5'-TTCTGGAGATGATGTTGGTGG), подходящих к последовательности GAMJ01025269 из публичных баз данных, использовали во всех парных комбинациях для амплификации фрагментов кДНК. Использовали следующие условия ПЦР: первоначальная денатурация при 95°C в течение 3 мин., затем 38 циклов, включающих 30 сек. при 94°C, 30 сек. при 58°C, 1 мин. при 72°C, заключительная элонгация 5 мин. при 72°C. ПЦР-продукты анализировали в 1,5% агарозном геле в буфере ТАЕс добавлением 0,5 мкг бромистого этидия на 1 мл геля. При необходимости ПЦР-продукты реамплифицировали, используя в качестве матрицы 2 μ л разведенной 1:10 реакционной смеси от первоначальной ПЦР-реакции.

Для дальнейшего секвенирования продукты ПЦР-реакций очищали переосаждением полиэтиленгликолем. Для этого к 1 объему ампликона добавляли 0,8-1 объема раствора, содержащего (20% PEG6000 + 2,5М NaCl), инкубировали 15 мин. при 37°C, центрифугировали 10 мин. при 8000g, супернатант удаляли, осадок промывали 200 μ л 75% этанола, еще раз центрифугировали 5 мин. при 8000g, осадок подсушивали 10 мин. при 50°C и растворяли в 15 μ л деионизованной воды. Также применяли очистку на колонках Invisorb® Spin Filter PCRapid Kit (Invitek, Германия), для очистки ДНК из геля использовали набор Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Секвенирование ПЦР-продуктов производили в ЦКП "Геномика" СО РАН на оборудовании ABI PRIZM с использованием BigDye terminators 3.0 или 3.1 и тех же праймеров, что использовались для амплификации.

2.12. Выделение пластидной ДНК.

Пластидную ДНК выделяли согласно (Jansen et al., 2005) с изменениями. Около 5 г свежих листьев от проростков каждой линии протирали через ситечко из нержавеющей стали с ячейкой 1x1 мм² в емкость (подставка под чайное ситечко), содержащую 30 мл холодного раствора для выделения

хлоропластов (0,33 М сорбитол, 0,1% BSA; 50 mM HEPES).

Центрифугировали при 4°C в течение 20 мин. при 335g. Супернатант переносили в свежие пробирки и осторожно подслаивали 5 мл 60% сахарозы, центрифугировали 30 мин. при 4°C при 3300g. После центрифугирования хлоропласты концентрировались поверх слоя сахарозы. Эту зону осторожно переносили в свежую пробирку, разбавляли 30 мл раствора для выделения хлоропластов и центрифугировали при 3300g в течение 25 мин. при 4°C. Супернатант отбрасывали. Для отделения хлоропластов от митохондрий осадок ресуспендировали в 6 мл раствора для выделения хлоропластов и осторожно наносили на ступенчатый градиент, содержащий 6 мл 60% сахарозы с наслоением 20 мл 40% сахарозы, центрифугировали 17 мин. при 4°C при 20000g.

Зону, содержащую хлоропласты, собирали и концентрировали центрифугированием при 2000g в микроцентрифуге. Часть супернатанта, не содержащую хлоропластов, отбрасывали. 100 µl оставшейся суспензии хлоропластов осторожно смешивали с 300 µl СТАВ-содержащего буфера для лизиса (50 mM TrisHCl pH 8.0, 33 mM EDTA:Tris pH 7.0, 2M NaCl, 26 mM β-меркаптоэтанол, 2% поливинилпироллидон-10, 2,6% СТАВ) и перемешивали на орбитальном шейкере в течение часа при температуре 65°C на скорости 1 оборот / 5сек. Для экстракции ДНК добавляли 400 µl хлороформа и осторожно перемешивали, центрифугировали при 14000g в микроцентрифуге. Верхний слой переносили в свежие пробирки, смешивали с 1100 µl буфера для разведения (50mM TrisCl pH 8.0, 33mM EDTA:Tris pH 7.0, 1% СТАВ), инкубировали в течение ночи при 4°C и центрифугировали при 21000g в течение 30 мин. Супернатант отбрасывали, осадок ресуспендировали в 200 µl буфера (10 mM TrisCl pH 8.0; EDTA:Tris pH 7.0, 1,5M NaCl), содержащего 1 µl РНКазы А, и перемешивали на орбитальном шейкере не менее часа при 42°C, пока осадок полностью не растворился. Для экстракции добавляли 1 объем (200 µl) хлороформа, осторожно

перемешивали и сбрасывали на дно пробирки коротким центрифугированием. Водную фазу переносили в свежую пробирку, ДНК осаждали изопропанолом. Осадок промывали 80% этанолом, сушили на воздухе и растворяли в 100 μ l буфера TE с низким содержанием ЭДТА (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM ЭДТА).

2.13. Высокопроизводительное секвенирование на платформе Ion Torrent PGM.

Для высокопроизводительного секвенирования образцы пластидной ДНК отправляли в ЦКП "Центр Геномных Исследований" ИЦиГ СО РАН. Представленность пластидной ДНК в суммарной выборке полученных последовательностях оценивали с использованием программы BLAST (Altschul et al., 1990) на сервере NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Проверяли сходство последовательностей из публичных баз данных NC_014057 (*Pisum sativum* chloroplast, complete genome) и KC189947 (*Vicia faba* mitochondrion, complete genome) с последовательностями из 10 случайных подвыборок, содержащих около 10000 индивидуальных прочтений (reads) более 30 п.о. каждая (всего 115627). Число последовательностей, показывающих совпадение с хлоропластным и митохондриальным геномом с мат. ожиданием (threshold level) 10, усредняли по 10 использованным подвыборкам, что дало оценку $77,29 \pm 0,41\%$ хлоропластной и $9,41 \pm 0,30\%$ митохондриальной ДНК. Оставшиеся приблизительно 13,3% индивидуальных прочтений считали относящимися к ядерной ДНК.

2.14. Сборка пластидных геномов.

Пластидные геномы собирали с использованием оборудования ЦКП «Сибирский суперкомпьютерный центр», исходя из сырых данных в формате FASTQ при помощи программы MIRA4 (Chevreux et al., 1999) с предустановленными параметрами, используя режим 'сборка по матрице' (mapping). В качестве матрицы использовали последовательность NC_014057

(*Pisum sativum* complete chloroplast genome). Сборка в режиме 'новый геном' (de novo) давала непрерывные отрезки последовательностей, которые использовали для разрешения случаев инсерций/делеций. Собранные геномы в формате ACE визуализировали в программе Tablet (Milne et al., 2013) и просматривали от начала до конца. Места, в которых целостность сборки нарушалась из-за несовпадения с матрицей за счет инсерций/делеций (но не нуклеотидных замен) исправляли с использованием фрагментов последовательностей, полученных в режиме 'новый геном'. Исправленную версию затем использовали в качестве матрицы для сборки при втором проходе программы MIRA. При необходимости этот шаг повторяли 3-4 раза. В случае сомнений относительно длины гомополимерных трактов, что типично для технологии Ion Torrent (Quail et al., 2012), их длину выравняли в соответствии с геномом-матрицей. Несколько незаполненных участков в сборках, все из которых приходились на некодирующие части генома, не заполняли и не анализировали.

2.15. Идентификационные номера в публичных базах данных.

Последовательности ДНК, полученные в данном исследовании, были отправлены в Европейскую базу нуклеотидных последовательностей (European Nucleotide Archive, ENA) и получили следующие номера и спецификации.

Реконструированные пластидные геномы:

HG966672 *Pisum sativum* subsp. *elatius*, bio-material VIR320, chloroplast complete genome

HG966673 *sativum* subsp. *elatius*, bio-material 721, chloroplast complete genome

HG966674 *Pisum sativum* subsp. *sativum*, bio-material WL1238, chloroplast complete genome

HG966675 *Pisum sativum* subsp. *elatius*, bio-material JI1794, chloroplast complete genome

HG966676 *Pisum sativum* subsp. *elatius*, bio-material L100, chloroplast complete genome

Последовательности кДНК локуса *Bccp3*:

LK056919 *Pisum sativum* mRNA for Biotin carboxyl carrier protein (*Bccp* gene), VIR320

LK056920 *Pisum sativum* mRNA for Biotin carboxyl carrier protein (*Bccp* gene), L100

LK056921 *Pisum sativum* mRNA for Biotin carboxyl carrier protein (*Bccp* gene), 721

LK056923 *Pisum sativum* mRNA for Biotin carboxyl carrier protein (*Bccp* gene), WL1238

LK056924 *Pisum sativum* mRNA for Biotin carboxyl carrier protein (*Bccp* gene), JI1794.

Фрагменты локуса *trnK*:

AM295252 *Pisum sativum* subsp. *elatius* plastid partial tRNA-Lys gene, intron sequence and partial matK gene, specimen voucher VIR320;

AM294945 *Pisum sativum* plastid partial tRNA-Lys gene, intron sequence and partial matK gene.

ГЛАВА 3.

ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ НЕСОВМЕСТИМОСТИ У ГОРОХА.

3.1. Фенотипические проявления ядерно-цитоплазматического конфликта.

Проведя большое число скрещиваний разных линий гороха, мы обнаружили, что одна из линий, ВИР320, отличалась от остальных тем, что ее потомки, полученные в результате скрещивания, где эта линия использовалась в качестве материнского растения, имели фенотип, существенно отличающий их от всех других растений гороха, в том числе потомков от реципрокных скрещиваний, полученных при использовании ВИР320 в качестве источника пыльцы. Эта линия попала в коллекцию ВИР из Франции и была аннотирована как относящаяся к подвиду *Pisum sativum* subsp. *syriacum* (синоним *P. sativum* subsp. *elatius* var. *pumilio*) и происходила из исторической области под названием Палестина. Следует отметить, что образец, полученный из ВИР, был весьма гетерогенным и содержал семена, разнообразные по окраске семенной оболочки, цвету рубчика, цвету семядолей. Используемая в данной работе линия, обозначаемая как ВИР320, восходит лишь к части семян исходного образца.

При использовании ВИР320 в скрещиваниях в качестве материнского растения большинство потомков F_1 имели нарушения хлорофилльной окраски в виде белых или желтоватых секторов на зеленом фоне или зеленых секторов на желтоватом фоне, редуцированные листья и прилистники (Рис. 3), редуцированные боковые корни, цветки с сильно сниженной фертильностью пыльцы, многие растения не давали семян.



Рис. 3. Фенотип растений F_1 от скрещивания линии ВИР320 в качестве материнского растения. а – растение, проявляющее типичный ядерно-цитоплазматический конфликт; б – растение, частично скомпенсировавшее конфликт; в – растение, практически полностью скомпенсировавшее конфликт.

Были проведены скрещивания линии ВИР320 с 38 образцами гороха, 14 из которых (ВИР3439, ВИР3429, ВИР7328, ВИР7327, ВИР7036, ВИР4871, ВИР5414, ВИР1451, ВИР2759, ВИР4911, ВИР1915, P014, WL1238, Спринт-1) относились к культивируемым формам, 20 были представлены дикими формами (L100, L99, L90, L104, WL2123, WL805, PI343993, PI273209, LI1794, ВИР1851, ВИР2123, ВИР2521, ВИР2524, ВИР4014, P012, P008, P002, P016, SE1, WT301), и про 4 образца (ВИР2998, ВИР3115, ВИР7329, ВИР320*) было неясно, культурные они или дикие. От каждого скрещивания было получено от 1 до 15 потомков F_1 . При использовании ВИР320 в качестве источника пыльцы, все потомки были нормальными. В реципрокных же скрещиваниях, лишь в 6 случаях из 38 потомки имели нормальную хлорофилльную окраску без явно выраженных аномалий, и во всех шести случаях партнерами ВИР320 по скрещиванию были дикие формы, L100, L99, ВИР2521, LI1794, P008, относящиеся к подвиду *P. sativum* subsp. *elatus*, и WT301, относящийся к виду *P. fulvum*.

Фенотип растений, наблюдаемый в наших экспериментах, очень напоминает описанный Лутковым (1930), который автор наблюдал в F_2 и F_3 от скрещивания форм гороха *P. sativum* и *P. humile* Boiss et Noe, что служило Л. И. Говорову (1937) основанием рассматривать *P. humile* как отдельный вид. Впоследствии название *humile* было заменено на *syriacum*, а сам таксон стал рассматриваться как подвид посевного гороха *P. sativum* subsp. *syriacum* Berger (Макашева, 1979). В настоящее время все дикие формы посевного гороха зачастую относят к подвиду *P. sativum* subsp. *elatus* (Maxted, Ambrose, 2001).

Асимметрия в фенотипе растений от реципрокных скрещиваний явно свидетельствовала о наличии ядерно-цитоплазматического конфликта, при котором страдала функция хлоропластов. Данный конфликт мог быть скомпенсирован, о чем свидетельствовало наличие зеленых секторов на листьях, зеленых веток, иногда растения целиком имели нормальную хлорофилльную окраску. Далее будет показано, что такое восстановление

нормальной работы хлоропластов возможно при неканоническом двуродительском наследовании пластид.

3.2. Связь ядерно-цитоплазматического конфликта с наследованием пластид.

Было изучено проявление маркера хлоропластной ДНК у растений F_1 , полученных от реципрокных скрещиваний линии ВИР320 с тестерными линиями Спринт-1 и RT-1. Тогда как линия Спринт-1 была получена от скрещивания двух культурных образцов гороха, ВИР7036 (Непал) и сорта Avanti, то в создании линии RT-1, наряду с тестерной линией WL1018 принимал участие образец ВИР320, изучаемый в данной работе как носитель генетически детерминированной способности вызывать аномалии в развитии гибридного потомства.

В качестве маркера пластидной ДНК использовали ген *rbcL*, кодирующий большую субъединицу рибулозобифосфаткарбоксилазы, который подвергли CAPS-анализу с целью определения, от кого из родителей был унаследован данный ген. Для этого из индивидуальных растений F_1 выделяли тотальную ДНК и амплифицировали фрагмент гена *rbcL*, длиной около 1100 п.о., который подвергли рестрикции эндонуклеазой *AspLEI*. Аллель, унаследованный от ВИР320, имел сайт узнавания для этого фермента (или его неошизомера *HspAI*), тогда как аллель, унаследованный от Спринт-1 и RT-1, не имел этого сайта.

Было проанализировано 10 растений F_1 от скрещивания ВИР320 × Спринт-1, все они имели признаки ядерно-цитоплазматической несовместимости в виде нарушения хлорофилльной пигментации и редукции пластинок листочков и прилистников (Рис. 3, а), при этом 3 растения частично скомпенсировали этот конфликт и имели сектора нормальной ткани (Рис. 3, б).

У посевного гороха было показано наследование хлоропластов по материнской линии (Polans et al., 1990), поэтому у всех потомков ожидалось

два фрагмента (около 800 и 300 п.о.), соответствующих наличию сайта рестрикции в ДНК линии ВИР320. Однако, почти у всех растений в той или иной степени наблюдалась гетероплазмия: 7 растений без признаков преодоления ядерно-цитоплазматического конфликта имели материнский тип *rbcL*-кодирующей хлоропластной ДНК со следами присутствия отцовского варианта (Рис. 4, дорожки 2, 5-9, 11-12), тогда как у трех растений, имеющих сектора нормальной ткани, наблюдалось подавляющее преобладание отцовского типа хлоропластной ДНК (Рис. 4, дорожки 3, 4, 10). (Здесь и далее под отцовским или материнским типом хлоропластной ДНК подразумевается аллель маркерного гена *rbcL*).

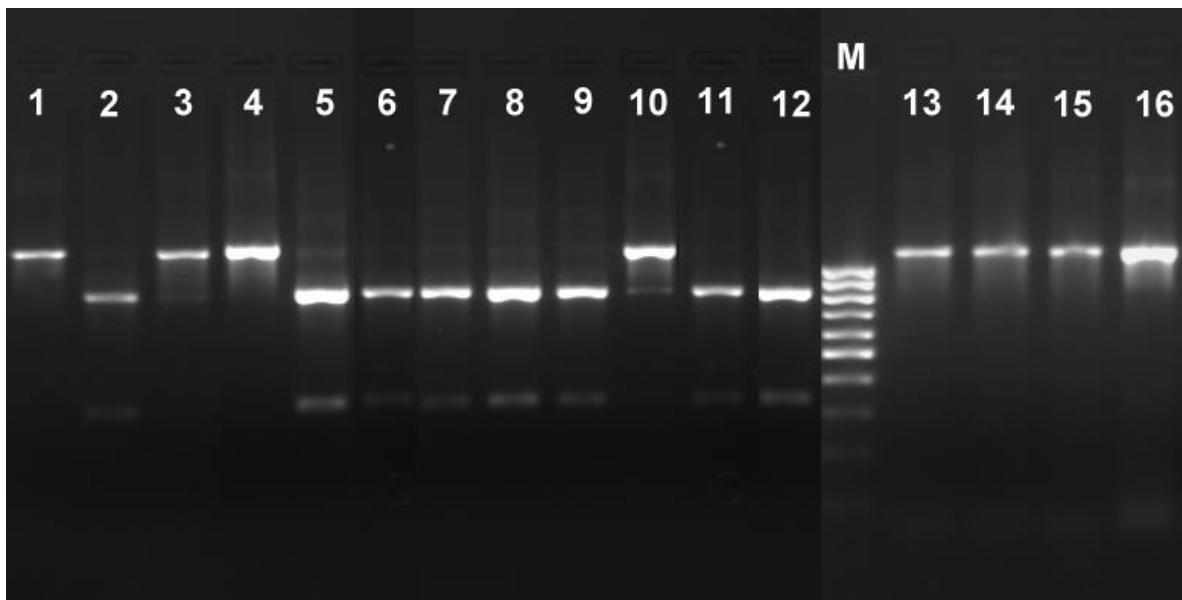


Рис. 4. Фрагмент кодирующей части пластидного гена *rbcL* после обработки рестриктазой *AspLEI*. 1 – родительская форма Спринт-1; 2 – 11 – индивидуальные растения F_1 от скрещивания ВИР320 x Спринт-1; 12 – родительская форма ВИР320; М – маркер молекулярного веса 100-1000 п.о.; 13 – 16 – индивидуальные растения F_1 от скрещивания Спринт-1 x ВИР320.

У одного из растений, имеющих сектора нормальной ткани (Рис. 3, б), была проанализирована ДНК, выделенная из зеленых секторов, и ДНК, выделенная из хлоротичных частей. Оказалось, что хлоротичные части

имели преобладающим материнский тип хлоропластной ДНК, а зеленые части – отцовский тип (Рис. 5).

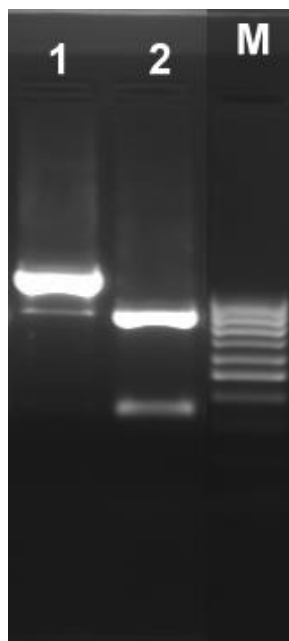


Рис. 5. Фрагмент кодирующей части гена *rbcL* после обработки рестриктазой *AspLEI*. ДНК выделена из одного растения F_1 . 1 – ДНК из зеленых частей; 2 – ДНК из хлоротичных частей листа. М – маркер молекулярного веса 100-1000 п.о. То же растение представлено на Рис. 4, дорожка 10.

На основании полученных данных был сделан вывод, что пластиды, происходящие от линии ВИР320, не могут нормально функционировать в клетках, где половина ядерного генома представлена генетическим материалом от линии Спринт-1. Это выражается в нарушении хлорофилльной пигментации и сопутствующей редукции структур листа. Восстановление зеленой ткани происходит в случае пролиферации отцовских хлоропластов, что не является типичным для гороха, но согласуется с потенциальной возможностью у него двуродительского наследования хлоропластов (Corriveau, Coleman, 1988; Corriveau et al., 1989).

При скрещивании линии ВИР320 с линией RT-1 все потомки имели нормальную зеленую окраску, то есть в этом случае не наблюдалось явно выраженной несовместимости ядра и цитоплазмы, что вполне объяснимо генетической общностью этих линий. Анализ гена *rbcL* у пяти потомков F_1 показал, что подавляющее количество ДНК у них было представлено материнским типом, при этом у одного растения были заметны следы присутствия отцовского варианта. Совместимость данной комбинации ядра и цитоплазмы, скорее всего, была неполной, что выразалось, в частности,

гибелью части носителей аллеля *tl-w* в поколении F₂. Материнское наследование хлоропластной ДНК наблюдалось также в случае реципрокных скрещиваний RT-1 × ВИР320 и Спринт-1 × ВИР320 (Рис. 4, дорожки 13–16), с использованием линии ВИР320 в качестве донора пыльцы. Таким образом, в отсутствие ядерно-цитоплазматического конфликта происходило ожидаемое (Polans et al., 1990) материнское наследование хлоропластов.

Для определения того, какие из цитоплазматических геномов вовлечены в конфликт, также было проанализировано наследование митохондрий в скрещивании, приводящем к возникновению ядерно-цитоплазматического конфликта. В качестве маркера митохондриальной ДНК использовали фрагмент гена *cox1*, кодирующего субъединицу I цитохромоксидазы. ПЦР-продукт обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *PsiI*. Линия ВИР320 имела аллель гена *cox1*, содержащий сайт узнавания для данной рестриктазы, тогда как аллель от линии Спринт-1 не имел такого сайта. У потомков от скрещивания ВИР320 × Спринт-1 материнская форма митохондриального маркера *cox1* после обработки рестриктазой должна давать два фрагмента размером около 260 и 940 п.о., тогда как отцовская форма должна остаться в виде одного фрагмента размером около 1200 п.о.

При помощи CAPS-метода была проанализирована митохондриальная ДНК, выделенная из 15 растений F₁ от скрещивания ВИР320 × Спринт-1 и 4 растений F₁ от реципрокного скрещивания (Рис. 6).

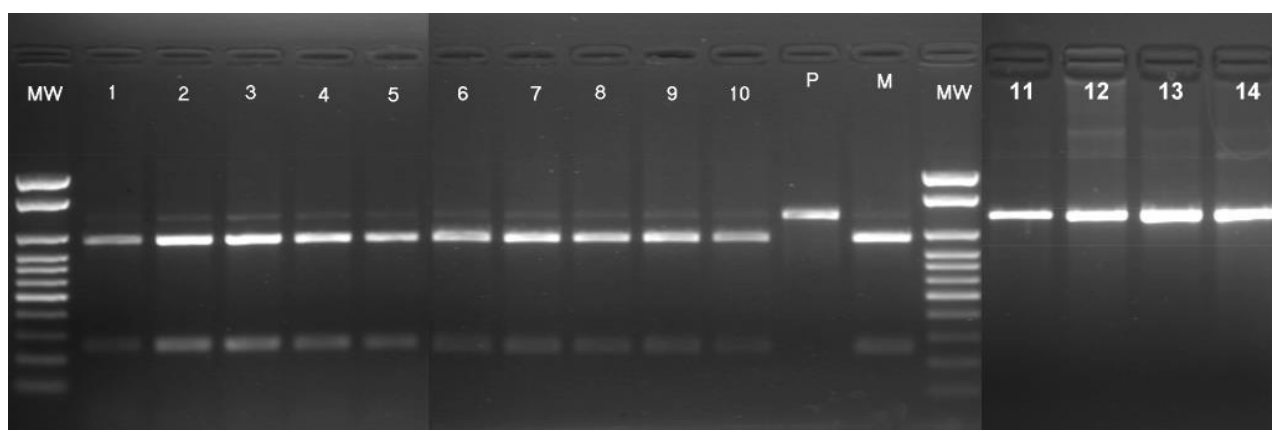


Рис. 6. Митохондриальный маркер *cox1* у индивидуальных растений после ПЦР-амплификации с последующей рестрикцией эндонуклеазой *PstI*. Дорожки 1–10 - растения F_1 от скрещивания VIR320 x Sprint-1. Дорожки 11–14 – растения F_1 от реципрокного скрещивания, Sprint-1 x VIR320. P – линия Sprint-1, M – линия VIR320, MW – маркер молекулярного веса 100-1000 п.о. + 1,5 тыс.п.о. + 2 тыс.п.о.

Расщепление ПЦР-продуктов рестриктазой *PstI* было неполным, и в электрофорезе видна слабая полоса, соответствующая интактной форме (Рис. 6, дорожки 1–10). Тем не менее, во всех случаях набор и интенсивность фрагментов CAPS-маркера *cox1* неотличимы от материнской формы, указывая на то, что ядерно-цитоплазматический конфликт не влиял на наследование митохондриального генома, по крайней мере, это справедливо для маркера *cox1*.

Выше было показано, что при общем хлоротичном фоне листьев на них возникают сектора с нормальной зеленой окраской в присутствии хлоропластов, унаследованных от отцовской формы. Далее было исследовано присутствие отцовской и материнской пластидной ДНК в нефотосинтезирующих тканях, корнях и семядолях. Поскольку использованный ранее CAPS-маркер *rbcL* при амплификации на матрице ДНК, выделенной из корней и семядолей, не расщеплялся нацело эндонуклеазой *AspLEI* (как и *HspAI*), был разработан маркер на основе интрон-содержащего пластидного гена *trnK*, кодирующего тРНК лизина.

Были определены нуклеотидные последовательности 5'-части интрона в гене *trnK* у линии ВИР320 и Спринт-1 (отправлены в публичные базы данных под номерами AM295252 и AM294945). Нуклеотидная замена G/A в позиции 143 от начала прямого праймера была использована для различения материнской и отцовской форм, путем расщепления ПЦР-продукта эндонуклеазой *Bsc4I*. ПЦР-продукт из линии ВИР320 расщеплялся на 4 фрагмента размером 204, 194, 140, 109 п.о., а из линии Спринт-1 – на 3 фрагмента, размером 249, 204, 194 п.о.

На Рис. 7 показаны результаты CAPS-анализа ПЦР-продуктов, полученных на матрице ДНК, выделенной из семядолей (Рис. 7, а), листьев (Рис. 7, б) и корней (Рис. 7, в) гибридов F₁ от скрещивания ВИР320 × Спринт-1. Отцовский аллель маркера *trnK* присутствовал во всех исследованных тканях, как фотосинтезирующих, так и нефотосинтезирующих. Он наблюдался в 4 образцах семядолей (Рис. 7, а, дорожки 1, 4, 10, 11), 8 образцах корней (Рис. 7, в, дорожки 1, 3, 5, 7, 12, 13, 14, 15). Три образца листьев имели отцовский *trnK* маркер (Рис. 7, б, дорожки 9, 10, 14), и именно эти три растения имели сектора зеленой ткани на листьях. Следует отметить, что присутствие отцовского аллеля маркера *trnK* в одном из органов растения F₁ не коррелировало с его присутствием в других органах того же растения (одни и те же номера дорожек на Рис. 7).

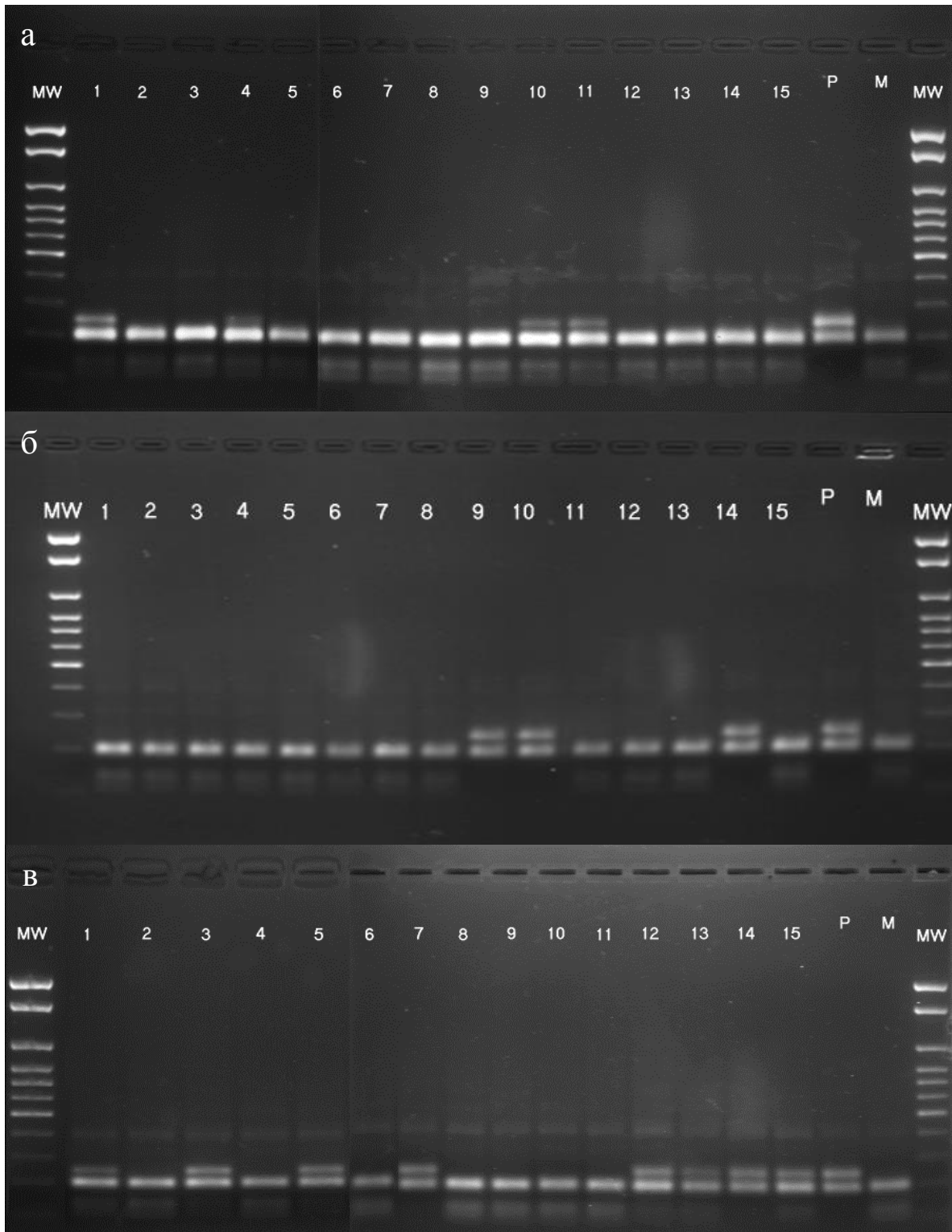


Рис. 7. Фрагменты, образованные после рестрикции эндонуклеазой *Bsc4I* ПЦР-амплифицированного пластидного маркера *trnK* у растений F_1 от скрещивания ВИР320 х Спринт-1. ДНК выделена из: а, семядолей; б, листьев; в, корней. Дорожки 1–15 – индивидуальные растения, Р – линия Спринт-1, М – линия ВИР320, MW – маркер молекулярного веса 100-1000 п.о. + 1,5 тыс.п.о. + 2 тыс.п.о.

Для дальнейшего анализа связи между фотосинтетической функцией и отцовским наследованием пластид как способа скомпенсировать ядерно-цитоплазматический конфликт было изучено аллельное состояние маркера *trnK* у 8 семян F_1 от скрещивания ВИР320 x WL1238. В таком скрещивании обе родительские линии несут аллель *i*, который определяет зеленый цвет семядолей за счет того, что хлорофилл не деградирует в процессе созревания семян (Sato et al., 2007). Все потомки гомозиготны по рецессивному аллелю *i* и должны иметь зеленые семядоли. Однако, аномалии хлорофилльной окраски, описанные на примере листьев, наблюдаются и у семян, что проявляется в виде бледно-желтых областей на срезах семядолей. Из 8 исследованных семян, 2 имели сектора нормальной хлорофилльной окраски, на желтоватом фоне (Рис. 8); CAPS-анализ показал, что эти два семени имели гетероплазмию по пластидному маркеру *trnK*, тогда как остальные 6 семян с желтоватыми семядолями, лишенными зеленых секторов в силу ядерно-цитоплазматического конфликта, несли только материнскую форму данного маркера (не показано). Данный результат свидетельствует о том, что для нормальной фотосинтетической функции гибридных семян необходимо присутствие отцовских пластид.



Рис. 8. Срез семядоли семени F_1 от скрещивания ВИР320 x WL1238. Гомозигота по аллелю *i* вместо зеленой окраски имеет зеленые сектора на желтоватом фоне.

3.3. Влияние ядерно-цитоплазматического конфликта на ультраструктуру хлоропластов.

Поскольку исследуемый ядерно-цитоплазматический конфликт наиболее ярко проявляется в нарушении хлорофилльной пигментации и преодолевается посредством неканонического двуродительского наследования пластид, было естественно исследовать структуру пластид на цитологическом уровне у растений, проявляющих конфликт. С этой целью в сотрудничестве с с.н.с. лаборатории Ультраструктур клетки ИЦиГ СО РАН С. И. Байбородиним было проведено электронно-микроскопическое исследование четырех препаратов мезофилла растений F_1 следующих типов: 1) гибриды от совместимого скрещивания WL1238 x ВИР320, имеющих нормальный фенотип, далее – "реципрокный гибрид"; 2) гибриды от скрещивания в несовместимом направлении ВИР320 x WL1238 желтовато-белой окраски, визуалью не имеющие хлорофилльной окраски, далее – "желтый сектор"; 3) зеленый сектор на листочке гибрида "несовместимого направления", далее – "зеленый сектор"; 4) гибридное растение от скрещивания в несовместимом направлении, но имеющее зеленую окраску – далее "зеленое растение". Как и ожидалось, все хлоропласты "желтого сектора" имели аномальную структуру: в неоднородном матриксе пластид наблюдались одиночные стромальные тилакоиды, граны отсутствовали. Зерна аккумулированного крахмала в строме этих органелл не обнаруживались. Такое недоразвитие фотосинтетического аппарата хлоропластов "желтого сектора" хорошо соответствует редукции хлорофилльной окраски на визуальном уровне. Сходные результаты были получены у энотеры (Glick, Sears, 1994).

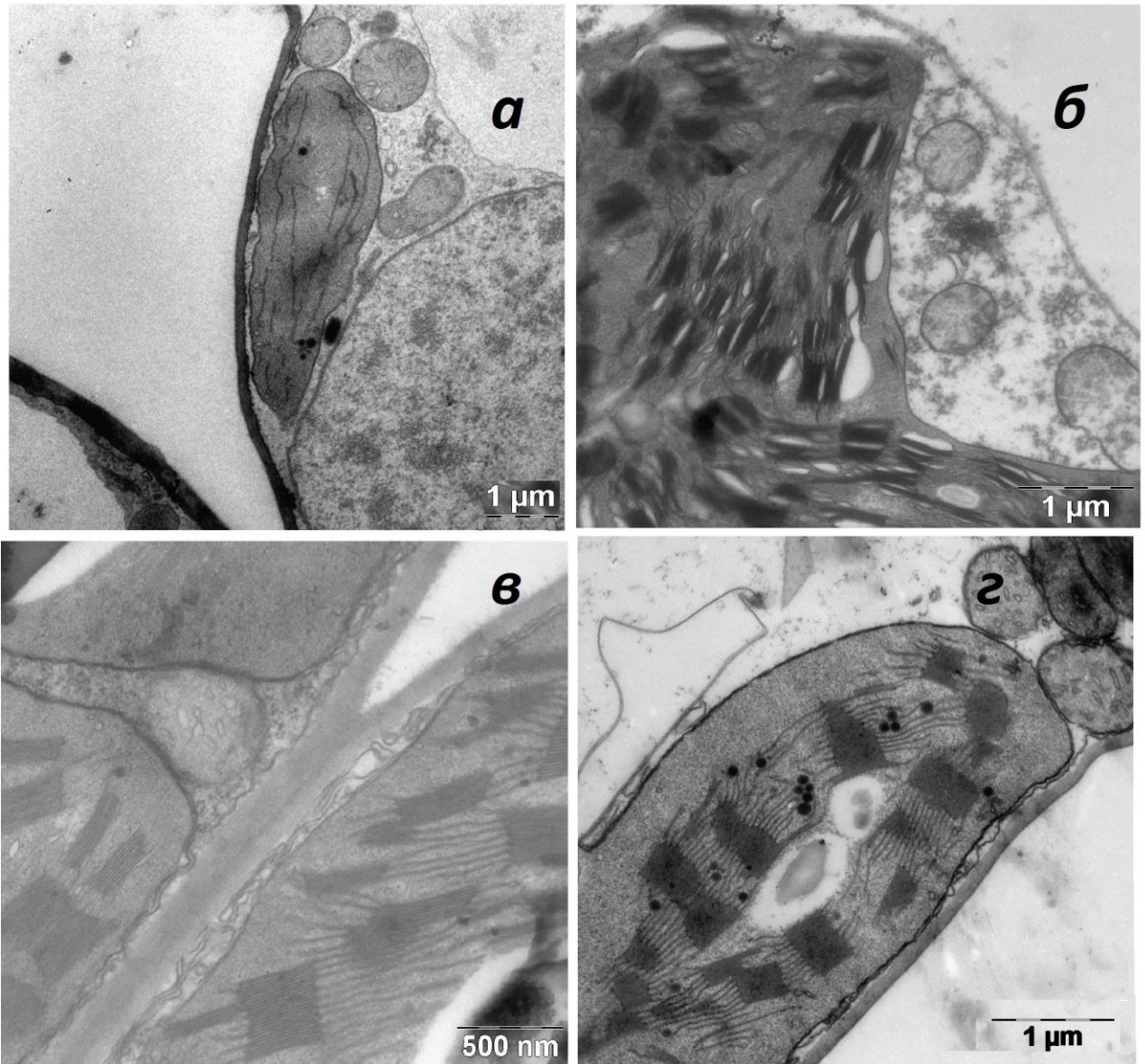


Рис. 9. Электронно-микроскопические фото хлоропластов растений, испытывающих и не испытывающих ядерно-цитоплазматический конфликт. а, сектор с хлорофилльной недостаточностью у растения F_1 от скрещивания ВР320 \times WL1238; б, зеленый сектор у растения F_1 от скрещивания ВР320 \times WL1238; в, полностью зеленое растение F_1 от скрещивания ВР320 \times WL1238; г, растение от реципрокного скрещивания WL1238 \times ВР320.

Хлоропласты "реципрокного гибрида", имеющего визуально нормальный фенотип, имели хорошо развитую тилакоидно-гранальную систему, электронноплотный матрикс и зерна крахмала в строме (Рис. 9). Такими же были хлоропласты и у "зеленого растения". В то же время структуру хлоропластов "зеленого сектора" нельзя считать полностью нормальной. Они также имели хорошо развитую внутреннюю мембранную структуру, однако наблюдалось неравномерное расширение полостей цистерн тилакоидов в гранах, тилакоиды стромы и грани располагались нерегулярно. Не удалось найти ни одного среза с плотными правильными гранами (Рис. 9).

На первый взгляд, полученная картина выглядит вполне логично, однако в действительности довольно неожиданна. Нормальная структура хлоропластов гибридов "совместимого направления" не требует комментариев. По всей видимости, у гибридов "несовместимого направления" неспособность материнских хлоропластов к нормальному развитию проявляется в неспособности их к формированию должного количества и правильной организации тилакоидов. У "зеленого растения" пластиды отцовского родителя, будучи получены в количестве, достаточном для восстановления полной хлорофилльной окраски гибрида "несовместимого направления", также дают пластиды с нормально развитой внутренней мембранной структурой. Трудности возникают в интерпретации фенотипа хлоропластов "зеленого сектора", который выглядит промежуточным между аномальным и нормальным, хотя и существенно ближе к нормальному: судя по наличию аккумулированного крахмала, функциональная способность фотосинтезирующего аппарата практически не затронута. Полученные ранее молекулярные данные свидетельствуют, что в подобных секторах наблюдается гетероплазмия, то есть присутствие материнской и отцовской пластидной ДНК, причем в интенсивно зеленых секторах отцовская ДНК преобладает. Эти данные были интерпретированы как присутствие в клетках одновременно материнских и отцовских пластид в

разных соотношениях. Однако на препаратах не наблюдается присутствия одновременно двух типов пластид, нормальных и аномальных. Вместо этого, все пластиды имеют скорее промежуточный фенотип. Механизм этого не вполне понятен, можно предположить, что фактор, кодируемый пластидным геномом и ответственный за исследуемый конфликт пластид и ядра, способен мигрировать в цитоплазме между пластидами и унифицировать их фенотип.

3.4. Нарушения мейоза как проявление ядерно-цитоплазматической несовместимости.

Были получены гибриды F_1 от скрещивания линий Спринт-1 и ВИР320 в реципрокных комбинациях: Спринт-1 \times ВИР320 и ВИР320 \times Спринт-1. Из полученных 6 растений F_1 от скрещивания ВИР320 \times Спринт-1 четыре растения имели характерный фенотип с выраженной хлорофилльной недостаточностью, и 2 растения имели характерный фенотип в нижней части растения, при этом боковые ветки имели нормальную зеленую окраску. Как было показано выше, такие зеленые сектора образуются на растении F_1 при попадании туда хлоропластов от отцовского родителя за счет неканонического наследования этого типа клеточных органелл, митохондрии при этом наследуются строго по материнской линии. Гибриды F_1 от скрещивания Спринт-1 \times ВИР320 имели нормальную хлорофилльную окраску. Была проведена оценка фертильности пыльцы с помощью окраски ацетокармином, данные по подсчету пыльцевых зерен приведены в таблице 3.

Таблица 3. Фертильность пыльцы в линии ВИР320 и ее гибридах.

| Линия | Проанализировано цветков | Подсчитано пыльцевых зерен | Процент фертильных пыльцевых зерен |
|--------------------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| ВИР320 | 6 | 1298 | 85,7 |
| Спринт-1 × ВИР320 | 6 | 937 | 86,4 |
| ВИР320 × Спринт-1 | 6 | 1762 | 10,6 |
| ВИР320 × Спринт-1 (зеленая ветка) | 2 | 345 | 89,8 |

Таким образом, фертильность пыльцы гибридов Спринт-1 × ВИР320 существенно не отличается от родительской линии ВИР320, тогда как в гибридах ВИР320 × Спринт-1 фертильность пыльцы значительно снижена. Для проверки того, происходит ли восстановление фертильности пыльцы при попадании отцовских хлоропластов в гибридное растение, был проведен подсчет пыльцевых зерен в цветках, образовавшихся на зеленых ветках двух растений ВИР320 × Спринт-1, которые, как известно, приобретают зеленую окраску за счет наследования отцовских хлоропластов. Как видно из таблицы 3, в этом случае происходит также восстановление фертильности пыльцы. Данный результат свидетельствует о том, что имеет место конфликт хлоропластов линии ВИР320 с гетерозиготным ядерным геномом, образовавшимся в результате скрещивания с линией Спринт-1, этот ядерно-цитоплазматический конфликт выражается не только в нарушении хлорофилльной окраски, но также в значительном снижении фертильности пыльцы.

События, приводящие к появлению стерильной пыльцы, могут происходить в материнских клетках пыльцы на стадии мейоза или уже в микроспоре, на стадии первого митоза. При помощи светового микроскопа был исследован процесс мейоза в пыльниках гибридов F_1 , которые имели идентичный ядерный геном, но разный состав клеточных органелл. Гибриды

Спринт-1 × ВИР320 имеют пластиды и митохондрии от Спринт-1; ВИР320 × Спринт-1 имеют пластиды и митохондрии от ВИР320; зеленые ветки гибрида ВИР320 × Спринт-1 имеют митохондрии от ВИР320, пластиды от Спринт-1. На Рис. 10 представлены разные фазы мейоза у трех типов гибридов.

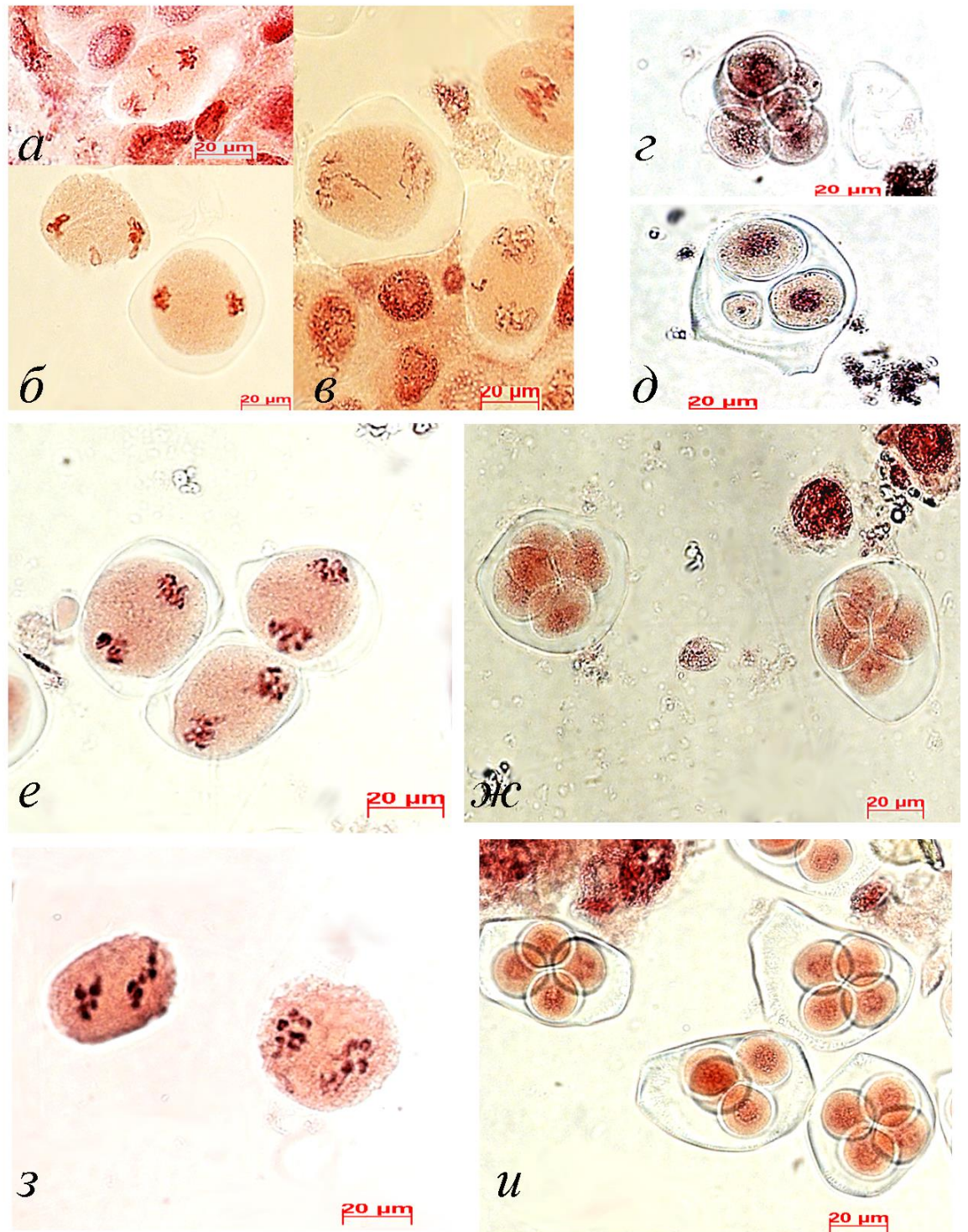


Рис. 10. Мейоз в материнских клетках пыльцы у реципрокных гибридов F_1 линии ВИР320. а–д – ВИР320 × Спринт-1; анафаза I, телофаза I и микроспоры, образовавшиеся в результате аномального цитокинеза; е, ж – Спринт-1 × ВИР320; анафаза I и тетрады микроспор; з, и – зеленые ветки гибрида ВИР320 × Спринт-1; анафаза I и тетрады микроспор.

У гибрида ВИР320 × Спринт-1 наблюдаются аномалии уже в первом делении мейоза (Рис. 10, а, б, в). Расхождение хромосом в анафазе I происходит асинхронно, две, реже одна хромосомы не участвуют в расхождении хромосом к полюсам (Рис. 10, а) и наблюдаются в экваториальной зоне деления клеток вплоть до телофазы I (Рис. 10, б). Во время второго деления мейоза возможно деление оставшихся хромосом на хроматиды, однако включение их в состав вновь формирующихся ядер в телофазе II не происходит. Цитокинез у гибрида ВИР320 × Спринт-1 в связи с этим проходит аномально, и наряду с тетрадами микроспор формируются триады, пентады и гексады (Рис. 10, г, д).

По составу ядерного генома реципрокные гибриды Спринт-1 × ВИР320 не отличаются от описанных выше гибридов ВИР320 × Спринт-1, но их пластиды и митохондрии происходят от линии Спринт-1. Оказалось, что в пыльниках цветков гибридов Спринт-1 × ВИР320 нарушения в процессе мейоза наблюдаются значительно реже, задержки хромосом при расхождении к полюсам не происходит (Рис. 10, е), формирование тетрад микроспор проходит нормально (Рис. 10, ж). В пыльниках цветков, взятых с зеленых веток ВИР320 × Спринт-1, у которых пластиды происходят от отцовского растения Спринт-1, нарушения мейоза также редки (Рис. 10, з, и).

Была проведена оценка частоты нарушений мейоза у разных типов гибридов. Для этого подсчитывали число мейотических клеток, имеющих нарушения в расхождении хромосом, а также тетрады микроспор, содержащие больше или меньше четырех клеток, т.е. в качестве аномалий мейоза рассматривали события, происходящие до первого неравного митоза. Данные по частоте нарушений приведены в таблице 4.

Таблица 4. Аномалии мейоза в гибридах линии ВИР320.

| Тип гибрида | Проанализировано мейотических клеток | Процент клеток с аномалиями |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| ВИР320 × Спринт-1 | 136 | 80,1 |
| Спринт-1 × ВИР320 | 193 | 5,2 |
| ВИР320 × Спринт-1 (зеленая ветка) | 109 | 6,4 |

Таким образом, у гибридов ВИР320 × Спринт-1 с признаками ядерно-цитоплазматического конфликта частота нарушений мейоза значительно выше, чем у гибридов без признаков ядерно-цитоплазматического конфликта, и приближается к наблюдаемому уровню стерильности пыльцы (89,4%, табл. 3).

Поскольку ядерно-цитоплазматический конфликт сопровождается нарушениями в расхождении хромосом к полюсам в мейозе, было проверено, как протекает митоз у гибридов линии ВИР320. Данные микроскопического исследования препаратов митотических хромосом приведены на Рис. 11.

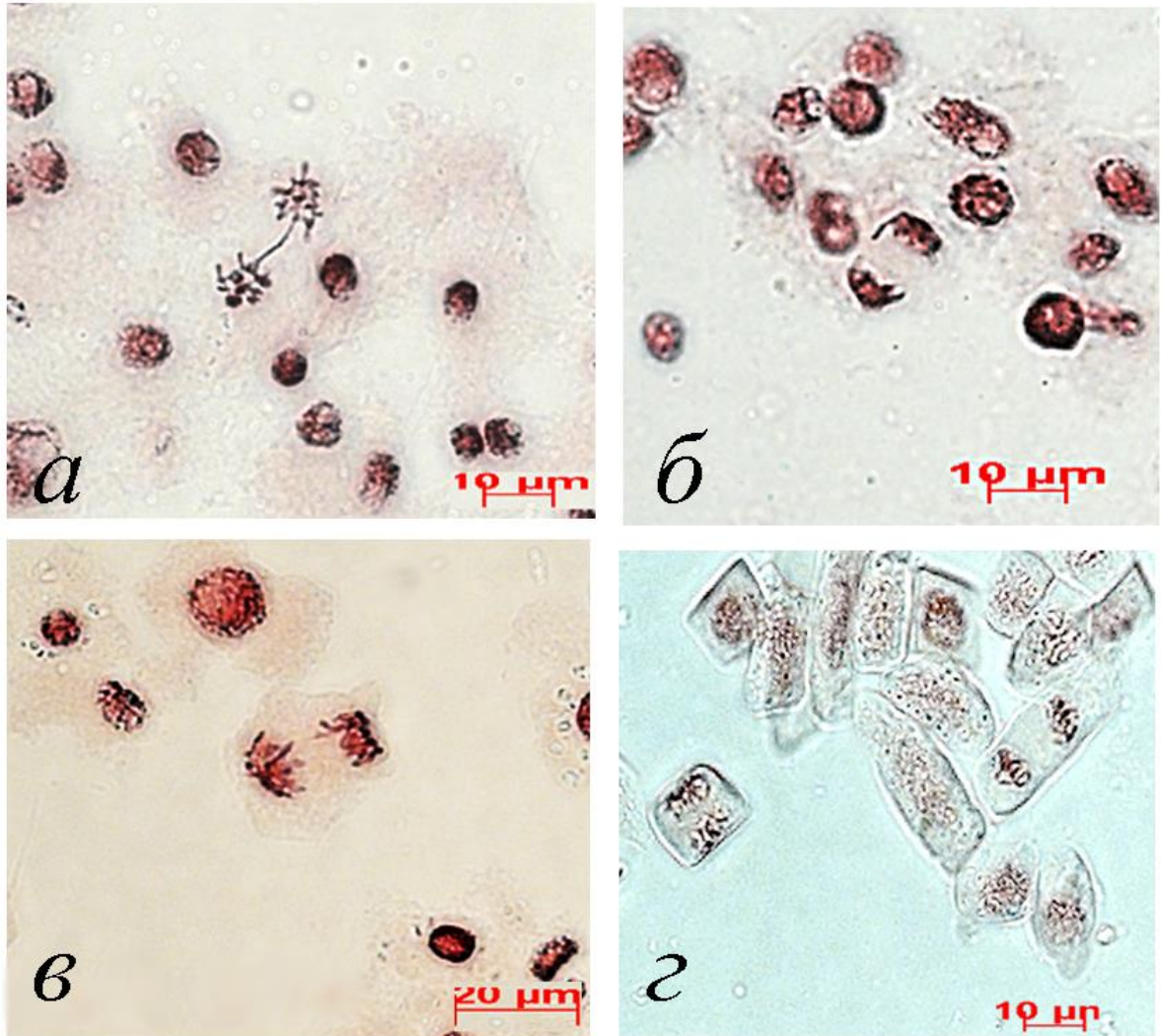


Рис. 11. Митоз в клетках лепестков реципрокных гибридов F_1 линии ВИР320. а, б – ВИР320 \times Спринт-1; анафаза и телофаза митоза; в – Спринт-1 \times ВИР320; анафаза митоза; г – зеленые ветки гибрида ВИР320 \times Спринт-1; анафаза и телофаза митоза.

В случае несовместимости ядерного и пластидного геномов протекание митоза несколько отличается от митоза в отсутствие внутриклеточного конфликта. В анафазе митоза у гибридов ВИР320 \times Спринт-1 наблюдаются задержки движения некоторых хромосом (Рис. 11, а), однако запаздывающие хромосомы попадают в телофазные ядра, и деление на дочерние клетки проходит нормально (Рис. 11, б). Нарушений в процессе клеточного деления

соматических клеток гибридов Спринт-1 × ВИР320 (Рис. 11, в) и клеток, взятых с зеленых веток ВИР320 × Спринт-1 (Рис. 11, г) не обнаружено.

Таким образом, у гибридов линии ВИР320, относящейся к дикорастущему подвиду гороха *Pisum sativum* subsp. *elatius*, наблюдается конфликт ядерного и пластидного геномов, что выражается не только в нарушении хлорофилльной окраски, но также в нарушении течения мейоза в материнских клетках пыльцы. Если хлорофилльная пигментация явным образом связана с работой хлоропластов, то связь процессов, регулирующих течение мейоза, с функционированием пластидного генома не представляется очевидной. У мхов и печеночников пластиды служат центром формирования полюсов веретена деления (Shimamura et al., 2004), но для пластид высших растений эта функция не характерна, хотя не исключено, что в клеточных органеллах аккумулируются предшественники гамма-тубулина, основного белкового компонента микротрубочек (Dibbayawan et al., 2001).

В настоящей главе описан ядерно-цитоплазматический конфликт, который приводит к появлению растений с очень необычным, бросающимся в глаза фенотипом, с сильно редуцированными листовыми органами и выраженными аномалиями хлорофилльной окраски. Кроме того, для таких растений характерна сильно сниженная фертильность пыльцы и нарушение течения мейоза, что не заметно невооруженным глазом и обнаруживается лишь при микроскопическом исследовании. Подробное описание разнообразных фенотипических проявлений ядерно-цитоплазматического конфликта стало возможным только после выбора удобной модели, позволяющей регистрировать ярко выраженные аномалии уже в первом поколении гибридов. Такой моделью стали гибриды культурного гороха от скрещивания с линией дикорастущего гороха ВИР320, принадлежащей подвиду *Pisum sativum* subsp. *elatius*, происходящей из Палестины (согласно карточке ВИР) и обладающей уникальным свойством вызывать хорошо заметные глазом аномалии фенотипа у потомков. Принадлежность линии

ВИР320 к тому же виду *Pisum sativum*, что и культурный горох, позволила провести гибридологический анализ и вскрыть некоторые особенности наследования и локализовать на генетической карте ядерные гены, участвующие в развитии ядерно-цитоплазматического конфликта.

ГЛАВА 4.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ
НЕСОВМЕСТИМОСТИ У ГОРОХА.

При скрещиваниях образца дикорастущего гороха ВИР320, относящегося к подвиду *Pisum sativum* subsp. *elatius*, в качестве материнского растения с культурным горохом *P. sativum* subsp. *sativum* образуются гибриды F₁, которые отличаются высокой стерильностью, хлорофилльной недостаточностью мозаичного типа, редуцированными листочками и прилистниками (Глава 3). Был проведен генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости, характерной для потомков от скрещивания образца ВИР320. Непосредственный анализ расщепления генотипов и фенотипов в поколениях гибридов практически невозможен по ряду причин. Гибриды, имеющие цитоплазму, конфликтующую с ядерным геномом, практически не дают семян, кроме того, изучаемый конфликт проявляется лишь в присутствии цитоплазмы дикорастущего гороха, а гибриды полученные путем скрещивания, в условиях конфликта могут наследовать пластыди неканоническим двуродительским путем. В связи с этим для генетического анализа была создана картирующая популяция рекомбинантных инбредных линий (РИЛ), каждая из которых представляла собой потомство одного растения, полученного путем инбридинга в течение шести поколений. Было проведено скрещивание тестерной линии WL1238 с линией ВИР320 как источником ядерных генов, обеспечивающих совместимость с цитоплазматическим геномом дикорастущего подвида, и получено потомство F₂, которое в дальнейшем подверглось инбридингу. Данное направление скрещивания является совместимым, и потомство от этого скрещивания выглядит нормальным. В результате шести поколений инбридинга была сформирована популяция растений РИЛ (около 100 растений), средняя гетерозиготность которой составила $2^{-6}=1/64$. Ожидается, что оставшаяся часть растений, несет в гомозиготе аллель, унаследованный

от дикорастущего (ВИР320) либо от культурного (WL1238) родителя, в каждом отдельно взятом гене (Материалы и методы, Рис. 1).

4.1. Выявление ядерных генетических факторов, участвующих в конфликте ядра и пластид.

Линии картирующей популяции были охарактеризованы с точки зрения способности вызывать ядерно-цитоплазматический конфликт при скрещивании в качестве источника пыльцы с линией ВИР320 (Материалы и методы, Рис. 1, 2). При подобном дизайне эксперимента ожидается, что те линии РИЛ, которые унаследовали аллель (либо аллели) фактора (либо факторов) несовместимости от культурного родителя, WL1238, будут давать потомство с типичными признаками ядерно-цитоплазматического конфликта в виде хлорофилльной недостаточности окраски, варьирующей от бледно-зеленой до желтоватой и беловатой, часто мозаичной, а также сильной редукцией листочков и прилистников. Далее в тексте подобный фенотип обозначен как "абберантный". Те же линии РИЛ, которые унаследовали аллель (либо аллели) фактора (либо факторов) несовместимости от дикорастущего родителя, ВИР320, должны были дать потомство без явных признаков ядерно-цитоплазматического конфликта (Рис. 2).

Действительно, семьи F_1 относились к одному из двух четко разделяемых классов. Некоторые из линий РИЛ давали потомство с типичным "абберантным" фенотипом (Рис. 12, а, б), тогда как другие линии давали потомство без явных признаков несовместимости, но они часто были бледно-зелеными (особенно в условиях низкой освещенности), но никогда желтоватыми или беловатыми. Иногда на бледно-зеленых листьях образовывались интенсивно-зеленые сектора (Рис. 12, в), которые несли "незаконно" унаследованные отцовские пластиды, что определялось рестриктазным анализом пцр-амплифицированного пластидного маркера *rbcL* (не показано). У некоторых растений на верхних узлах были уменьшены

прилистники (Рис. 12, г). Однако, отдельные классы среди не-"абберантных" потомков не выявлялись.

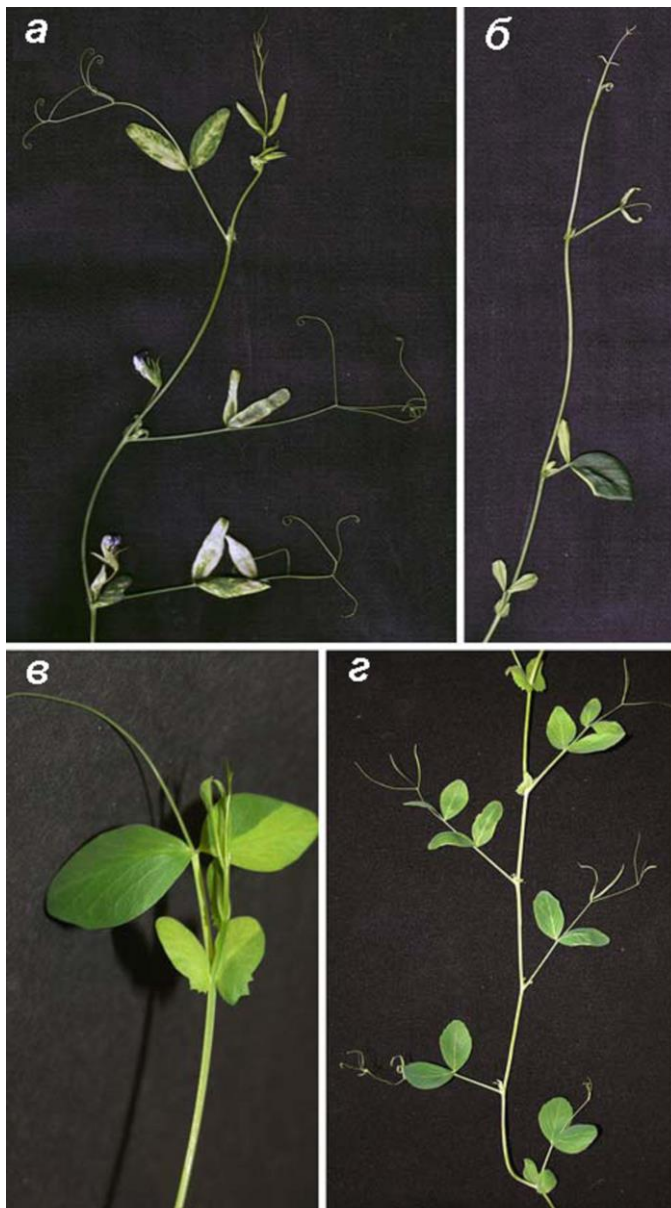


Рис. 12. Фенотипы растений F_1 от скрещивания ВИР320 с линиями из популяции РИЛ. а, "абберантный" фенотип с явно выраженной хлорофилльной недостаточностью мозаичного типа, сильно редуцированными листочками и прилистниками; б, "абберантный" фенотип с участками нормальной ткани; в, растение без явно выраженных проявлений ядерно-цитоплазматического конфликта, сочетающее темно-зеленые и бледно-зеленые участки; г, растение без явно выраженных проявлений ядерно-цитоплазматического конфликта с редуцированными прилистниками на некоторых из верхних узлов стебля.

На основании результатов анализа фенотипа потомков F_1 от скрещивания линии из популяции РИЛ с линией ВИР320 как источником цитоплазмы, каждую линию РИЛ классифицировали как относящуюся к одному из генотипических классов: "d" (от англ. "dominant"), доминантный, т.е. видимый в F_1 , если все потомки были "абберрантными"; "r" класс (от англ. "recessive"), рецессивный, т.е. не проявляющий себя в F_1 , если все потомки были не "абберрантными"; и "h" (от англ. "heterozygous"), гетерозиготы, если в потомстве линии встречались как "абберрантные", так и не- "абберрантные" растения. Из 95 проанализированных РИЛ шесть оказались гетерозиготными и были исключены из дальнейшего анализа. Оставшиеся были классифицированы как 32 "d" и 57 "r". Это соотношение существенно отличается как от 1:1, ожидаемого для моногенного расщепления, так и от 1:3, ожидаемого в случае дигибридного расщепления. Для начала была принята моногенная модель, и фактор, ответственный за ядерно-цитоплазматическую несовместимость, был временно обозначен как *Scs*, по аналогии с геном пшеницы *scs* (species cytoplasm specific), имеющим сходный эффект (Maan, 1992, a). Используемая тестерная линия WL1238 несет ряд видимых маркеров в группах сцепления LGII, III, V, VI. Оценки генетического расстояния между *Scs* и видимыми маркерами, которые расщеплялись в популяции РИЛ, приведены в Таблице 5.

Таблица 5. Число линий РИЛ с указанными генотипами среди линий, дающих потомство имеющее ("d" класс) и не имеющее ("r" класс) явные признаки ядерно-цитоплазматического конфликта, и расстояния между *Scs* и видимыми маркерами, рассчитанные по формуле Холдейна (Haldane, Waddington, 1931).

| Маркер | Группа сцепления | "d" класс | | "r" класс | | Генетическое расстояние (сМ) |
|-----------|------------------|---|--|---|--|------------------------------|
| | | Аллель указанного маркера, унаследованный от WL1238 | Аллель указанного маркера, унаследованный от ВИР320 ^a | Аллель указанного маркера, унаследованный от ВИР320 | Аллель указанного маркера, унаследованный от WL1238 ^a | |
| <i>wb</i> | II | 14 | 18 | 21 | 36 | 77,1 |
| <i>k</i> | II | 11 | 21 | 22 | 35 | 84,8 |
| <i>le</i> | III | 13 | 19 | 35 | 22 | 42,7 |
| <i>b</i> | III | 22 | 10 | 34 | 23 | 29,5 |
| <i>m</i> | III | 21 | 11 | 30 | 26 | 36,3 |
| <i>tl</i> | V | 16 | 15 | 26 | 26 | 48,8 |
| <i>gp</i> | V | 32 | 0 | 26 | 31 | 26,7 |
| <i>fl</i> | VI | 13 | 19 | 31 | 26 | 51,1 |
| <i>pl</i> | VI | 18 | 14 | 27 | 29 | 47,8 |

^a – рекомбинантные классы

Таким образом, выяснилось, что маркеры *wb*, *k* (LGII); *le* (LGIII); *tl* (LGV); *fl*, *pl* (LGVI) не были сцеплены с *Scs*, тогда как локусы *m*, *b* и *gp* были картированы на расстоянии 36,3, 29,5, 26,7 сМ от *Scs*, соответственно (Табл. 5). Поскольку два из этих маркеров, *m* и *b*, относятся к группе сцепления III, в анализ были вовлечены молекулярные маркеры, локализованные в той же группе сцепления: *aatC*, *uni*, *Rnp33*, *PhlC*, *Cbl*, *Gsn*, *Gpt*, *Vc-3*. Для разработки CAPS-маркеров, пригодных для различения родительских линий, подбирали пцр-праймеры, подходящие к последовательностям из публичных баз данных

(Табл. 1) и подбирали рестриктазы, дающие разный паттерн фрагментов в линиях WL1238 и ВИР320. После этого определяли аллельное сосояние локусов группы сцепления LGIII у растений популяции РИЛ.

Полученная рекомбинационная карта для маркеров группы сцепления III (Рис. 13, а) хорошо соответствует расположению генов данной группы сцепления (Weeden, Moffett, 2007), кроме гена *b*, позицию которого мы не смогли определить однозначно. С помощью программного обеспечения Mapmaker 3.0 ген *Scs* был картирован между *PhlC* и *Cbl*.

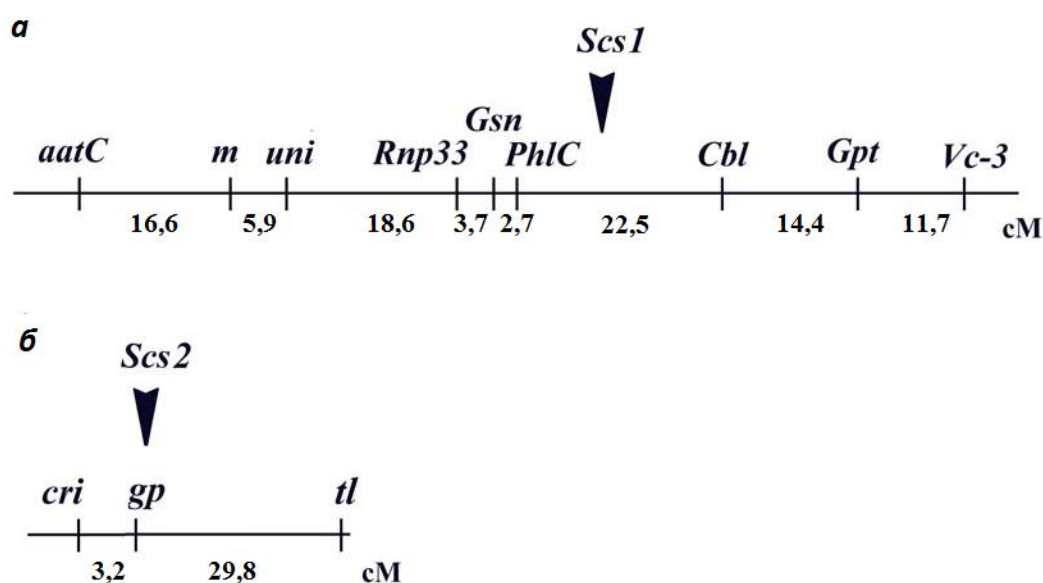


Рис. 13. Изученные генетические маркеры на рекомбинационной карте группы сцепления LGIII (а) и LGV (б).

Генетические дистанции, определенные по формуле Холдейна, составили: 16,2 сМ между *Scs* и *PhlC* и 22,0 сМ между *Scs* и *Cbl*, тем самым определив *PhlC* как ближайший маркер к *Scs*. Далее в тексте аллели, происходящие от линии WL1238 или ВИР320, обозначаются как символ гена с подчеркиванием и номером родительской линии, например, *PhlC_1238* и *PhlC_320*.

Полученные оценки генетических расстояний были противоречивыми. Во-первых, их сумма сильно превосходила расстояние между окаймляющими маркерами *PhlC* и *Cbl* (22,5 сМ). Во-вторых, расстояние

между *Scs* и *PhlC*, подсчитанное отдельно для класса "d", то есть линий РИЛ, дающих типичный синдром ядерно-цитоплазматической несовместимости, составило 1,6 сМ, что разительно отличалось от того же расстояния, подсчитанного для класса "r" (32,4 сМ). Линии, несущие аллель *PhlC_320* в своем большинстве относились к классу "r", то есть не давали типичных признаков ядерно-цитоплазматического конфликта, тогда как среди линий, несущих аллель *PhlC_1238* было значительное число представителей как класса "r", так и класса "d". Таким образом, был сделан вывод, что (1) генетический фактор *Scs* тесно сцеплен с геном *PhlC* и (2) в популяции РИЛ происходит расщепление дополнительного фактора, который, в сочетании с *Scs*, необходим для развития типичного синдрома ядерно-цитоплазматической несовместимости. Помня о возможном сцеплении *Scs* с геном *gp* (26,7 сМ, Табл. 5), был проведен анализ аллельного состояния локуса *gp* у линий популяции РИЛ. Как было указано выше, линии, гомозиготные по *PhlC_320*, в основном относились к классу "r", а что касается линий гомозиготных по *PhlC_1238*, была обнаружена сильная корреляция между принадлежностью линии к классу "d" или "r" и вариабельностью в локусе *gp* (Табл. 6). Ген *gp* локализован в группе сцепления LGV и определяет желтую окраску молодых бобов. Генетические расстояния между маркерами LGV, подсчитанные по формуле Холдейна, показаны на Рис. 13, б.

Таблица 6. Число линий РИЛ, дающих и не дающих синдром ядерно-цитоплазматической несовместимости при скрещивании с ВИР320 и ГОМОЗИГОТНЫХ по указанному аллелю генов *PhlC* и *gp*.

| Аллель <i>PhlC</i> (LGIII), происходящий от указанного родителя | Аллель <i>gp</i> (LGV), происходящий от указанного родителя | Число линий, совместимых с цитоплазмой ВИР320, класс "r" | Число линий, несовместимых с цитоплазмой ВИР320, класс "d" |
|---|---|--|--|
| 1238 | 1238 | 2 ^a | 31 |
| 1238 | 320 | 20 | 0 |
| 320 | 1238 | 29 | 1 ^a |
| 320 | 320 | 6 | 0 |

^a – рекомбинантные классы

Из данных Таблицы 6 был сделан вывод, что типичный синдром ядерно-цитоплазматической несовместимости обусловлен двумя ядерными генами, один из которых сцеплен с геном *PhlC* группы сцепления III, и второй сцеплен с геном *gp* группы сцепления V. Первый из этих генов был обозначен *Scs1* (вместо использованного ранее временного обозначения *Scs*), и второй – *Scs2*. Ядерно-цитоплазматический конфликт, который проявляется в виде сильной хлорофилльной недостаточности с окраской, варьирующей от бледно-зеленой до желтоватой и беловатой, часто мозаичной, и редукции листовых органов, развивается при условии, что цитоплазма унаследована от дикорастущего родителя, ВИР320, а аллели обоих генов *Scs1* и *Scs2*, происходящие от WL1238 находятся в гетерозиготе, то есть *Scs1*₁₂₃₈ и *Scs2*₁₂₃₈ являются доминантными. Если только один из *Scs* локусов гетерозиготен, а второй гомозиготен по аллелю от дикорастущего родителя, ядерно-цитоплазматический конфликт в его типичной форме не развивается, так что растения F₁ имеют зеленую окраску и нормальную морфологию листовых органов. Из 89 проанализированных РИЛ три не укладываются в

эту схему, они считались рекомбинантами (Табл. 6). Следует отметить, что хлорофилльная пигментация растений, избежавших типичного конфликта, не столь интенсивна, как у растений того же генотипа, но полученных от реципрокного скрещивания, особенно в условиях низкой освещенности (Рис. 12, в). Тем не менее, в этих случаях хлорофилльная окраска не выглядит желтоватой или беловатой и не может быть спутана с "абберантным" фенотипом. Возможно, растения, гетерозиготные по *Scs1* (что определяется по гетерозиготности локуса *PhlC*) имеют более бледную окраску, чем растения, гетерозиготные по *Scs2* (что определяется по гетерозиготности локуса *gp*). Кроме того, растения, гетерозиготные по *Scs1* и гомозиготные по *scs2_320* часто имеют редуцированные прилистники (Рис. 14) на уровне узлов 7-10 и нормальные прилистники на других узлах.



Рис. 14. Растение F₁ без явных признаков типичного ядерно-цитоплазматического конфликта с редуцированными прилистниками на верхних узлах и нормальными

Данные Таблицы 6 не позволяют оценить генетическую дистанцию между *Scs1* и *PhlC* и между *Scs2* и *gp*, поскольку рекомбинанты, несущие маркеры *PhlC* и *gp*, происходящие от культурного родителя и не дающие типичного ядерно-цитоплазматического конфликта (строка 1 в Табл. 6), могут происходить как в результате рекомбинации между *PhlC* и *Scs1*, так и в результате рекомбинации между *Scs2* и *gp*. Кроме того, если какой-либо из генов *scs1* или *scs2* гомозиготен по аллелю от дикорастущего родителя,

рекомбинационные события, затрагивающие второй ген, нельзя зарегистрировать.

4.2. Особенности наследования генов *Scs1* и *Scs2*.

Были изучены закономерности наследования генов *Scs1* и *Scs2* в поколении F_2 , полученном от самоопыления некоторых растений F_1 , использованных для генетического анализа ядерно- цитоплазматической несовместимости, как описано выше. Было проанализировано наследование аллелей *PhlC* (гена, сцепленного с *Scs1*) у 45 потомков F_2 от скрещивания ВИР320 x РИЛ-52, где линия РИЛ-52 несла аллели *PhlC_1238* и *Gp_320*. Все потомки от этого скрещивания имели цитоплазму, происходящую от дикорастущего родителя ВИР320. Обе родительские линии в данном скрещивании несли фактор несовместимости *scs2*, происходящий от дикорастущего родителя, так что аллели локуса *scs2* не сегрегировали, тогда как по генам *PhlC* и *Scs1* наблюдалось менделевское расщепление. Таким образом, растения этой популяции не имели признаков типичного ядерно-цитоплазматического конфликта. Из 45 проанализированных растений 17 были гетерозиготны по *PhlC*, и 28 растений были гомозиготами по аллелю *PhlC_320*. Отсутствие гомозигот по аллелю *PhlC_1238* свидетельствует об элиминации гомозигот по тесно сцепленному гену *Scs1*. Было выдвинуто предположение, что на фоне цитоплазмы, происходящей от ВИР320, аллель *Scs1* от культурного родителя является гаметофитной и/или рецессивной спорофитной леталью.

Расщепление по гену *Scs2* в поколении F_2 было проанализировано в другом скрещивании на основании расщепления по тесно сцепленному маркеру *cri*, расположенного в группе сцепления V (3,2 сМ от *gp*, согласно данным анализа картирующей популяции РИЛ, Рис. 13, б). Хотя ген *gp* является ближайшим из известных нам маркеров к *Scs2*, он не очень удобен для сегрегационного анализа, поскольку он рецессивен и не позволяет увидеть гетерозиготы. Поэтому был выбран ген *cri* в качестве близко

расположенного ДНК-маркера, который позволяет различить гетерозиготы и два типа гомозигот. Было проанализировано F₂ от скрещивания ВИР320 x РИЛ-116, где линия РИЛ-116 была гомозиготна по *cri_1238* и *PhlC_320*. Поскольку в данном расщеплении происходило расщепление аллелей только одного гена несовместимости, а второй происходил от дикорастущего родителя, то не наблюдалось растений с типичными признаками ядерно-цитоплазматического конфликта. Среди 50 проанализированных растений F₂ 26 оказались гетерозиготами по гену *cri*, и 24 были гомозиготны по аллелю *cri_320*. В соответствии с отсутствием гомозигот по аллелю *cri_1238*, также отсутствовали гомозиготы по аллелю *gp*, что свидетельствует об элиминации гомозигот по тесно сцепленному гену *Scs2*. Вероятной причиной отсутствия указанных гомозигот считали гаметофитную и/или спорофитную летальность гена *Scs2* на фоне цитоплазмы от образца ВИР320, также как и в случае гена *Scs1*. Один из рекомбинантов, указанных в строке 1 Таблицы 6, РИЛ-37, нес аллели *PhlC_1238* и *gp_1238*, но в скрещивании ВИР320 x РИЛ-37 возникали растения F₁ без явных признаков ядерно-цитоплазматического конфликта. Эти растения имели редуцированные прилистники на некоторых из верхних узлов (Рис. 12, 14). Поэтому мы предположили, что у них был гетерозиготен ген *Scs1* сцепленный с *PhlC*, и гомозиготен *scs2_320*, то есть произошел кроссинговер, между *gp* и *Scs2*. В таком случае ожидалось появление гомозигот *gp_1238* в поколении F₂ от этого скрещивания, поскольку *gp* отделился от летали *Scs2* в результате рекомбинационного события. Действительно, среди 41 потомков F₂ от скрещивания ВИР320 x РИЛ-37 семь растений, или около 1/4, были гомозиготами по аллелю *gp_1238*.

Еще одно наблюдение, сделанное при анализе расщеплений в поколении F₂, это явный дефицит гомозигот по аллелю *tl-w*. Две изученные популяции F₂, ВИР320 x РИЛ-116 и ВИР320 x РИЛ-97, в сумме включающих 77 растений, расщеплялись по гену *Tl*. Этот ген полудоминантен, что позволяет регистрировать гетерозиготы. Растения, гомозиготные по аллелю *tl-w* имеют

листочки вместо усиков, тогда как гетерозиготные имеют плоские усики. Было обнаружено следующее соотношение генотипических классов: 33 Tl/Tl : 41 $Tl/tl-w$: 3 $tl-w/tl-w$. Это соотношение существенно отличается от ожидаемого 1:2:1, $\chi^2=93,8$, $p < 0,001$. Вероятно, в этих популяциях F_2 идет расщепление по какому-то рецессивному условно летальному аллелю, сцепленному с $tl-w$, который проявляется на фоне цитоплазмы от ВИР320.

Ожидаемое соотношение генетических маркеров, унаследованных от одного или другого родителя, в популяции РИЛ, прошедшей 6 поколений самоопыления, составляет 1:1 при том, что 1/64 часть линий все еще сохраняет гетерозиготность по отдельным локусам. В этом отношении заслуживает внимания соотношение маркеров, сцепленных с генами ядерно-цитоплазматической несовместимости в случае, когда цитоплазма происходит от культурного родителя, WL1238. В проанализированной популяции из 95 линий РИЛ, которые прошли 6 поколений бессознательного отбора на жизнеспособность, расщепление фенотипов, обусловленных геном gr , было следующим 65 gr_{1238} : 29 Gr_{320} : 1 гетерозигота. Последняя гетерозигота, РИЛ-4, была идентифицирована благодаря расщеплению в следующем поколении, также эта линия была гетерозиготна в отношении порождаемого в скрещивании с ВИР320 "абберрантного" фенотипа. Указанное соотношение 65:29 существенно отличается от ожидаемого 1:1 ($\chi^2=13,79$, $p < 0,001$), что позволяет предположить, что какой-то ген, сцепленный с gr , возможно, $Scs2$, улучшает совместимость ядерного генома с цитоплазмой культурного гороха WL1238. Соотношение носителей разных аллелей локуса $PhlC$ было следующим: 53 $PhlC_{1238}$: 36 $PhlC_{320}$. Гетерозигот по локусу $PhlC$ не наблюдалось, предположительно, они попали в класс гетерозигот по признаку совместимости с цитоплазмой от ВИР320, и у них не анализировали молекулярные маркеры. Соотношение 53:36 хотя и отличается от 1:1, однако, значение $\chi^2=3,2$ не является статистически значимым ($p > 0,05$), указывая на то, что сцепленный ген $Scs1$ имеет меньше

влияния на совместимость с цитоплазмой WL1238, чем ген *Scs2*, если таковое влияние имеется.

4.3. Фенотипическое проявление генов *Scs1* и *Scs2*.

Выше было приведено описание ядерно-цитоплазматического конфликта, который проявляется в виде хлорофилльной недостаточности, часто мозаичного типа, редукции листовых органов. Данный конфликт развивается у гибридов в случае, когда цитоплазма дикорастущего гороха линии ВИР320 сочетается с ядерным геномом, у которого два несцепленных локуса, *Scs1* и *Scs2*, гетерозиготны по аллелям, происходящим от культурного гороха WL1238. Таким образом, аллели обоих этих генов, происходящие от WL1238, доминантны и комплиментарны. Если только один из этих генов гетерозиготен, а второй ген гомозиготен по аллелю от дикорастущего родителя, ядерно-цитоплазматический конфликт в его типичной форме не развивается. Однако хлорофилльная пигментация таких растений развита слабее, чем у растений того же генотипа, полученных от реципрокного скрещивания. Была изучена фертильность пыльцы у гибридов F_1 , полученных от скрещивания линии ВИР320 в качестве донора цитоплазмы с 60 линиями картирующей популяции РИЛ. Аллельное состояние локусов *Scs1* и *Scs2* определяли, исходя из аллельного состояния тесно сцепленных маркеров в группах сцепления LGIII и LGV, *PhlC* и *gp*, соответственно. В проведенных скрещиваниях было получено от одного до 11 растений F_1 (в среднем 4), с каждого растения F_1 собирали от двух до 25 цветков (в среднем 12). Значение фертильности пыльцы, рассчитанное как отношение числа окрашенных пыльцевых зерен к общему числу подсчитанных пыльцевых зерен, суммированных по всем цветкам одной РИЛ, использовали для характеристики данной линии.

Таблица 7. Фертильность пыльцы в потомстве F_1 от скрещивания ВИР320 с линиями из популяции РИЛ, имеющими указанное аллельное состояние локусов *Scs1* и *Scs2*.

| <i>Scs1</i> | <i>Scs2</i> | Число линий | диапазон значений фертиль- ности пыльцы | среднее значение со стандартной ошибкой | стандарт. отклоне- ние |
|-------------|-------------|----------------|---|--|------------------------------|
| 320 | 320 | 5 | 0,94 – 0,96 | $0,950 \pm 0,003$ | 0,007 |
| 1238 | 320 | 20 | 0,42 – 0,59 | $0,509 \pm 0,010$ | 0,043 |
| 320 | 1238 | 28 | 0,44 – 0,91 | $0,691 \pm 0,022$ | 0,115 |
| 1238 | 1238 | 7 | 0,21 – 0,41 | $0,329 \pm 0,033$ | 0,087 |

Приведенные в Табл. 7 значения фертильности пыльцы демонстрируют, что потомки F_1 , гомозиготные по аллелям *scs1_320* и *scs2_320* (строка 1) имели высокофертильную пыльцу. Растения F_1 , гомозиготные по одному из генов совместимости и гетерозиготные по второму (строки 2 и 3 в Табл. 7), имели сниженную фертильность пыльцы, хотя сами растения выглядели вполне нормально (Рис. 12, в, г; Рис. 14). Гетерозиготы по локусу *Scs1* (строка 2 в Табл. 7), как правило, имели более низкую фертильность пыльцы (в среднем 0,509), чем гетерозиготы по локусу *Scs2* (строка 3 в Табл. 7) со средним значением 0,691. В то же время диапазон значений фертильности пыльцы гетерозигот по локусу *Scs2* был шире, и стандартное отклонение данного признака было выше. Растения F_1 , гетерозиготные одновременно по обоим локусам совместимости, проявляли типичный ядерно-цитоплазматический конфликт и имели фертильности пыльцы значительно ниже, чем растения, гетерозиготные только по одному из указанных локусов. Числовое значение фертильности пыльцы у двойных гетерозигот, 0,329, приблизительно равно произведению средних значений фертильности

пыльцы в классах гетерозигот по одному гену совместимости ($0,691 * 0,509 \approx 0,352$). Эти данные позволяют сделать заключение, что каждый из локусов, *Scs1* и *Scs2*, будучи в гетерозиготе, снижает фертильность пыльцы, а совместное действие двух локусов приводит к значительному снижению фертильности пыльцы, а также хлорофилльной недостаточности и редукции листовых органов, при условии, что цитоплазма унаследована от дикорастущего родителя – линии ВИР320.

Как было описано выше, в расщеплениях F₂ от скрещивания ВИР320 с линией РИЛ-52 не наблюдалось гомозигот по аллелю *Scs1_1238* и в F₂ от скрещивания ВИР320 с РИЛ-116 не наблюдалось гомозигот по аллелю *Scs2_1238*. Сходные результаты были получены в скрещиваниях посевного гороха *Pisum sativum* с представителями вида *P. fulvum*. В расщеплениях отсутствовали некоторые генотипы, предположительно из-за летальности спорофитов (De Martino et al., 2000). В настоящей работе был проведен генетический анализ с целью определения, являются ли локусы *Scs1* и *Scs2* причиной летальности спорофитов и/или летальности для мужских гаметофитов.

4.4. Маркеры и линии, использованные для генетического анализа.

Ближайшим к гену *Scs1* на рекомбинационной карте третьей группы сцепления известным нам генетическим маркером является *PhlC*. Для поиска маркеров, расположенных по другую сторону от *Scs1*, были использованы имеющиеся в публичном доступе (<http://www.medicago.org>) расшифрованные нуклеотидные последовательности генома однолетней люцерны (*Medicago truncatula*). Ортолог гена *PhlC* у *M. truncatula* расположен в ВАС-клоне АС145219. Для анализа был выбран ген *nsp2*, расположенный в ВАС-клоне CR538722 (позиция с29943-28426), кодирующий белок GRAS-семейства. В геноме гороха этому гену соответствует последовательность AJ832139 (*Pisum sativum sym7 gene for GRAS family protein*). Последовательность AJ832139 считается принадлежащей гену *sym7*, принимающему участие в

передаче внутриклеточных сигналов, в том числе при образовании клубеньков (Kalo et al., 2005). Ген с таким же обозначением был описан Kneen с соавт. (Kneen et al., 1994) и стоит на генетической карте LGIII гороха дистальнее гена *b* (Weeden et al., 1998), при этом не вполне понятно, идет ли речь об одном и том же гене у разных авторов. Поэтому в настоящей работе во избежание путаницы, для гена, кодирующего транскрипционный фактор GRAS-семейства и расположенного на генетической карте проксимальнее *b*, принято обозначение *AJ832139*.

Было проанализировано аллельное состояние гена *AJ832139* у растений имеющейся популяции РИЛ для оценки генетического расстояния между *PhlC* и *AJ832139*. Из 89 растений пять оказались кроссоверами, что дает оценку 3,0 сМ при расчете по формуле Холдейна (Haldane, Waddington, 1931). Такое расстояние на генетической карте дает основания предполагать, что *PhlC* и *AJ832139* располагаются по разные стороны от *Scs1*.

Для анализа были использованы видимые маркеры, *st* (редуцированные прилистники) в группе сцепления LGIII, *gp* (желтая окраска молодых бобов), *tl* (листочки вместо усиков) в группе сцепления LGV, *k* (редуцированные крылья цветка) в группе сцепления LGII.

В качестве доноров известных аллелей локусов *Scs1* и *Scs2*, а также тестерных линий для генетического анализа использовали линии из популяции РИЛ, а также специально созданные тестерные линии *gp37* и *st320*. Линия *gp37* была получена как популяция F₅, восходящая к одному растению F₃ от скрещивания ВИР320 × РИЛ-37. Линия *st320* несла видный маркер *st*, унаследованный от культурной линии WL1072, и молекулярные маркеры *PhlC* и *AJ832139*, сцепленные с *st*, но происходящие от линии ВИР320. Схема получения линии *st320* изображена на Рис 15.

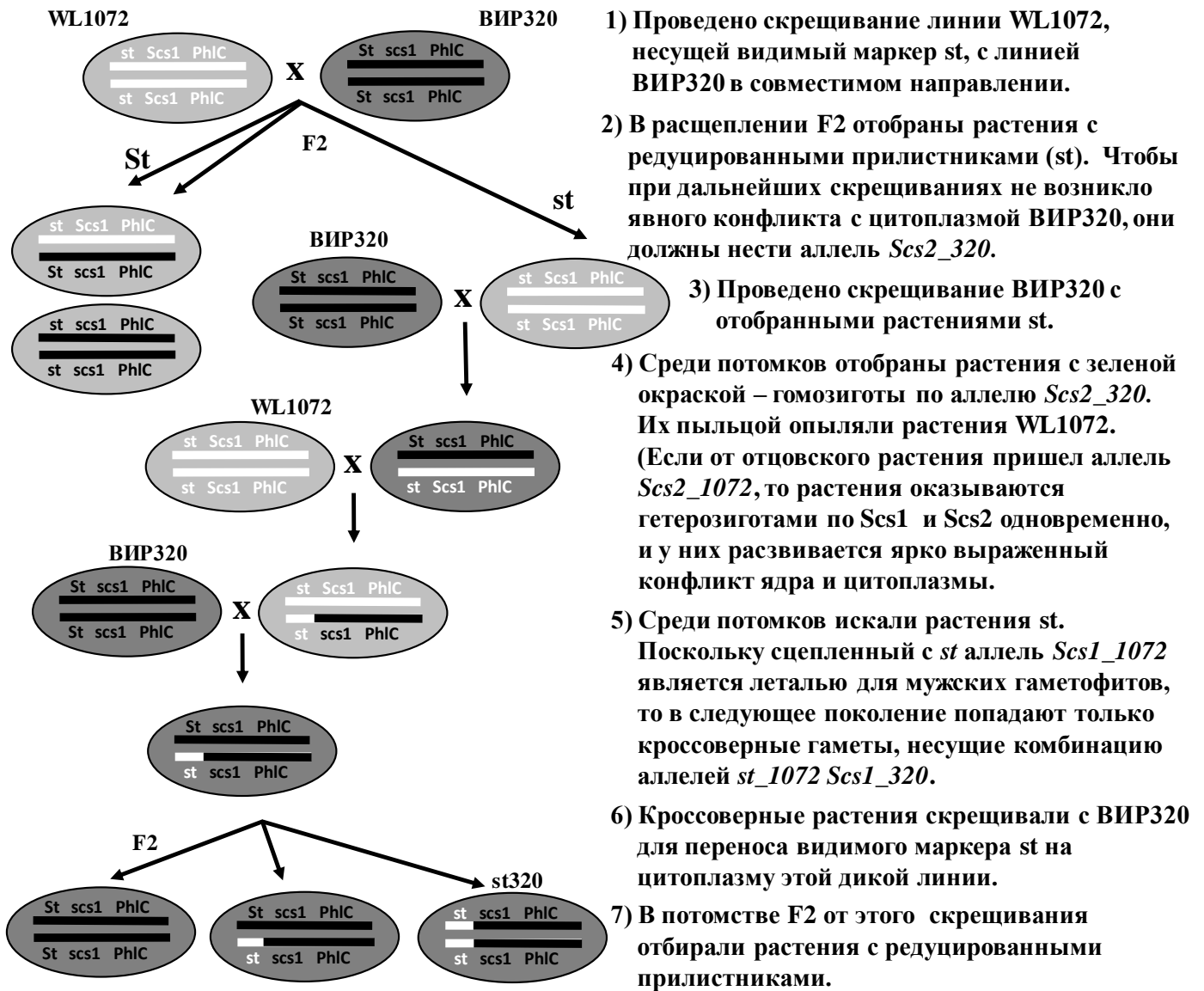


Рис 15. Схема получения тестерной линии *st320*. Светло-серым цветом показано происхождение цитоплазмы от культурного гороха, темно-серым цветом – от дикорастущего гороха. Белым цветом обозначены маркеры, происходящие от WL1072, черным цветом – происходящие от ВИР320.

Аллельное состояние видимых и молекулярных маркеров в линиях, использованных для генетического анализа, приведено в Табл. 2 (Глава 2).

4.5. Влияние аллельного состояния *Scs1* на жизнеспособность мужских гаметофитов.

Жизнеспособность мужских гаметофитов, несущих аллель *Scs1* от культурного гороха, на фоне цитоплазмы дикорастущего гороха линии ВИР320 проверяли в анализирующем скрещивании. В качестве тестерной линии использовали *st320*, которую опыляли пыльцой растений, гетерозиготных по локусу *Scs1*. При таком скрещивании, если все мужские гаметофиты жизнеспособны, ожидаемое расщепление составит 1 St : 1 st.

Были использованы гетерозиготы, которые ранее участвовали в создании линии *st320*. Для их получения потребовалось несколько шагов (Рис 15, шаги 1–4), включающих скрещивание линий WL1072 и ВИР320 и отбор нужных генотипов. В расщеплении F₂ от скрещивания WL1072 × VIR320 отбирали растения с редуцированными прилистниками (*st*) и остальными маркерами группы сцепления LGIII, унаследованными от WL1072. Этот шаг понадобился для того, чтобы избавиться от аллеля *Scs2_1072* посредством сегрегации в F₂. Это было необходимо, поскольку непосредственное скрещивание ВИР320 с культурным горохом, несущим одновременно аллели *Scs1_1072* и *Scs2_1072*, приводит к возникновению ядерно-цитоплазматического конфликта и, как следствие, невозможности получения достаточного количества семян. Отобранные растения *st* скрещивали с линией ВИР320. Если растения-доноры пыльцы несли аллель *Scs2_1072*, то потомки F₁ имели характерный абберрантный фенотип, такие растения не использовали для генетического анализа. Были использованы те растения, которые давали потомство с нормальной зеленой окраской, то есть были гомозиготны по аллелю *Scs2_320*. Таким образом были получены гетерозиготы по маркерам LGIII, *Scs1*, *PhlC*, *AJ832139*, которые одновременно были гомозиготами по аллелю *scs2_320* из группы сцепления LGV. Эти растения имели сниженную фертильность пыльцы, как и положено гетерозиготам по *Scs1* (Табл. 7), тогда как хлорофилльная пигментация была

достаточно интенсивной, хотя и более слабой, чем у рецiproчных гибридов. Пыльцой описанных гетерозиготных растений опыляли тестерную линию *st320* (Рис. 16).

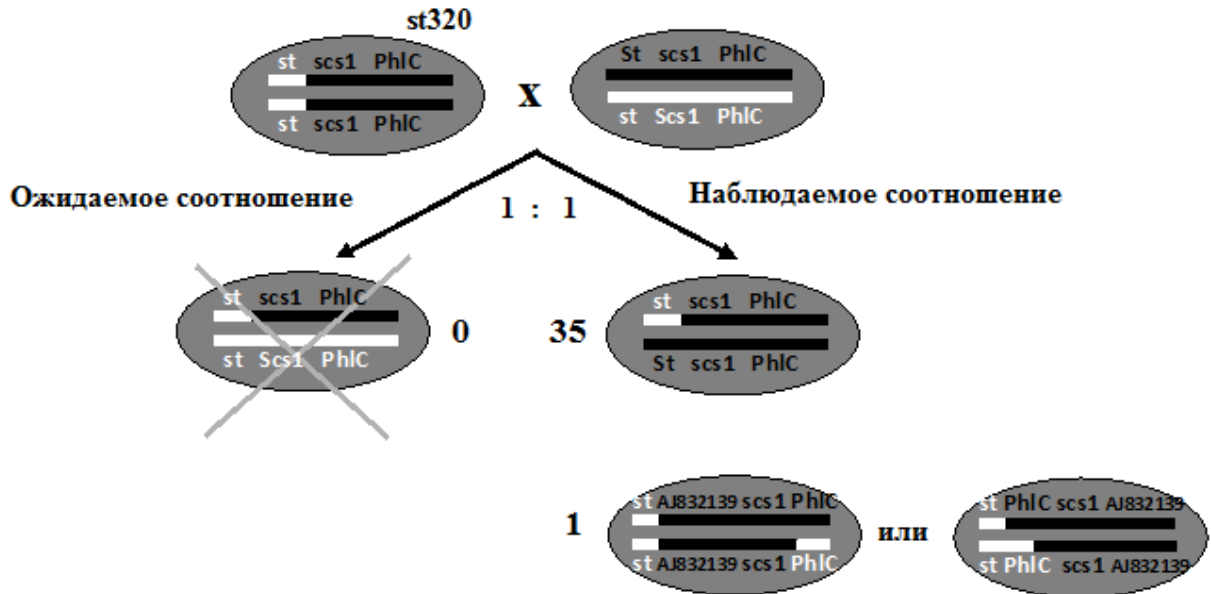


Рис. 16. Схема анализирующего скрещивания для оценки жизнеспособности мужских гаметофитов, несущих аллель *Scs1* культурного гороха на фоне цитоплазмы дикорастущего гороха. Маркеры, обозначенные черным цветом, происходят от дикорастущего гороха ВИР320, обозначенные белым цветом – от культурного гороха WL1072. Перекрещенные линии символизируют гибель мужских гаметофитов.

Если все мужские гаметофиты жизнеспособны, ожидаемое расщепление в анализирующем скрещивании составит 1 *St* : 1 *st*. Из 36 полученных растений 35 имели нормальные прилистники, и одно растение имело редуцированные прилистники. Высокий показатель фертильности пыльцы у этого растения (>90%) свидетельствовал о том, что оно, вероятно, было гомозиготой по аллелю *scs1_320*. Маркеры группы сцепления LGIII расположены на генетической карте в следующем порядке: *st* – *AJ832139* – *PhlC* (Bogdanova, Yadrikhinskiy, 2010), *Scs1* располагается между *AJ832139* и *PhlC* (см. ниже раздел "Картирование локуса *Scs1*", Рис. 23). CAPS-анализ

молекулярных маркеров показал, что указанное растение с редуцированными прилистниками было гетерозиготно по *PhlC* и гомозиготно по аллелю *AJ832139_320*, то есть возникло за счет вклада кроссоверного гаметофита с генотипом *st_1072 AJ832139_320 PhlC_1072* (Рис. 16). Данные по генетическому расщеплению в F_2 от скрещивания, в котором картировали указанные маркеры LGIII (Bogdanova, Yadrikhinskiy, 2010), недостаточно однозначны, поскольку не могут быть интерпретированы без допущения наличия двойных кроссоверов. Поэтому порядок маркеров LGIII может быть реконструирован, хотя и с меньшей вероятностью, как *st – PhlC – AJ832139*. Положение *Scs1* между *AJ832139* и *PhlC* при этом остается неизменным, так как определялось в независимом скрещивании. В этом случае генотип гаметофита, принявшего участие в формировании растения *st*, может быть записан как *st_1072 PhlC_1072 AJ832139_320* (Рис. 16). Каков бы ни был порядок маркеров на генетической карте, не было зарегистрировано ни одного растения, которое возникло бы за счет вклада гаметофита, несущего аллели культурного гороха одновременно обоих окаймляющих маркеров, *PhlC* и *AJ832139*. На основании полученных данных был сделан вывод, что аллель *Scs1* культурного гороха является леталью для мужских гаметофитов на фоне цитоплазмы дикорастущего гороха *P. s. elatius* линии ВИР320.

4.6. Влияние аллельного состояния *Scs1* на жизнеспособность спорофитов.

Для определения того, является ли аллель *Scs1* культурного гороха спорофитной леталью, было проведено два анализирующих скрещивания, сходных со скрещиванием, использованным для определения жизнеспособности гаметофитов. Сначала, как описано выше, были получены гетерозиготы для использования в последующем скрещивании (Рис. 15, шаг 3), путем опыления линии ВИР320 как донора цитоплазмы пыльцой растений F_2 с редуцированными прилистниками от скрещивания $WL1072 \times$ ВИР320 (*st_1072/st_1072*) гомозиготными по аллелю *scs2_320* (Рис. 15, шаг 4).

Полученные гетерозиготы *St*₃₂₀/*st*₁₀₇₂, *scs1*₃₂₀/*Scs1*₁₀₇₂, *PhlC*₃₂₀/*PhlC*₁₀₇₂ опыляли пыльцой тестерных линий WL1072 и WL851, гомозиготных по аллелю *st*. Если все спорофиты жизнеспособны, ожидаемое расщепление в потомстве от анализирующего скрещивания составит 1 *St* : 1 *st*. Если же гомозиготы *st/st* погибают, все потомки будут иметь нормальные, нередуцированные прилистники (Рис. 17).

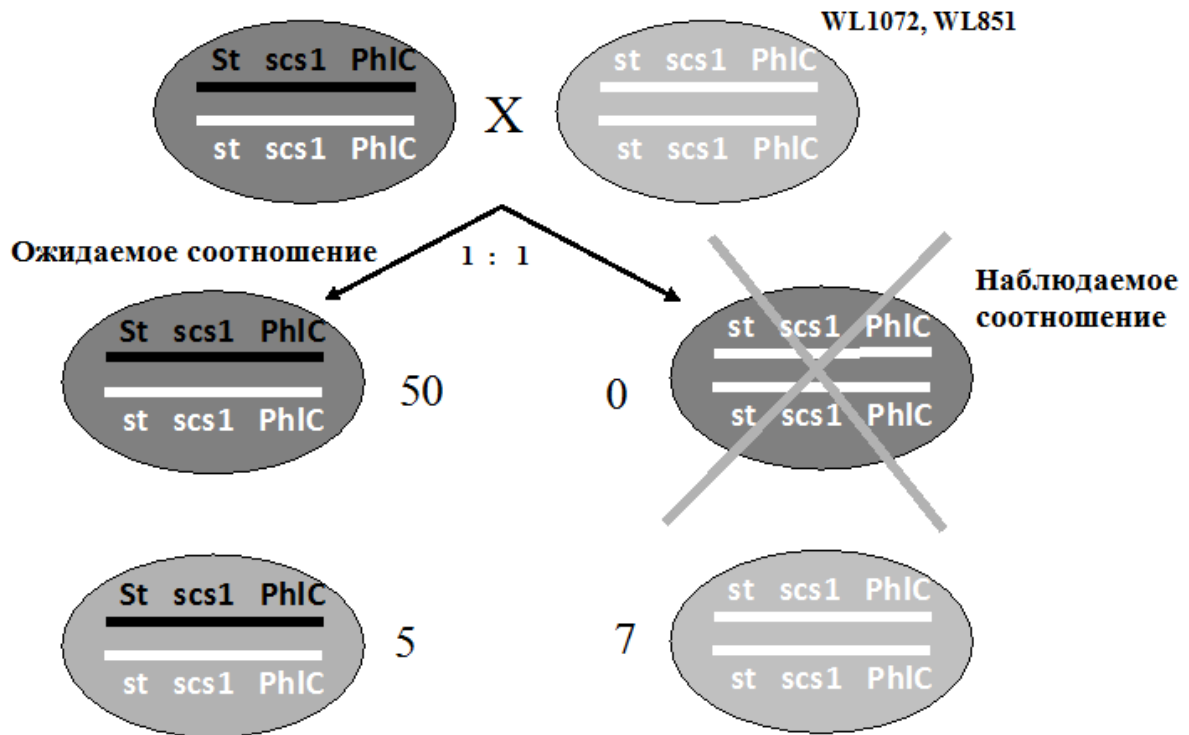


Рис. 17. Схема анализирующего скрещивания для оценки жизнеспособности спорофитов, гомозиготных по аллелю *Scs1* культурного гороха на фоне цитоплазмы дикорастущего гороха. Светло-серым цветом показана цитоплазма, происходящая от культурного гороха, темно-серым цветом – от дикорастущего гороха. Маркеры, обозначенные черным цветом, происходят от дикорастущего гороха ВИР320, обозначенные белым цветом – от культурного гороха WL1072 или WL851. Перекрещенные линии символизируют гибель спорофитов.

Из 62 полученных растений 50 имели нормальные прилистники (*St*), у них наблюдалась явно выраженная хлорофилльная недостаточность и

редукция листовых органов, то есть проявления ядерно-цитоплазматического конфликта. В данном случае конфликт возникает из-за того, что потомки от указанного скрещивания оказываются гетерозиготны одновременно по *Scs1* и *Scs2*, получая аллели, несовместимые с цитоплазмой ВИР320 от тестерных линий WL1072, WL851. Остальные 12 растений (5 St и 7 st) имели ярко-зеленую окраску. CAPS-анализ гена *rbcL* показал, что у них всех присутствовала отцовская пластидная ДНК, по всей вероятности, за счет неканонического двуродительского наследования, описанного выше. Расщепление 5 : 7 хорошо соответствует ожидаемому соотношению 1:1 для фенотипических классов St : st. Происхождение цитоплазмы упомянутых 50 растений не проверяли, считая его материнским ввиду наличия явных признаков ядерно-цитоплазматического конфликта. На основании полученных данных был сделан вывод, что аллель *Scs1* от культурного гороха связан со спорофитной летальностью на фоне цитоплазмы от дикорастущего гороха линии ВИР320. При этом рецессивный летальный эффект локуса *Scs1* наблюдается в отсутствие расщепления по локусу *Scs2* при его гомозиготности по аллелю, совместимому с цитоплазмой.

4.7. Влияние аллельного состояния *Scs2* на жизнеспособность мужских гаметофитов.

Для определения того, является ли аллель *Scs2* культурного гороха летальной для мужских гаметофитов, было изучено наследование тесно сцепленного видимого маркера *gp* (желтый цвет бобов) в анализирующем скрещивании. Тестерная линия была получена как потомство одного растения F₃ от скрещивания ВИР320 × РИЛ-37. Эта линия была гомозиготна по аллелям *gp_1238 scs2_320*, *scs1_320*, а также несла видимый рецессивный маркер *k* (редуцированные крылья цветка) для контроля за возможным самоопылением. Цветки тестерной линии опыляли пыльцой растений F₁, гетерозиготных по генам *gp* и *Scs2* (*Gp_320/gp_1238*, *scs2_320/Scs2_1238*), полученных в результате скрещивания ВИР320 × РИЛ-65 (Рис. 18).

Поскольку линия РИЛ-65 гомозиготна по аллелю *scs1_320*, в потомстве от проведенных скрещиваний расщепления по локусу *scs1* не происходило.

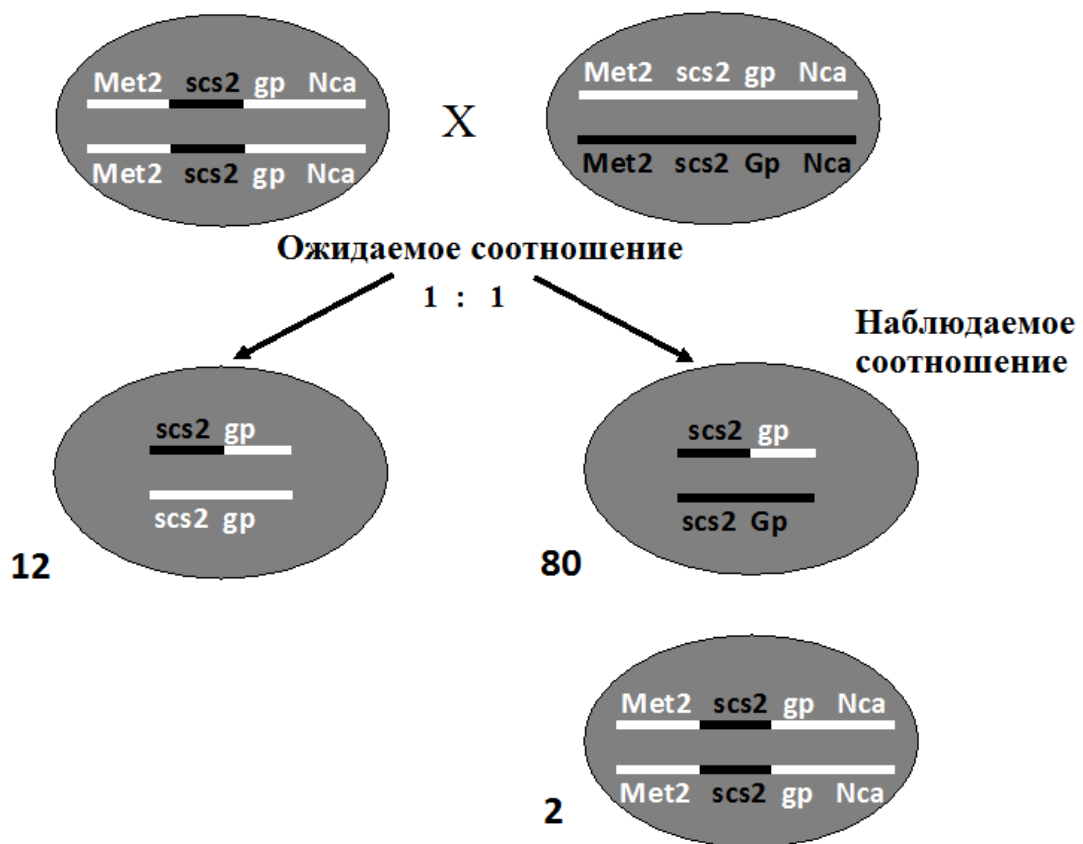


Рис. 18. Схема анализирующего скрещивания для оценки жизнеспособности мужских гаметов, несущих аллель *Scs2* культурного гороха на фоне цитоплазмы дикорастущего гороха. Маркеры, обозначенные черным цветом, происходят от дикорастущего гороха ВИР320, обозначенные белым цветом – от культурного гороха.

У линии-тестера и гетерозиготных растений, использованных для анализирующего скрещивания, цитоплазма происходила от дикорастущего гороха ВИР320, что было подтверждено CAPS-анализом гена *rbcL*. Свидетельством жизнеспособности мужских гаметов, несущих аллель *Scs2_1238*, является появление в потомстве от анализирующего скрещивания растений с желтыми бобами (*gp*), возникших за счет вклада гаметов *gp_1238 Scs2_1238*. Из 94 полученных растений 14 были гомозиготами по *gp*.

Аллельное состояние локуса *scs2* у этих растений определяли путем подсчета фертильности пыльцы. 12 растений из 14 имели фертильность пыльцы около 0,7, что характерно для гетерозигот *scs2_320/Scs2_1238* (Табл. 6), и 2 растения имели полностью фертильную пыльцу, то есть согласно принятым критериям, они были гомозиготами по аллелю *scs2_320*. Вероятно, они возникли за счет вклада гамет, в которых произошел кроссинговер между *gp* и *scs2*. Также не исключено, что гетерозиготы *scs2* имеют фертильную пыльцу за счет расщепления по каким-то другим генетическим факторам. Для уточнения того, на каком участке произошел кроссинговер, у этих двух растений было проанализировано аллельное состояние окаймляющих маркеров *Met2* и *Nca* (в соответствии с генетической картой, описанной ниже в разделе "Картирование локуса *Scs2*", Рис. 25). CAPS-анализ маркеров *Met2* и *Nca* показал, что указанные растения, по всей видимости, произошли от вклада кроссоверных гаметофитов с генотипом *Met2_1238 scs2_320 Nca_1238* (Рис. 18). Полученные данные свидетельствуют о том, что мужские гаметофиты, несущие аллель *Scs2_1238* культурного гороха на фоне цитоплазмы дикорастущего гороха линии ВИР320, являются жизнеспособными. При этом доля гаметофитов, несущих данный аллель, вместо ожидаемой 1/2 составляет 12/94, то есть приблизительно 1/8, но также похоже на 1/9 ($\chi^2 = 0,26$, $0,5 < p < 0,7$). Такая доля может возникнуть, если выживает 1/8 носителей аллеля *Scs2_1238*, что составляет 1/16 от всех гаметофитов, и 7/16 гибнут, и таким образом из ожидаемых 16 генотипических классов остаются лишь 9. Такая ситуация возможна в случае, если гаметофиты-носители аллеля *Scs2_1238* выживают лишь в присутствии определенного аллеля в нескольких несцепленных локусах одновременно, и *Scs2* является одним из них.

4.8. Влияние аллельного состояния *Scs2* на жизнеспособность спорофитов.

Для того, чтобы определить, связан ли локус *Scs2* со спорофитной летальностью, было проведено анализирующее скрещивание, в котором гетерозиготы по *Scs2* скрещивали с гомозиготной тестерной линией, несущей аллель *Scs2_1238*. Сначала были получены гетерозиготы по *Scs2*. Для этого в потомстве F₂ от описанного выше анализирующего скрещивания, в котором оценивали жизнеспособность мужских гаметофитов (Рис. 18), [F₃(ВИР320 x РИЛ-37) x F₁(ВИР320 x РИЛ-65)], были отобраны растения Gr, и был проведен CAPS-анализ, чтобы удостовериться, что эти растения несли маркеры LGV, происходящие от ВИР320. Из этих растений были выбраны те, которые несли в гомозиготе рецессивный видимый маркер *k* (редуцированные крылья цветка) (Рис. 19) для контроля за возможным самоопылением.

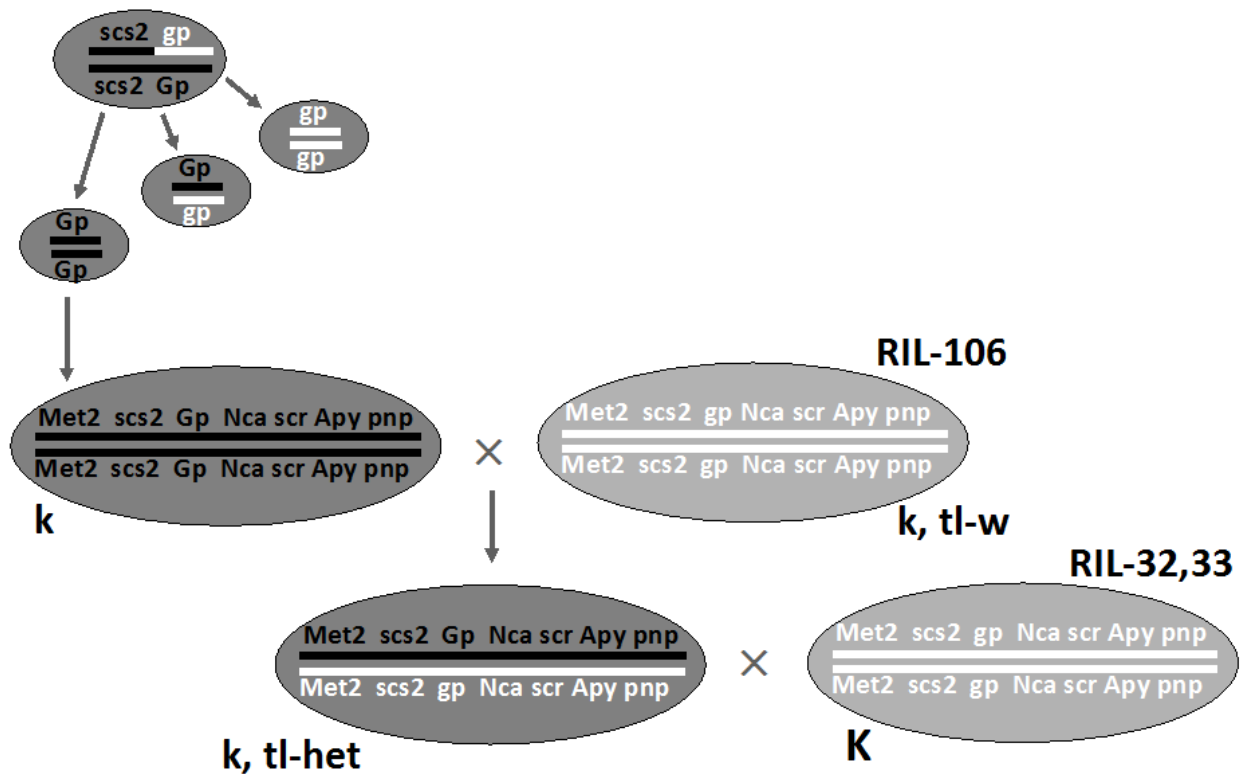


Рис. 19. Схема скрещиваний для оценки жизнеспособности спорофитов, гомозиготных по аллелю *Scs2* культурного гороха на фоне цитоплазмы дикорастущего гороха. Происхождение цитоплазмы от дикорастущего гороха показано темно-серым цветом, от культурного гороха – светло-серым; маркеры, обозначенные черным цветом, происходят от дикорастущего гороха ВИР320, обозначенные белым цветом – от культурного гороха WL1238. “*het*” указывает на гетерозиготное состояние маркера.

Затем, чтобы получить гетерозиготы по маркерам LGV, включая *Scs2*, отобранные растения скрещивали в качестве донора цитоплазмы с растениями линии РИЛ-106, несущей маркеры LGV, происходящие от WL1238: *Met2*, *gp*, *Scs2*, *Nca*, *scr*, *Apy*, и *pnp*, также эта линия имела видимые маркеры *k* и *tl-w* (листочки вместо усиков). Полученные потомки имели плоские усики, то есть были гетерозиготны по гену *tl*, что позволяет удостовериться в том, что скрещивание действительно имело место, также у них были цветки с редуцированными крыльями (*k*), как и у обоих родителей

(Рис. 19). Все использованные линии были гомозиготны по аллелю *scs1_320* (Табл. 2). У полученных гетерозиготных растений проверяли CAPS-анализом аллельное состояние гена *rbcL*, чтобы удостовериться в происхождении цитоплазмы от дикорастущего гороха. РИЛ-32 и 33 использовали в качестве тестерных линий, гомозиготных по маркерам LGV, происходящим от WL1238, и *scs1* от ВИР320 (Рис. 19). В случае, если *Scs2* связан со спорофитной летальностью, в потомстве от анализирующего скрещивания будет отсутствовать класс гомозигот по сцепленным маркерам LGV, в том числе *gr*. Если спорофиты, гомозиготные по *Scs2_1238*, жизнеспособны, то ожидается расщепление по маркерам LGV в соотношении 1:1. В проведенном анализирующем скрещивании было получено 82 растения, 45 из них были Gr и 37 были gr, что хорошо соответствует 1:1. На основании полученных данных был сделан вывод, что гомозиготы по аллелю *Scs2_1238* на фоне цитоплазмы дикорастущего гороха жизнеспособны. Их фенотип оказался весьма схож с фенотипом растений с выраженным конфликтом ядра и пластид, как было описано в главе, посвященной фенотипическим проявлениям ядерно-цитоплазматической несовместимости. Они имели редуцированные листовые органы, слабую хлорофилльную пигментацию (Рис. 20); фертильность пыльцы этих растений составляла приблизительно 20-30%.



Рис. 20. Фенотип растения, гомозиготного по аллелю *Scs2* от WL1238 на фоне цитоплазмы от дикого гороха ВИР320 (белые стрелки); листья на переднем плане принадлежат соседним нормальным растениям (черные стрелки).

4.9. Картирование локуса *Scs1*.

Для картирования локуса *Scs1* была применена следующая схема. Растения линии ВИР320 опыляли пыльцой растений линий РИЛ-52 и РИЛ-46, гомозиготных по аллелям *Scs1_1238* и *scs2_320*. Потомки F₁ от такого скрещивания имели цитоплазму от дикорастущего гороха и были гетерозиготны по гену *Scs1* (Рис. 21), так что фертильность их пыльцы составляла около 50% (Табл. 7). В потомстве F₂, полученном от самоопыления таких гетерозигот, наблюдалось расщепление по маркерам *PhlC*, *AJ832139* и *Scs1*. Аллельное состояние молекулярных маркеров определяли CAPS-анализом и аллельное состояние *scs1* определяли подсчетом фертильности пыльцы (Рис. 21).

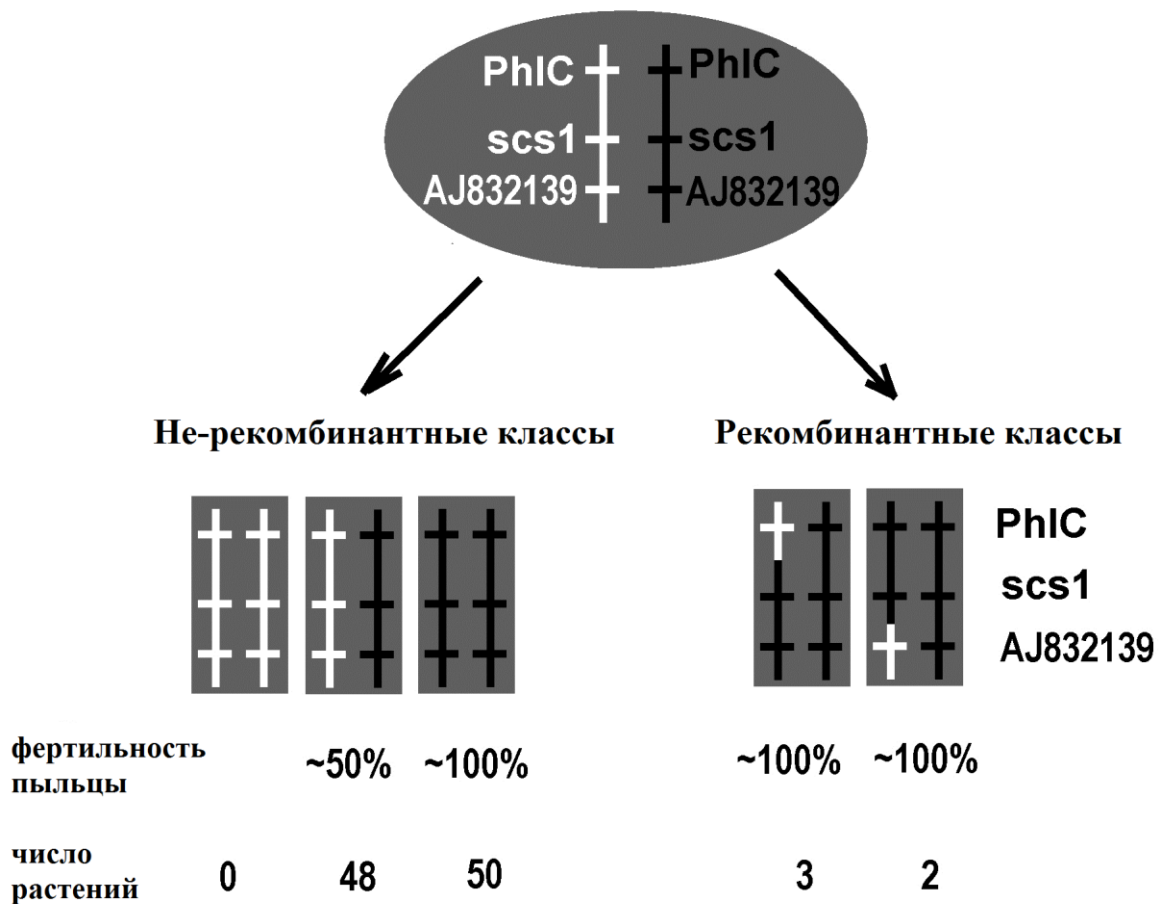


Рис. 21. Схема картирования локуса *Scs1* по отношению к маркерам LGIII. Маркеры, обозначенные черным цветом, происходят от дикорастущего гороха ВИР320, обозначенные белым цветом – от культурного гороха WL1238.

Соотношение генотипических классов среди изученных 123 растений F_2 существенно отличалось от менделевского 1:2:1 в силу гибели гаметофитов, несущих аллель *Scs1*₁₂₃₈. За счет этого наблюдалось расщепление по типу анализирующего скрещивания и соотношение генотипических классов было близким к 1:1. Распределение по фертильности пыльцы у растений F_2 было бимодальным, значения фертильности пыльцы распределились следующим образом (в нижеследующих интервалах левая граница включена, правая исключена):

0,35 – 0,40, 2 растения

0,40 – 0,45, 3 растения

0,45 – 0,50, 21 растение
 0,50 – 0,55, 22 растения
 0,55 – 0,60, 6 растений
 0,60 – 0,65, 2 растения
 0,65 – 0,70, 2 растения
 0,70 – 0,75, 1 растение
 0,75 – 0,80, 3 растения
 0,80 – 0,85, 2 растения
 0,85 – 0,90, 4 растения
 0,90 – 0,95, 17 растений
 0,95 – 1,00, 38 растений

Данное распределение изображено на Рис. 22. Растения с фертильностью пыльцы 0,55-0,70 было затруднительно классифицировать как полустерильные или фертильные, но поскольку приведенное распределение обладает явно выраженной бимодальностью, то относительно малочисленные классы были исключены из рассмотрения; растения с фертильностью пыльцы менее 0,55 считали полустерильными и растения с фертильностью пыльцы более (или равной) 0,90 считали фертильными, всего 103 растения. Полустерильными оказалось 48 растений, они были отнесены к генотипическому классу гетерозигот *Scs1_1238/scs1_320*, и 55 растений оказались фертильными и были отнесены к генотипическому классу гомозигот *scs1_320/scs1_320*. Численность растений в генотипических классах, выделенных с учетом аллельного состояния генов *Scs1*, *PhlC* и *AJ832139*, приведена на Рис.21.

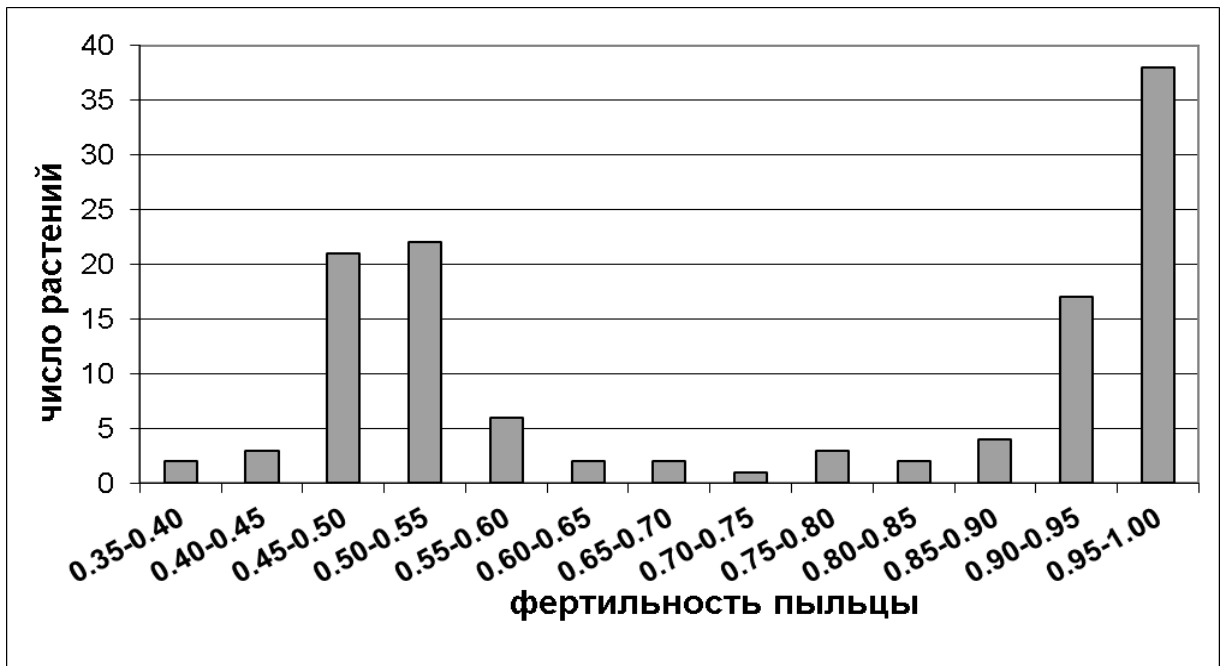


Рис. 22. Распределение значений фертильности пыльцы (левая граница включена, правая – исключена) среди растений F_2 , полученных от скрещиваний ВИР320 x РИЛ-46,52.

Среди 103 информативных растений были обнаружены 5 кроссоверных растений с фертильной пыльцой. Три из них были гетерозиготны по *PhlC* и гомозиготны по *scs1_320 AJ832139_320*, еще два были гомозиготны по *PhlC_320 scs1_320* и гетерозиготны по *AJ832139* (Рис. 21). Генетическая карта участка LGIII, содержащего проанализированные гены, была построена при помощи программы Mapmaker 3.0 (Lander et al. 1987). В соответствии с этой картой локус *Scs1* попадает в довольно узкий интервал размером около 2,5 сМ между маркерами *PhlC* и *AJ832139* (Рис. 23).

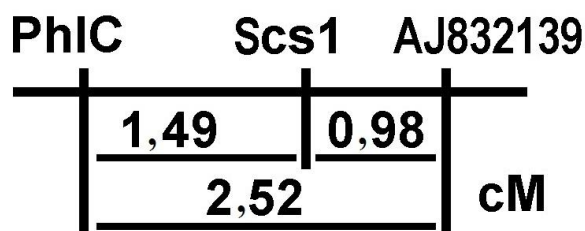


Рис. 23. Генетическая карта фрагмента LGIII, содержащего locus *Scs1*.

4.10. Картирование локуса *Scs2*.

Для картирования локуса *Scs2* было проведено анализирующее скрещивание, в котором гетерозиготы по ряду маркеров группы сцепления LGV, включая *Scs2*, скрещивали с гомозиготной тестерной линией *gp37*. Линия *gp37* несла следующие аллели маркеров LGV (Табл. 7): *Met2_1238*; *gp_1238*; *scs2_320*, *Nca_1238*; *scr_320*; *Apy_320*; *pnp_320*. Растения этой тестерной линии были гомозиготны по аллелю *K* и имели нормальные крылья цветка. Гетерозиготы для скрещивания, маркированные видимым рецессивным маркером для контроля за возможным самоопылением, получали следующим образом. Сначала отбирали растения, гомозиготные по аллелям маркеров LGV, происходящим от ВІР320, как описано в разделе "Влияние аллельного состояния *Scs2* на жизнеспособность спорофитов" (Рис. 19), при этом обращая внимание на то, чтобы эти растения имели редуцированные крылья цветка, то есть несли рецессивный аллель *k* в гомозиготе. Эти растения опыляли пыльцой растений линии РІІ-78, у которой маркеры LGV *Met2*, *gp*, *Scs2*, *Nca*, *scr*, *Apy*, *pnp* происходили от WL1238, и которая несла видимые маркеры *k* и *tl-w* в гомозиготе (Рис. 24). В результате такого скрещивания были получены растения, гетерозиготные по маркерам LGV, а также имеющие редуцированные крылья цветка (*k*). Также эти растения обладали плоскими усиками (гетерозиготы по *tl*), что подтверждало их происхождение в результате скрещивания, а не самоопыления. У всех гибридов проверяли аллельное состояние маркера *rbcL*, чтобы удостовериться в материнском происхождении пластид.

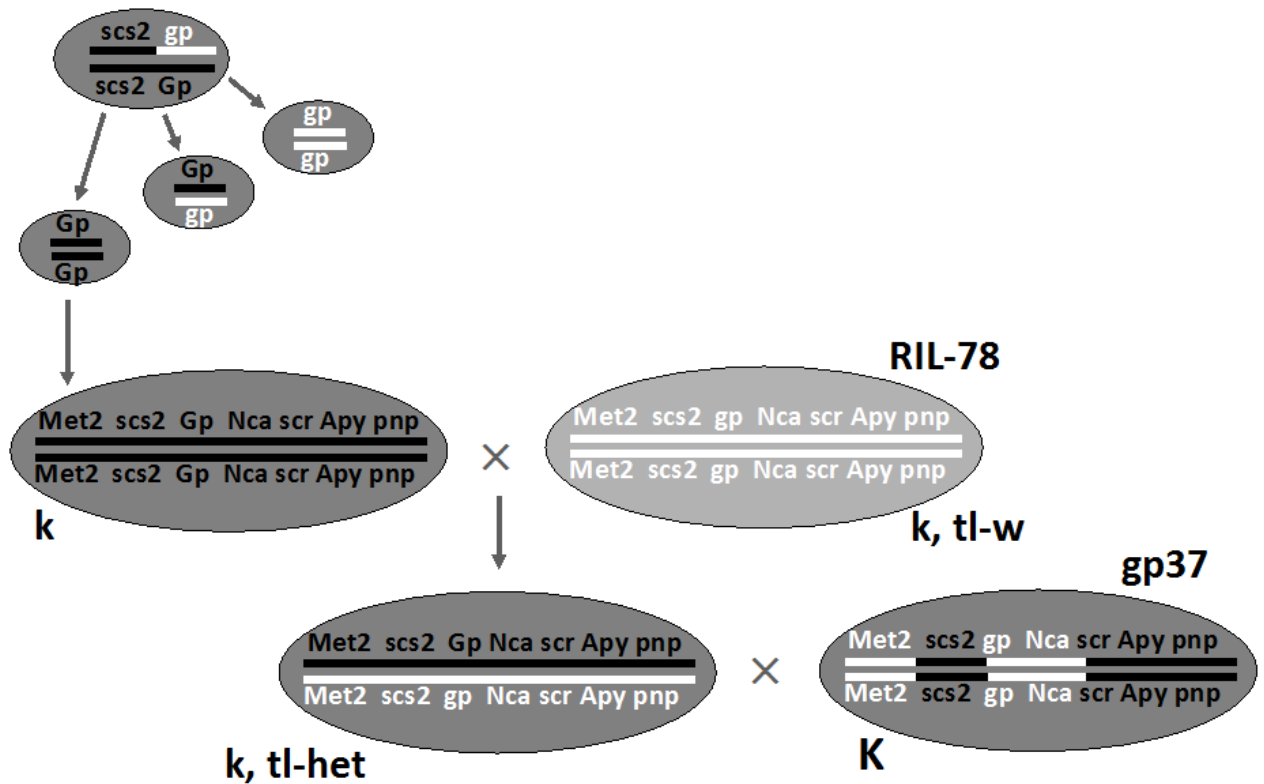


Рис. 24. Схема анализирующего скрещивания для оценки генетических дистанций на участке LGV, включающем локус *Scs2*.

Происхождение цитоплазмы от дикорастущего гороха показано темно-серым цветом, от культурного гороха – светло-серым; маркеры, обозначенные черным цветом, происходят от дикорастущего гороха ВИР320, обозначенные белым цветом – от культурного гороха WL1238. “*het*” указывает на гетерозиготное состояние маркера.

Затем было проделано анализирующее скрещивание (Рис. 24), в результате которого было получено 102 потомка. У этих растений определяли аллельное состояние молекулярных маркеров при помощи CAPS-анализа, аллельное состояние *gp* определяли по цвету бобов, аллельное состояние *Scs2* определяли путем подсчета фертильности пыльцы. Растения с фертильностью пыльцы 60-80% считали гетерозиготами по *Scs2* и растения с фертильностью пыльцы 90-100% считали гомозиготами по *scs2_320*. На

основании полученных данных была построена генетическая карта участка LGV, содержащего изученные маркеры, с использованием компьютерной программы Mapmaker 3.0. Данная карта приведена на Рис. 25, А. Следует отметить, что в данном эксперименте не было зарегистрировано кроссоверов между локусами *gp* и *Scs2*.

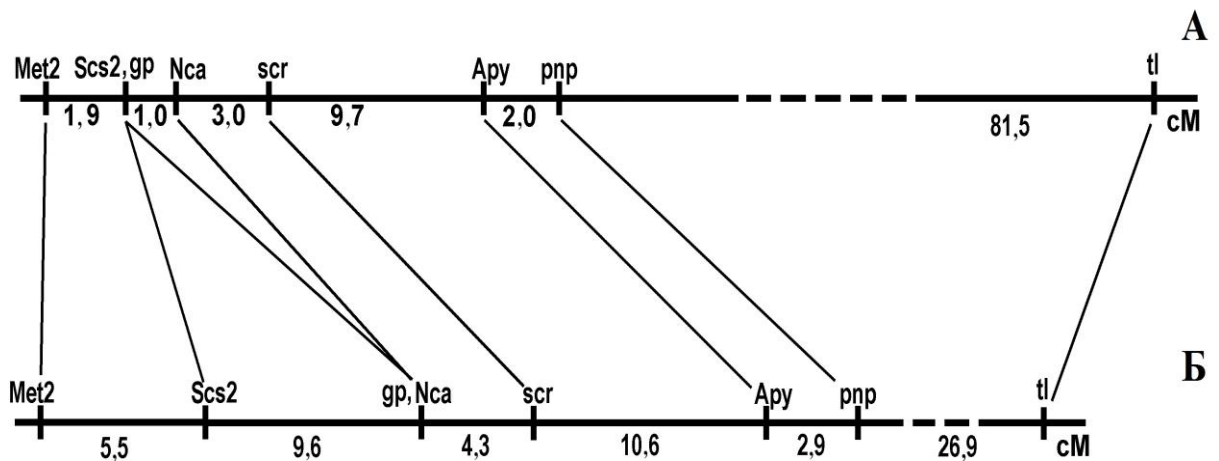


Рис. 25. Генетическая карта сегмента LGV, включающего локус *Scs2*, построенная при помощи программы Mapmaker 3.0, по данным двух экспериментов. А, карта, полученная в эксперименте по картированию *Scs2*; Б, карта, полученная в эксперименте по изучению жизнеспособности спорофитов, гомозиготных по *Scs2_1238*.

Описанный выше эксперимент по определению жизнеспособности спорофитов, гомозиготных по *Scs2_1238*, проводился с использованием анализирующего скрещивания, и данные полученные в результате этого скрещивания можно использовать для построения генетической карты отрезка LGV, содержащего локус *Scs2*. В упомянутом скрещивании наблюдалось расщепление генотипических/фенотипических классов по локусу *Scs2*, включающих гомозиготы по *Scs2_1238* с явно выраженными признаками ядерно-цитоплазматического конфликта (Рис. 20) и нормально выглядящие гетерозиготы, имеющие фертильность пыльцы 0,6-0,8.

Аллельное состояние *gp* определяли по цвету бобов и аллельное состояние молекулярных маркеров *Met2*, *Nca*, *scr*, *Apy*, *pnp* определяли CAPS-анализом. Одно растение *gp* и одно растение *Gp* выглядели более мощными и более высокими по сравнению с остальной популяцией и имели фертильную пыльцу (>90%). Анализ маркера *rbcL* показал, что эти два растения унаследовали пластиды от обоих родителей, поэтому они были исключены из анализа. Генетическая карта участка LGV, содержащего проанализированные маркеры, построенная при помощи компьютерной программы Mapmaker 3.0, приведена на Рис. 25, Б. В отличие от рассмотренного выше картирующего эксперимента, в потомстве от данного анализирующего скрещивания было обнаружено 7 кроссоверов между *Scs2* и *gp*, при этом все они несли комбинацию аллелей *Scs2_1238 Gp_320*, тогда как реципрокная комбинация *scs2_320 gp_1238* не была зарегистрирована. Две полученные карты, представленные на Рис. 25, существенно различаются. На карте, полученной в результате первого эксперимента (Рис. 25, А), участок, прилегающий к локусу *Scs2*, от *Met2* до *Nca* сильно сокращен, тогда как более дистальный сегмент *pnp-tl* растянут и составляет 81,5 сМ по данным программы Mapmaker 3.0, эта величина составляет 54,4 сМ при расчете по формуле Косамби (Kosambi, 1944).

Причины такой вариабельности неясны. Можно предположить, что между хромосомами дикорастущего и культурного гороха понижена гомология из-за структурных отличий, как, например, наблюдали Hall et al (1997). Линии, использованные для генетического анализа в настоящей работе, несут фрагменты хромосом ВР320 и WL1238 в разных сочетаниях, что могло стать причиной разного уровня гомологии и, как следствие, различий в частотах рекомбинации. Еще один непонятный феномен, наблюдаемый в экспериментах по картированию, состоит в том, что все 7 кроссоверов между *gp* и *Scs2* в опыте по определению жизнеспособности спорофитов, гомозиготных по *Scs2_1238* (Рис. 19), были одного и того же типа и несли сочетание аллелей *Scs2_1238 – Gp_320*, тогда как реципрокные

кроссоверы не наблюдались ($\chi^2=7,0$, $p<0,01$). Возможно, носители рецессивной комбинации *scs2_320 – gp_1238* жизнеспособны на фоне цитоплазмы ВИР320 только в том случае, если какой-то ген (или гены), расположенный (расположенные) по другую сторону от *scs2*, также происходит (происходят) от WL1238. Это подтверждается некоторыми наблюдениями кроссоверов в районе, прилежащем к *scs2*. Указанная комбинация аллелей *scs2_320 – gp_1238* наблюдалась только в составе двойных кроссоверов, а именно, в эксперименте по определению жизнеспособности мужских гаметофитов, несущих *Scs2_1238*, в виде двух растений, гомозиготных по *Met2_1238 scs2_320 gp_1238* (Рис. 18), и в тестерной линии *gp37*, у которой зафиксировалась комбинация аллелей *Met2_1238 scs2_320 gp_1238*, унаследованная от РИЛ-37 (Табл. 2, Рис. 19). Похожая тенденция к повышенной частоте двойных кроссоверов наблюдалась вблизи локуса *scs* у пшеницы (Simons et al. 2003).

4.11. Существование генов, взаимодействующих с *Scs2*.

В первоначальных экспериментах по изучению особенностей наследования генов *Scs1* и *Scs2* было зарегистрировано отсутствие гомозигот по маркерам, сцепленным с локусами ядерно-цитоплазматической несовместимости: *PhlC* (LGIII), сцепленному с *Scs1*, и *gp* (LGV), сцепленному с *Scs2*. Это послужило основанием для предположения о том, что оба гена, *Scs1* и *Scs2*, являются спорофитными и/или гаметофитными летелями. В ходе дальнейших экспериментов выяснилось, что один из этих генов, *Scs1*, действительно связан с летальностью мужских гаметофитов, несущих аллель культурного гороха, и спорофитов, гомозиготных по этому аллелю, при условии наследования цитоплазмы от дикорастущего гороха ВИР320. Фертильность пыльцы гетерозигот *Scs1_1238/scs1_320* составляет около 50% (Табл. 7), что хорошо соответствует предположению о гибели гаметофитов, несущих аллель *Scs1_1238*.

Однако, что касается второго гена, *Scs2*, достаточно неожиданным оказалось, что носители аллеля *Scs2_1238* жизнеспособны, как в виде спорофитов, так и мужских гаметофитов. Для объяснения различий в результатах расщеплений, полученных в разных экспериментах, было выдвинуто предположение, что жизнеспособность носителей *Scs2_1238* зависит от присутствия аллелей, происходящих от ВИР320, в одном или более несцепленных локусах. Действительно, частота появления гомозигот по аллелю *Scs2_1238*, определяемая по характерному фенотипу ядерно-цитоплазматической несовместимости (Рис. 20) (как правило, в сочетании с фенотипом *gr*, в расщеплениях F_2 от скрещивания разных РИЛ с линией ВИР320) не может быть объяснена моногенным расщеплением. Число растений, гомозиготных по *Scs2_1238*, наблюдаемое в разных скрещиваниях, приведено в Табл. 8. Как видно из Табл. 8, доля рассматриваемого класса гомозигот варьирует от скрещивания к скрещиванию, но в большинстве случаев отличается от $1/4$, что является свидетельством совместного действия двух или более несцепленных генов. Вероятно, число взаимодействующих генов составляет больше двух.

Таблица 8. Число растений, гомозиготных по аллелю *Scs2_1238*, в расщеплениях F₂ от скрещивания ВИР320 с различными линиями из картирующей популяции РИЛ.

| Линия РИЛ | Число растений Gr | Число растений gr | χ^2 (3:1) | p(3:1) | χ^2 (15:1) | p(15:1) |
|--------------------------|-------------------|-------------------|----------------|------------------|-----------------|--------------|
| РИЛ-116 | 55 | 0 | 18,33 | p<0,001*** | 3,67 | 0,05<p<0,1 |
| РИЛ-97 | 22 | 0 | 7,33 | 0,01<p<0,05 * | 1,47 | 0,2<p<0,3 |
| РИЛ-65 (F ₆) | 33 | 5 | 2,84 | 0,05<p<0,1 | 3,09 | 0,05<p<0,1 |
| РИЛ-65 (F ₈) | 70 | 2 ^a | 18,96 | p<0,001*** | 1,48 | 0,2<p<0,3 |
| РИЛ-39 | 45 | 1 | 12,78 | p<0,001*** | 1,30 | 0,2<p<0,3 |
| РИЛ-78 | 65 | 1 | 19,41 | p<0,001*** | 2,52 | 0,1<p<0,2 |
| РИЛ-42 | 43 | 14 | 0,006 | 0,95<p<1 | 32,62 | p<<0,001*** |
| РИЛ-48 | 30 | 4 | 3,18 | 0,05<p<0,1 | 1,76 | 0,1<p<0,2 |
| РИЛ-82 | 105 | 1 | 32,72 | p<<0,001*** | 5,09 | 0,01<p<0,05* |

^a Указано число гомозигот по аллелю *Scs2_1238*, определяемых по характерному фенотипу. Помимо этих двух растений в расщеплении встретились 2 растения gr без признаков ядерно-цитоплазматического конфликта, которые считали кроссоверами между *Scs2* и *gr*.

* 0,01<p<0,05; *** p<0,001.

В F₂ от скрещивания ВИР320 с РИЛ-65 возникло 5 растений с генотипом *gr gr* среди 38 потомков. Соотношение 5/38 статистически не отличается от 1/4 ($\chi^2=2,84$, 0,05<p<0,1), хотя от 1/16 оно тоже не отличается ($\chi^2=3,09$, 0,05<p<0,1) (Табл. 8). Следует отметить, что в аналогичном скрещивании ВИР320 × РИЛ-65, но проведенном на более поздних поколениях инбридинга, доля растений, гомозиготных по *Scs2_1238*, составила 2/72, что отличается от полученного ранее 5/38, но не отличается статистически от 1/16 ($\chi^2=1,48$, 0,2<p<0,3). Последнее выглядит более логичным, поскольку в

эксперименте по определению жизнеспособности гаметофитов доля мужских гаметофитов-носителей *Scs2_1238* составила приблизительно 1/8, а в эксперименте по определению жизнеспособности спорофитов доля женских гаметофитов, несущих этот аллель, составила около 1/2. Принимая во внимание данные частоты гаметофитов, в отсутствие спорофитной летальности доля потомков, гомозиготных по *Scs2_1238*, составит как раз 1/16. В скрещиваниях ВИР320 с линиями РИЛ-39 и РИЛ-78 соотношения фенотипических классов также не противоречат 1/16 (Табл. 8). Это означает, что жизнеспособность носителей *Scs2_1238* зависит от аллельного состояния как минимум одного несцепленного гена, но более вероятно, что в данных скрещиваниях идет расщепление более чем по одному гену, приводя к тому, что некоторые комбинации аллелей являются летальными для мужских гаметофитов. Не исключено также, что некоторая доля спорофитов также погибает, что приводит к снижению частоты класса гомозигот по *Scs2_1238*. В скрещиваниях РИЛ-97 и РИЛ-116 не было получено ни одного растения *gr*, поэтому было выдвинуто предположение, что линии РИЛ-97 и РИЛ-116 несут аллель, происходящий от ВИР320, присутствие которого приводит к гибели мужских гаметофитов, несущих *Scs2_1238*, и/или гомозигот по аллелю *Scs2_1238*. Возможно также, что это лишь случайный эффект, поскольку значения статистических критериев не позволяют отвергнуть гипотезу о выщеплении 1/16 гомозигот по *Scs2_1238* (Табл. 8).

Данные по расщеплению генотипических классов в скрещиваниях ВИР320 с носителями аллеля *Scs2_1238* приводят к выводу о том, что жизнеспособность носителей этого аллеля при условии наследования цитоплазмы от ВИР320 зависит от аллельного состояния других локусов, число которых составляет 2-3, и аллельное состояние этих локусов варьирует от линии к линии.

В заключение следует отметить, что проведенный в настоящей работе генетический анализ локусов ядерно-цитоплазматической несовместимости у гороха сопоставим по своей глубине с аналогичным генетическим анализом,

проведенным у пшеницы. У этого важнейшего и всесторонне исследованного хозяйственного объекта первоначально, на основании генетических расщеплений было выдвинуто предположение о дигенном контроле несовместимости в отдаленных скрещиваниях (Ohtsuka, 1991). Впоследствии были картированы два несцепленных локуса ядерно-цитоплазматической несовместимости, *scs* и *Vi*, с точностью до хромосомного плеча (Anderson, Maan, 1995). Затем ген *scs* был картирован более точно, были определены ближайшие окаймляющие его молекулярные маркеры (Asakura et al., 1997; Simons et al., 2003) на расстоянии 8,2 и 5,8 сМ (Simons et al., 2003). С развитием молекулярно-генетических методов и расшифровкой полных ядерных геномов растений генетический анализ локуса *scs* существенно продвинулся. Ориентировочная длина участка хромосомы 1D, на котором может содержаться *scs*, составила 1,1 Мб. На основании синтении геномов пшеницы, риса, сорго, *Brachypodium* в этом районе предсказаны 16 генов (Michalak de Jimenez et al., 2013). В настоящей же работе были определены интервалы, содержащие два локуса ядерно-цитоплазматической несовместимости у гороха. Длина этих интервалов, оцененная на основании синтении геномов гороха и однолетней люцерны, составила около 1,5 Мб для локуса *Scs1* и около 1,7 Мб для локуса *Scs2*. Таким образом, генетическое картирование локусов ядерно-цитоплазматической несовместимости у гороха, проведенное в настоящем исследовании, оказалась даже более продвинутым, чем у пшеницы.

ГЛАВА 5.

ГЕНЫ-КАНДИДАТЫ НА РОЛЬ УЧАСТНИКОВ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО КОНФЛИКТА У ГОРОХА.

Как описано в предыдущих главах, в ходе настоящей работы было показано, что по меньшей мере два ядерных гена, обозначенные *Scs1* и *Scs2*, участвуют в конфликте ядерного и пластидного геномов при отдаленных скрещиваниях гороха. Гены *Scs1* и *Scs2* были локализованы на генетической карте, и были описаны некоторые особенности наследования их аллелей, происходящих от культурного гороха, на фоне цитоплазмы от дикорастущего гороха линии ВИР320. В то же время об участнике (участниках) конфликта со стороны пластидного генома ничего не было не известно. Поскольку для изучения пластидных участников конфликта классический генетический анализ неприменим, то для этих целей был использован экстенсивный подход, основанный на расшифровке полных пластидных геномов у нескольких контрастных линий гороха, различающихся по совместимости с ядерным геномом культурного гороха. Подобный подход был использован для тех же целей у растений из рода энотера (*Oenothera*), где были полностью просеквенированы 5 пластидных геномов, различных по своей совместимости с разными ядерными геномами (Greiner et al., 2008, a).

Внимание было сосредоточено на поиске пластидных генов, которые взаимодействуют с геном *Scs1*, поскольку действие этого гена более отчетливо выражено. В отличие от *Scs2*, фенотипические проявления *Scs1* в виде летальности носителей аллеля от культурного гороха на фоне цитоплазмы дикорастущего гороха, не зависят от аллельного состояния других ядерных генов.

5.1. Общая характеристика реконструированных пластидных геномов.

С использованием высокопроизводительного секвенирования на платформе IonTorrent были определены нуклеотидные последовательности

пластидных геномов пяти образцов, один из которых представлял линию культурного гороха, WL1238, и четыре образца, ВИР320, L100, Л1794, 721 представляли линии дикорастущего гороха, относящегося к подвиду *Pisum sativum* subsp. *elatius*. При этом пластидные геномы двух диких линий, L100 и ВИР320 несовместимы, а пластидные геномы Л1794 и 721 совместимы с ядерным геном *Scs1* культурной линии WL1238 (Bogdanova et al., 2014).

Реконструированные пластидные геномы представляли собой кольцевые молекулы и имели следующие размеры. WL1238 – 122 180 п.о.; ВИР320 – 121 824 п.о., из которых 258 + 37 п.о. представляли собой 2 нерасшифрованных участка; L100 – 121 799 п.о., из которых 780 п.о. представляли собой 11 нерасшифрованных участков длиной 17, 396, 10, 14, 5, 90, 84, 19, 26, 20, 99 п.о.; 721 – 121 773 п.о., из которых 64 + 30 п.о. представляли 2 нерасшифрованных участка; Л1794 – 121 760 п.о. Все нерасшифрованные участки находились в некодирующих областях, их длина принималась равной длине соответствующего участка пластидного генома WL1238. Длина модельного пластидного генома, использованного в качестве матрицы для сборки, NC_014057 (сорт Feltham First) составляет 122 169 п.о. Таким образом, пластидные геномы дикорастущих линий гороха оказались короче пластидных геномов культурного гороха приблизительно на 400 п.о.

Все реконструированные пластидные геномы имели делецию 54 п.о. и инсерцию 45 п.о. в сравнении с модельным геномом сорта Feltham First (NC_014057) в кодирующей последовательности гена *psaA*.

Пластидный геном линии Л1794 содержал инверсию размером 3442 п.о. с одной точкой разрыва в межгенном промежутке *psaI-accD* и второй точкой разрыва в межгенном промежутке *psbI-trnS*. Эта инверсия была предсказана Palmer et al. (1985) на основании рестриктазного анализа.

Последовательности пластидных геномов, полученные в данном исследовании, были отправлены в Европейскую базу нуклеотидных последовательностей (European Nucleotide Archive, ENA (см. главу Материалы и Методы).

5.2. Поиск пластидных генов-кандидатов, вовлеченных в ядерно-цитоплазматический конфликт.

Последовательность реконструированного пластидного генома WL1238 сравнивали с последовательностями четырех остальных образцов, два из которых имели цитоплазму, несовместимую с ядерным геном *ScsI* линии WL1238, а именно, ВИР320, L100, и два образца, 721, Л1794, имели цитоплазму, совместимую с *ScsI* (Bogdanova et al., 2014). Те особенности первичной структуры, которые отличали несовместимые пластидные геномы L100 и ВИР320 от пластидных геномов трех остальных линий, считали потенциальными кандидатами, ответственными за несовместимость с ядром. Особенности первичной структуры изученных пластидных геномов приведены в Табл. 1 Приложения. Всего было выявлено 355 разных мутационных событий (нуклеотидных замен, инсерций/делеций и точек разрыва при инверсии), из них 30 нуклеотидных замен и 7 инсерций/делеций присутствовали у ВИР320 и L100 и отсутствовали как у 721, так и у Л1794. Они располагались в 14 некодирующих районах (межгенные промежутки и интроны) и 7 белок-кодирующих локусах. Теоретически, любое из этих отличий можно рассматривать в качестве кандидата. Однако в качестве первого приближения было принято, что (1) белок-кодирующие локусы являются более вероятными кандидатами и (2) наиболее вероятной причиной ядерно-цитоплазматической несовместимости является изменение первичной структуры белка. Исходя из этого, были исключены некодирующие районы и 5 синонимических нуклеотидных замен. Оставшиеся 14 несинонимических нуклеотидных замен и 3 инсерции/делеции сузили круг кандидатов до четырех локусов, *accD* с 8 аминокислотными заменами и 3 инсерциями/делециями, *rpoB* с 1 аминокислотной заменой, *ycf1* с 3 аминокислотными заменами и *ycf2* с 2 аминокислотными заменами в теоретических белковых продуктах указанных генов.

5.3. Поиск ядерных генов, функционально связанных с пластидными генами-кандидатами.

Возникновение ядерно-цитоплазматического конфликта весьма вероятно, если полипептиды, которые участвуют в работе мультимерных комплексов и при этом кодируются в ядре и пластидах, окажутся плохо подходящими друг к другу (Burton et al., 2013). В таком случае наиболее вероятный пластидный ген-кандидат будет иметь ядерный ген-партнер, расположенный на генетической карте в районе, где локализован ген несовместимости с пластидами, *Scs1*. Продукт гена *accD*, бета субъединица карбоксилтрансферазы, работает в комплексе с альфа субъединицей карбоксилтрансферазы, белком-переносчиком биотина и карбоксила, биотин карбоксилазой, составляя пластидную гетеромерную форму ацетил-КоА карбоксилазы (Sasaki, Nagano, 2004). Предполагаемыми партнерами гена *proB*, кодирующего бета субъединицу РНК-полимеразы, кодируемой пластидами (PEP, от англ. plastid-encoded RNA polymerase), являются кодируемые в ядре сигма факторы и ряд других белков, в том числе эндорибонуклеаза CSP41, Fe-зависимая супероксиддисмутаза 3, ассоциированная с РНК-полимеразой пластидная протеинкиназа РТК (обзор Schweer, 2010). Продукт гена *ycf1* (также обозначаемый Tic214 у арабидопсиса) участвует в транспорте пептидов через внутреннюю мембрану хлоропласта и образует комплексы с Tic100, Tic56, и Tic20-I (Kikuchi et al., 2013). *ycf2* является жизненно-важным геном с неизвестной функцией (Drescher et al., 2000), и его ядерные партнеры неизвестны.

Ядерный геном гороха (*Pisum sativum*) пока еще не просеквенирован, поэтому анализ проводился исходя из синтении, существующей между геномами бобовых растений (Kalo et al., 2004). Были проанализированы известные нуклеотидные последовательности модельного объекта, однолетней люцерны, *Medicago truncatula*. В части генома *M. truncatula*, гомологичной участку генома гороха, в котором локализован ген *Scs1*, среди

аннотированных последовательностей осуществлялся поиск таких генов, которые кодируют белки, участвующие в работе упомянутых выше мультимерных комплексов. Ген *Scs1* гороха локализован на генетической карте LGIII в интервале размером около 2,5 сМ между локусами, кодирующими фосфолипазу С и белок семейства GRAS (Рис. 23, 26, А). Гомологи данных окаймляющих маркеров у *M. truncatula* присутствуют в базе данных NCBI Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) под номерами GeneID:11411269 (Phosphoinositide phospholipase C) и GeneID:11406790 (Nodulation-signaling pathway 2 protein), они ограничивают отрезок ДНК между позициями 22 386 715 и 23 539 540 последовательности NC_016409.1 (*Medicago truncatula* chromosome 3), или 1 146 982 п.о., из которых 150 000 п.о. относятся к нерасшифрованному фрагменту неизвестной длины (Рис. 26, Б). На этом участке содержится 166 аннотированных генов, из которых 70 кодируют "гипотетические белки". Среди оставшихся генных продуктов обнаружился "белок-носитель биотина и карбоксила ацетил-коА карбоксилазы" ("Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase", GeneID:11410363), который прямо указывает на *accD* как ген с комплиментарной функцией. Позиция гена GeneID:11410363 на физической карте хромосомы 3 *M. truncatula* хорошо соответствует позиции гена *Scs1* на генетической карте гороха (Рис. 26). Таким образом, наиболее вероятным кандидатом на роль участника ядерно-цитоплазматического конфликта становится пластидный ген *accD*, и впервые в мировой практике номинируется кандидат на роль ядерного участника конфликта. При этом предполагается идентичность ядерного гена-кандидата с ранее генетически изученным *Scs1*. Данный ген был обозначен как *Vccp3* (по номеру хромосомы *M. truncatula*).

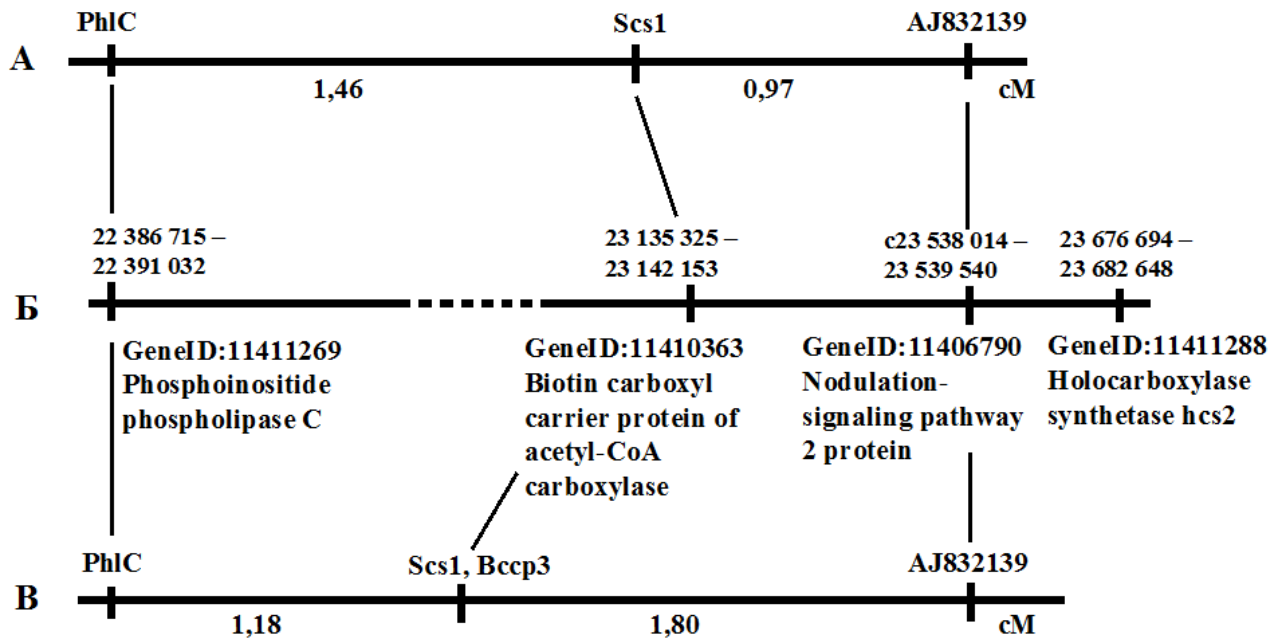


Рис. 26. Сравнение генетической карты фрагмента LGIII гороха и физической карты хромосомы 3 *M. truncatula* (NC_016409). А, генетическая карта, построенная по результатам скрещивания на фоне цитоплазмы от ВИР320 (Рис. 23). Б, физическая карта хромосомы 3 *M. truncatula*. Пунктирная линия обозначает нерасшифрованный участок неизвестной длины. В, генетическая карта, построенная по результатам анализа популяции РИЛ на фоне цитоплазмы от WL1238.

5.4. Структура аллелей *accD*.

Локус *accD* оказался довольно изменчив. Все изученные образцы дикорастущего гороха имели разные аминокислотные последовательности белков, полученные концептуальной трансляцией *accD* аллелей. В то же время аллель *accD* линии WL1238 имел нуклеотидную последовательность, идентичную опубликованной последовательности в составе пластидного генома NC_014057 сорта Feltham First. Примечательно, что оба эти образца относятся к культурному подвиду *P. sativum* subsp. *sativum*. Выравнивание аминокислотных последовательностей, соответствующих аллелям *accD*

изученных образцов гороха, приведено на Рис. 27.

```

1                                                                 90
accD_1238 MINEDPSSLTDMNNDISWKNNSSENSSYSHADSLADVSNIDNLLSDKIFSIRDSNSNIYDIYYAYDTNDTNI TKYKWTNNINRCIESYLR
accD_1794 .....H.....
accD_721 .....H.L.....
accD_L100 .....HT.....
accD_320 .....HT.....

91                                                                 180
accD_1238 SQICEDIDFNSDICDKVQRTIIILIRSTNDTNDISDTNDISDTNDTNDTN---AIYDPFDISDTNDTNEIYDPFFILDINDTND-----
accD_1794 .....R.....DTN.....
accD_721 .....S.....T.....ISDTND
accD_L100 .....S.....ISDTND
accD_320 .....S.....ISDTND

181                                                                 270
accD_1238 TNDIYGIYDPPDIYETNIKIDICERYSEIYPRNREKSTFVPIIDYSDPNCMEKLARLWVQCETCYGLNFKQFFRPKMNI CEHCGEHLKMSSS
accD_1794 .....P.....
accD_721 .....R.....
accD_L100 .....R.....IH.....R.....P.....
accD_320 .....R.....IH.....R.....P.....

271                                                                 360
accD_1238 DRIDLSIDRDTWNPMDMVSVDPIKFDSIKELGSEEESSKDRLEDMLSPDPIELDSEEESSKDRVDSEEEKDQSYIDRLDSYQEKTLG
accD_1794 .....P.....
accD_721 .....P.....
accD_L100 .....P.....
accD_320 .....P.....

361                                                                 450
accD_1238 PETVQTGTDOREEIHPLFEDIMNQLDLYLQTAKNRVDS---EEEKDQSYIDRLDSYQEKTLGPEAVQTGTGQLNGIPLALAVMDSEFIAG
accD_1794 .....
accD_721 .....NR.....K.....EEE.....P.....
accD_L100 .....NR..Q...KK.....E--..P.....
accD_320 .....NR..Q...KK.....Q--..P.....

451                                                                 540
accD_1238 SMGCVVGEKITRLIEYATNLLPLIIVCASGGARMQEGSLSLMQMAKISSALYNYQINQKLFYVAILTSPTTGGVTASFGMLGDI IIAEP
accD_1794 .....
accD_721 .....
accD_L100 .....
accD_320 .....

541                                                                 610
accD_1238 NATIAFAGKRKRVIEQLLNKEVPEGSQSADLLFDRGLLDAVVPRHLLKEFLTELFQFHGFVPLT
accD_1794 .....SNWTENEN
accD_721 .....
accD_L100 .....Q.....
accD_320 .....Q.....

```

Рис. 27. Выравнивание теоретических аминокислотных последовательностей, кодируемых аллелями *accD* у изученных образцов гороха. Точками показаны аминокислотные остатки, идентичные остаткам в соответствующих позициях у WL1238. Дефисами обозначены делеции.

Общая длина выравнивания составила 610 аминокислот. Было выявлено 19 переменных аминокислотных позиций, а также ряд делеций/инсерций разного размера: 1, 3, 6, 8, 31, и 34 аминокислотных остатка, всего 80 позиций.

Образцы ВР320, L100 и 721 отличались от WL1238 делецией 21 п.о. в 5' части гена, эта делеция затронула как нетранслируемую область, так и

стартовый кодон. Поэтому следует предположить, что у этих образцов трансляция начинается с альтернативного стартового кодона и ожидать, что соответствующий полипептид у ВИР320, L100 и 721 будет укорочен, и его длина составит 579 аминокислот вместо 590. Интересно, что у культурного гороха в спектре мРНК, транскрибируемых с гена *accD*, обнаружены мРНК, соответствующие полипептидам длиной как 579, так и 590 аминокислотных остатков (Nagano et al., 1991). Образец Л1794 имел нуклеотидную замену в терминирующем кодоне, поэтому С-конец ожидаемого полипептида должен быть длиннее на 8 аминокислотных остатков, чем у WL1238.

Кодирующая последовательность *accD* содержит многочисленные короткие повторы, которые могли послужить причиной инсерций/делеций. Трипептид DTN, который многократно повторен в теоретическом белковом продукте гена *accD* гороха, как было отмечено еще Нагано с соавт. (Nagano et al., 1991), имел дополнительную копию у образца Л1794 (позиции 141-143 на Рис. 27).

Нуклеотидная последовательность о 18 п.о. АТАТСАГАТАСАААТГАТ, кодирующая гексапептид ISDTND, имела две тандемно повторенные копии у WL1238, Л1794 и ВИР320 (позиции 124-135 на Рис. 27), тогда как у 721 и L100 присутствовала только одна копия. Кроме того, вставка идентичной копии этой последовательности (позиции 175-180 на Рис. 27) присутствовала у ВИР320, L100 и 721. Следует отметить, что схожий мотив о 18 п.о., кодирующий тот же гексапептид ISDTND, но с одной синонимической заменой присутствовал во всех изученных образцах на участке, обозначенном номерами 151-156 на Рис. 27.

Ген *accD* содержал еще несколько инсерций/делеций, которые не имели явной связи с повторами в последовательности ДНК. Октапептид TNIKDICE, занимающий позиции 196-203 (Рис. 27), присутствовал у образцов WL1238, Л1794, 721 и отсутствовал у ВИР320 и L100. Один аминокислотный остаток (E) в позиции 214 отсутствовал у ВИР320 и L100. Также были выявлены протяженные делеции 31 аминокислотного остатка у 721 (позиции 309-339) и

34 аминокислотных остатков у ВИР320 и L100 (позиции 309-342) по сравнению с WL1238 и J11794. Делеция у ВИР320 и L100 была длиннее, чем делеция у 721, на три остатка глутаминовой кислоты (EEE). Трипептид EEE имел тандемный повтор в позициях 399-401 у 721. В той же позиции (399) у L100 наблюдалась вставка E, и у ВИР320 – вставка Q.

Вариабельные позиции, выявленные при сравнении полипептидов, кодируемых аллелями *accD*, а также структурные особенности, присущие образцам ВИР320 и L100, которые могли бы быть ответственны за несовместимость с ядерным геном *Scs1* культурного образца WL1238, перечислены в Таблице 9.

Таблица 9. Вариабельные позиции в полипептидах, кодируемых аллелями *accD*, аминокислотные замены в сравнении с WL1238 и их наличие в исследованных образцах.

| Позиции в выравнивании (Рис. 27) | Аминокислотные замены | Наличие в указанных образцах | | | |
|----------------------------------|---|------------------------------|-----|------|-----|
| | | | | | |
| 1-11 | отсутствие MINEDPSSLTD (11 аминокислотных остатков) | | 721 | L100 | 320 |
| 46 | D>H | 1794 | 721 | L100 | 320 |
| 47 | K>T | | | L100 | 320 |
| 48 | I>L | | 721 | | |
| 109 | R>S | | 721 | L100 | 320 |
| 112 | I>R | 1794 | | | |
| 116 | R>T | | 721 | | |
| 130-135 | делеция ISDTND (6 аминокислотных остатков) | | 721 | L100 | |
| 141-143 | вставка DTN (3 аминокислотных остатка) | 1794 | | | |
| 175-180 | вставка ISDTND (6 аминокислотных остатков) | | 721 | L100 | 320 |
| 196-203 | делеция TNIKDICE (8 аминокислотных остатков) | | | L100 | 320 |
| 210 | P>R | | 721 | L100 | 320 |
| 214 | делеция E | | | L100 | 320 |
| 224-225 | SD>IH | | | L100 | 320 |
| 240 | E>R | | | L100 | 320 |
| 249 | Q>P | 1794 | | L100 | 320 |
| 309-339 | делеция 31 аминокислотного остатка | | 721 | L100 | 320 |
| 340-342 | делеция EEE (3 аминокислотных остатка) | | | L100 | 320 |
| 345 | Q>P | | 721 | | |
| 375-376 | HP>NR | | 721 | L100 | 320 |

Продолжение Таблицы 9.

| Позиции в выравнивании (Рис. 27) | Аминокислотные замены | Наличие в указанных образцах | | | |
|----------------------------------|---|------------------------------|-----|------|-----|
| | | | | | |
| 379 | E>Q | | | L100 | 320 |
| 383 | N>K | | | L100 | 320 |
| 384 | Q>K | | 721 | L100 | 320 |
| 399 | вставка E | | 721 | L100 | |
| 399 | вставка Q | | | | 320 |
| 400-401 | вставка EE (2 аминокислотных остатка) | | 721 | | |
| 407 | Q>P | | 721 | | |
| 559 | E>Q | | | L100 | 320 |
| 603-610 | добавление SNWTENEN (8 аминокислотных остатков) | 1794 | | | |

Отличия, наблюдаемые у образцов, имеющих несовместимую цитоплазму, ВИР320 и L100, выделены цветом.

5.5. Позиция локуса *Vscr3* на генетической карте.

Ядерный ген-кандидат, номинированный на участие в ядерно-цитоплазматическом конфликте, кодирует белок-переносчик биотина и карбоксила (ВССР, от англ. biotin carboxyl carrier protein) в составе ацетил-коА карбоксилазы. Для *M. truncatula* аминокислотная последовательность этого белка представлена в публичных базах данных под номером XP_003601001. Эта последовательность была использована для поиска ортологичного гена гороха с помощью алгоритма tblastn (Altschul et al., 1990) в базе данных, представляющих транскриптом гороха (TSA, от англ. Transcriptome Shotgun Assembly) на сайте blast.ncbi.nlm.nih.gov Национального Центра Биоинформатики США (NCBI). Было обнаружено, что транскрипт гороха с идентификационным номером GAMJ01025269 кодирует аминокислотную последовательность с высокой степенью гомологии, 79%, к белку XP_003601001. На основе нуклеотидной

последовательности GAMJ01025269 были разработаны праймеры, которые использовали для амплификации кДНК, соответствующей локусу *Vscp3*, у пяти изучаемых образцов гороха.

Геном *M. truncatula* содержит 7 локусов, аннотированных как "белок-переносчик биотина и карбоксила", один из которых представляет собой скорее псевдоген, чем полноценный ген, и не имеет гомологов в имеющихся базах данных. Для того, чтобы убедиться в том, что из шести оставшихся паралогов был выбран нужный локус, было проведено генетическое картирование *Vscp3* с использованием описанной в главе 4, посвященной генетическому анализу, картирующей популяции РИЛ, представляющей собой F₆ от скрещивания WL1238 x ВИР320. Как описано, у растений данной популяции было определено аллельное состояние локусов *PhlC* и *AJ832139* при помощи CAPS-анализа, и аллельное состояние *Scs1* было определено фенотипированием потомства от скрещивания растений картирующей популяции с тестерной линией. У 88 растений популяции РИЛ было определено аллельное состояние локуса *Vscp3*. Полученные данные свидетельствовали о тесном сцеплении этого локуса с маркерами LGIII. Пять линий РИЛ были кроссоверами между *PhlC* и *AJ832139*. В трех кроссоверных линиях аллельное состояние *Vscp3* совпадало с аллельным состоянием *PhlC* и в двух – с аллельным состоянием *AJ832139*, что свидетельствовало о расположении *Vscp3* между указанными маркерами. Во всех 88 проанализированных линиях РИЛ аллельное состояние *Vscp3* совпадало с аллельным состоянием *Scs1*, определенном ранее посредством фенотипирования, что подтверждает предположение об идентичности локусов *Vscp3* и *Scs1*. Генетическая карта фрагмента LGIII, содержащего указанные локусы и построенная при помощи программы Mapmaker 3.0, приведена на Рис. 26, В.

5.6. Структура аллелей *Vсср3*.

Выравнивание теоретических аминокислотных последовательностей, кодируемых аллелями *Vсср3*, которые были просеквенированы у изучаемых образцов, приведены на Рис. 28.

| | | | |
|--------------------|---|-----|-----|
| | 1 | | 90 |
| <i>Vсср3</i> _1238 | MESTAAIRSFHHPIGIISHVRRSSIDRAAVVVSCHKVRNRSSNGLFQHLTNGEKRVYSHSRGKKTLLVSCAKTVEPINTTKSDASSDSTLQNS | | |
| <i>Vсср3</i> _721 | | | |
| <i>Vсср3</i> _1794 | | | |
| <i>Vсср3</i> _L100 |A..... | | |
| <i>Vсср3</i> _320 | | | |
| | 91 | | 180 |
| <i>Vсср3</i> _1238 | LEKKSLSQTATFPNGFEALVLEVCDETEIAELKLVGGEFEMHLKRSIGATNAPSSNISQTI PPPIPSKPMDETAPATPQSLPPTSSPEKAN | | |
| <i>Vсср3</i> _721 | | | |
| <i>Vсср3</i> _1794 |N.....T.....T..... | | |
| <i>Vсср3</i> _L100 |N.....T.....T..... | | |
| <i>Vсср3</i> _320 |L.....N.....T..... | | |
| | 181 | | 270 |
| <i>Vсср3</i> _1238 | PFANVSLQKSSKLTALEASGINTYVLI SAPMVGLFQRGRI I KGRMLPPNCKEGDVI REGQVI GYLNQFGAAHPVKSDVAGEVLKLLVDEG | | |
| <i>Vсср3</i> _721 | | | |
| <i>Vсср3</i> _1794 |I..... | | |
| <i>Vсср3</i> _L100 |T.....Y.....I..... | | |
| <i>Vсср3</i> _320 |T.....Y.....I..... | | |
| | 271 | 290 | |
| <i>Vсср3</i> _1238 | DPVGYGDHMAVLPSPFHD IK | | |
| <i>Vсср3</i> _721 | | | |
| <i>Vсср3</i> _1794 | | | |
| <i>Vсср3</i> _L100 |I..... | | |
| <i>Vсср3</i> _320 |I..... | | |

Рис. 28. Выравнивание теоретических аминокислотных последовательностей, кодируемых аллелями *Vсср3* у изученных образцов гороха. Точками показаны аминокислотные остатки, идентичные остаткам в соответствующих позициях у WL1238.

Всего было обнаружено 9 переменных аминокислотных позиций и ни одной инсерции/делеции, так что все теоретические полипептиды имели одинаковую длину 290 аминокислотных остатков. Кодирующая последовательность аллеля WL1238 была идентична кодирующей последовательности образца из публичных баз данных GAMJ01025269, аллель линии 721 отличался от них двумя синонимическими нуклеотидными заменами и, соответственно, кодировал ту же аминокислотную последовательность. Различия в структуре аллельных вариантов *Vсср3* суммированы в Таблице 10.

Таблица 10. Вариабельные позиции в полипептидах, кодируемых аллелями *Vccp3*, аминокислотные замены в сравнении с WL1238 и их наличие в исследованных образцах.

| Позиции в выравнивании (Рис. 28) | Аминокислотные замены | Наличие в указанных образцах | | |
|----------------------------------|-----------------------|------------------------------|------|-----|
| 70 | T>A | | L100 | |
| 130 | M>L | | | 320 |
| 135 | S>N | 1794 | L100 | 320 |
| 159 | M>T | 1794 | | |
| 179 | A>T | 1794 | L100 | 320 |
| 211 | M>I | 1794 | | |
| 211 | M>T | | L100 | 320 |
| 252 | H>Y | | L100 | 320 |
| 254 | V>I | | L100 | 320 |
| 279 | M>I | | L100 | 320 |

Отличия, наблюдаемые у образцов, имеющих несовместимую цитоплазму, ВИР320 и L100, выделены цветом.

В предыдущей таблице были суммированы отличительные характеристики молекулярной структуры аллелей *accD* у ВИР320 и L100, то есть образцов, имеющих цитоплазму, несовместимую с ядерным геном *ScsI* линии WL1238. Цитоплазма этих двух образцов совместима с ядерным геномом, происходящим только от этих же двух образцов. Поэтому возможные молекулярные детерминанты, определяющие взаимодействие бета субъединицы карбоксилтрансферазы, кодируемой локусом *accD*, с белком-переносчиком биотина и карбоксила, продуктом локуса *Vccp3*, должны отличаться у ВИР320 и L100 с одной стороны от WL1238, JI1794 и 721 с другой стороны. Четыре аминокислотные замены отвечают этому условию (Рис. 28, Табл. 10), все они приурочены к отрезку в С-концевой области, аннотированному как биотиниловый домен, ответственный за связывание биотина и присутствующий у всех биотин-зависимых ферментов.

5.7. Потенциальные взаимодействия генов-кандидатов.

На основании вышеизложенного были номинированы локусы-кандидаты на роль участников ядерно-цитоплазматического конфликта у гороха. Со стороны пластидного генома – *accD*, кодирующий бета субъединицу карбоксилтрансферазы, и со стороны ядерного генома – *Bccp3*, кодирующий белок-переносчик биотина и карбоксила, входящие в состав мультимерной формы пластидной ацетил-коА карбоксилазы (Sasaki, Nagano, 2004). Напрашивается предположение, что локус *Bccp3* совпадает с ранее описанным *Scs1*, ответственным за проявления ядерно-цитоплазматической несовместимости. В отличие от описанных в литературе случаев конфликта ядерно и пластидного геномов у цибридов пасленовых (Schmitz-Linneweber et al., 2005) и межвидовых гибридов *Oenothera* (Greiner et al., 2008, b), где возникновение конфликта относили на счет нарушенных регуляторных взаимодействий, в качестве причины ядерно-пластидной несовместимости у гороха предполагается неправильное взаимодействие субъединиц структурных белков.

Пластидная форма ацетил-коА карбоксилазы представляет собой мультимерный комплекс белковых субъединиц, включающих биотинкарбоксилазу (BC, от англ. biotin carboxylase), белок-переносчик биотина и карбоксила (BCCP, от англ. biotin carboxyl carrier protein) и альфа- и бета субъединицы карбоксилтрансферазы (alpha-, beta-CT, от англ. carboxyltransferase) (Sasaki, Nagano, 2004). Первые три из указанных субъединиц кодируются в ядре, а последняя кодируется пластидным геном *accD* (Sasaki et al., 1993). В этой связи напрашивается предположение о том, что внутриклеточный конфликт возникает из-за неправильного взаимодействия субъединиц, которые кодируются в разных клеточных компартментах и адаптированы для связывания эволюционно дивергированных полипептидов. Эту ситуацию можно сравнить с некоторыми случаями пропионовой ацидемии у человека. Данная болезнь возникает вследствие дисфункции пропионил-коА карбоксилазы, биотин-

зависимого фермента, имеющего структуру, сходную с ацетил-коА карбоксилазой, но состоящего из двух субъединиц, альфа и бета (Tong, 2013). Существуют формы болезни, связанные с мутациями в альфа субъединице, в бета субъединице, а также есть специфический класс мутаций, затрагивающих поверхность взаимодействия альфа и бета субъединиц, что нарушает правильную сборку мультимеров (Muro et al., 2001; обзор Desviat et al., 2004).

С учетом полученных ранее данных гены *accD* и *Bccp3* составляют идеальную пару кандидатов на роль участников ядерно-цитоплазматического конфликта. Ацетил-коА карбоксилаза (АСС, от англ. acetyl-CoA carboxylase) не принимает участие в фотосинтезе, но играет ключевую роль в биосинтезе жирных кислот, который происходит в пластидах (Sasaki, Nagano, 2004). Это хорошо соответствует наблюдаемым аномалиям структуры корней, которые не являются фотосинтезирующими органами. (Рис. 3, а).

Считается, что субъединицы входят в каталитически активный комплекс в стехиометрических соотношениях $(BC)_2(BCCP)_4(CT\text{-альфа}, CT\text{-бета})_2$ (Tong, 2013), кроме того существуют тканеспецифичные варианты (Thelen et al., 2001), поэтому есть все основания полагать, что большое число ядерных генов участвует в формировании мультимерного комплекса АСС. Логично предположить, что ядерный локус *Scs2* кодирует одну из субъединиц АСС и вследствие этого комплементарен локусу *Scs1*. Весьма вероятно, что *Scs2* кодирует альфа-СТ, то есть, согласно (Sasaki, Nagano, 2004), представляет собой локус *AccA*. Позиция *AccA* в собранных геномах *M. truncatula* и *Cicer arietinum* и на генетической карте гороха к моменту настоящего исследования была неизвестна, поэтому был предпринят эксперимент по картированию *AccA*. Для этого было необходимо сначала разработать CAPS-маркеры, различающие аллели из линий WL1238 и ВІР320. За основу был взят ген нута (*Cicer arietinum* L.), аннотированный как "альфа субъединица карбоксилтрансферазы ацетил-коэнзимА-карбоксилазы, пластидной формы" (Gene ID: 101514765). С помощью алгоритма blast в публичных базах данных

(www.ncbi.nlm.nih.gov) был найдена гомологичная последовательность мРНК гороха (Z31559), кодирующая "белок внутренней мембраны хлоропластов". Путем сравнения с геномной последовательностью нута были определены позиции интронов и разработаны праймеры для амплификации второго интрона. ПЦР-продукты были просеквенированы, и на основании полученных последовательностей была подобрана рестриктаза (*Hae*III), позволяющая определять аллельное состояние *AccA* CAPS-анализом.

Было определено аллельное состояние *AccA* у растений 87 линий из картирующей популяции РИЛ, описанной в главе, посвященной генетическому анализу генов *Scs1* и *Scs2*. *AccA* оказался тесно сцеплен с маркерами группы сцепления LGV и на материале изученных 87 линий неотделим кроссинговером от *Scs2*. Генетическая карта участка LGV, содержащего молекулярные маркеры *cri*, *Met2*, *AccA*, видмый маркер *gp* и локус несовместимости *Scs2*, построенная при помощи программы MapMaker3.0, приведена на Рис. 29.

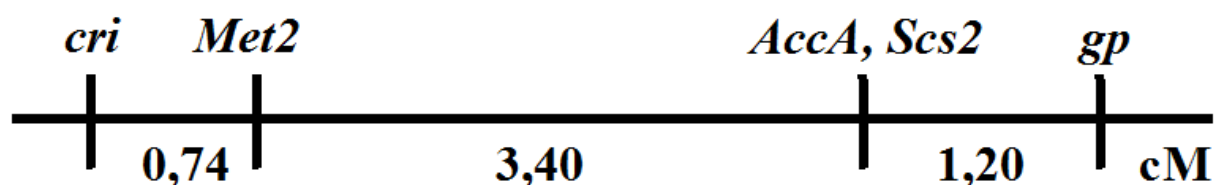


Рис. 29. Генетическая карта участка LGV, содержащего локус несовместимости *Scs2*, построенная на основании анализа картирующей популяции РИЛ, на фоне цитоплазмы культурного гороха.

Мультимерная природа АСС может также объяснить феномен существенно сниженной частоты гомозигот по аллелю *Scs2* от линии WL1238 на фоне цитоплазмы ВИР320 в расщеплении F₂ от некоторых скрещиваний (см. Табл. 8). По всей видимости, процент появления гомозигот по аллелю *Scs2_1238* зависит от расщепления в этих скрещиваниях других

ядерных генов, которые вполне могут кодировать субъединицы ацетил-коА карбоксилазы.

Подобного рода эпистатическое взаимодействие генов, кодирующих субъединицы ацетил-коА карбоксилазы, было отмечено в некоторых скрещиваниях, где наблюдалась ядерно-пластидная несовместимость. Один из генов *M. truncatula*, аннотированный как кодирующий белок-переносчик биотина и карбоксила ("Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase", Gene ID: 11442359), находится в хромосоме 7, его ортолог у гороха был обозначен нами как *Vccp71*. Было обнаружено, что в некоторых расщеплениях при несовместимых скрещиваниях сегрегация аллелей *Vccp71* и *AccA* существенно отличается от ожидаемой при независимом комбинировании и, по-видимому, зависит от аллельного состояния еще какого-то локуса (или локусов), возможно, кодирующих субъединицы АСС. В Табл. 11, 12 приведено совместное расщепление аллелей *AccA* и *Vccp71* в двух разных F₃ от скрещивания ВИР320 х РИЛ-65.

Таблица 11. Число растений в фенотипических классах в зависимости от аллельного состояния локусов *AccA* и *Vccp71* в F₃, происходящем из F₂-4 от скрещивания ВИР320 х РИЛ-65. В скобках приведены теоретически ожидаемые численности при независимом наследовании.

| Фенотипы локуса <i>AccA</i> | Фенотипы локуса <i>Vccp71</i> | | |
|-----------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|
| | <i>Vccp71</i> _1238 | <i>Vccp71</i> _het | <i>Vccp71</i> _320 |
| <i>AccA</i> _1238 | 2 (1,8) | 3 (3,6) | 0 (1,8) |
| <i>AccA</i> _het | 1 (3,6) | 14 (7,2) | 2 (3,6) |
| <i>AccA</i> _320 | 1 (1,8) | 3 (3,6) | 3 (1,8) |

chi-sq. = 12,10; 0,1 < p < 0,2

Таблица 12. Число растений в фенотипических классах в зависимости от аллельного состояния локусов *AccA* и *Vccp71* в F₃, происходящем из F₂-9 от скрещивания ВИР320 x РИЛ-65. В скобках приведены теоретически ожидаемые численности при независимом наследовании.

| Фенотипы локуса <i>AccA</i> | Фенотипы локуса <i>Vccp71</i> | | |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|
| | <i>Vccp71_1238</i> | <i>Vccp71_het</i> | <i>Vccp71_320</i> |
| <i>AccA_1238</i> | 2 (1,9) | 1 (3,8) | 0 (1,9) |
| <i>AccA_het</i> | 0 (3,8) | 15 (7,7) | 3 (3,8) |
| <i>AccA_320</i> | 0 (1,9) | 0 (3,8) | 10 (1,9) |

chi-sq. = 54,29; p < 0,001***

Если данные Табл. 11 не противоречат гипотезе о независимом наследовании *AccA* и *Vccp71*, то согласно данным Табл. 12 эти два локуса тесно сцеплены. У *M. truncatula* ортолог *Vccp71* (GeneID: 11420469) расположен в хромосоме 7 на расстоянии около 6 Мб от *AccA* (Gene ID: 25498718). Длина генетической карты в данном районе сильно варьирует от скрещивания к скрещиванию (Рис. 25). Возможно, сужение генетической карты связано с тем, что некоторые фенотипические классы, представляющие кроссоверные комбинации, например, *AccA_1238 Vccp71_320* (Табл. 11, 12) или *AccA_320 Vccp71_1238* (Табл. 12) нежизнеспособны. Число растений в изученных расщеплениях невелико, поэтому какие-либо выводы являются преждевременными, но в качестве гипотезы можно предположить, что субъединицы ферментного комплекса АСС, кодируемые локусами *AccA* и *Vccp71*, взаимодействуют между собой. При этом альфа-субъединица карбоксилтрансферазы, сходящая с матрицы *AccA_1238*, не подходит к белку, сходящему с матрицы *Vccp71_320*, при условии, что бета-субъединица карбоксилтрансферазы кодируется аллелем *AccD_320* (то есть на фоне цитоплазмы от ВИР320). Жизнеспособность же

фенотипического класса AccA_320 Vscr71_1238 зависит от аллельного состояния еще каких-то, пока неизвестных нам локусов. Поэтому соотношения численностей генотипических (и фенотипических) классов и, соответственно, расстояний на генетической карте, различаются в разных F₃.

5.8. Репродуктивная совместимость представителей рода горох в свете данных о строении субъединиц ацетил-коА карбоксилазы.

До настоящего момента рассмотрение ядерно-цитоплазматической совместимости представителей рода горох фокусировалось на несовместимости пластид, происходящих от образцов ВИР320 и L100, с ядерным геномом линии WL1238. Однако, в роде *Pisum* имеются репродуктивные барьеры, которые проявляют себя также при скрещиваниях других коллекционных образцов. Тогда как цитоплазмы линий WL1238 и ВИР320 различаются по своей совместимости с аллелем *Scs1* от WL1238, эти цитоплазмы сходны в том, что несут пластиды, несовместимые с ядерным геномом линии 721 (Bogdanova et al., 2014). Это означает, что существует по меньшей мере еще один фактор, определяющий несовместимость пластидного генома с ядерным.

Совместимость некоторых образцов, была изучена путем генетического анализа (Bogdanova et al., 2014), а также имеются данные относительно совместимости в ряде скрещиваний, а именно: ВИР320 x L100, L100 x ВИР320, ВИР320 x 721, 721 x ВИР320, L100 x 721, 721 x L100, полученные на материале растений F₁ без дальнейшего сегрегационного анализа (Kosterin, Bogdanova, 2015). На основании этих знаний была составлена схема, предполагающая взаимодействие пластидных детерминант несовместимости с ядерным партнером (или партнерами).

В аллельных вариантах *accD* имеется целый ряд сайтов, которые могли бы служить детерминантами, определяющими несовместимость пластид линий ВИР320 и L100 с ядерным геномом WL1238. Это 7 аминокислотных замен и 3 делеции (Табл. 9). Одна из аминокислотных замен, E→R в позиции

240 (Рис. 27) произошла в домене типа «цинковый палец» $CX_2CX_{15}CX_2C$, и связана скорее с каталитической активностью, а не с образованием белкового комплекса (Kozaki et al, 2001). Что касается ядерного участника, *Vccp3* (или *Scs1*), возможные молекулярные детерминанты конфликта представлены четырьмя аминокислотными заменами в биотиниловом домене ВССР, ответственном за связывание биотина. Любая из них или их комбинаций может быть ответственной за возникновение ядерно-цитоплазматического конфликта.

Другая пластидная детерминанта (детерминанты), приводит к несовместимости цитоплазмы линии WL1238 с ядерным геномом линии 721. Соответствующая ей ядерная детерминанта (детерминанты) не может быть представлена локусом *Vccp3*, поскольку полипептиды, кодируемые аллелями линий WL1238 и 721 идентичны по своей последовательности. Приводит ли наличие этой детерминанты к несовместимости цитоплазмы от ВИР320 с ядерным геномом 721, неясно, так как этот эффект маскируется неблагоприятным взаимодействием *accD* – *Scs1*. То же верно в отношении линии L100. В данном случае можно высказать следующие соображения. Цитоплазма WL1238 несовместима с ядерными геномами L100 и 721. Можно предположить, что эти несовместимости имеют сходную природу, и что продукты несовместимого ядерного локуса линий L100 и 721 имеют общие характеристики, отличающие их от аллелей этого локуса линии WL1238, а также ВИР320 и Л1794, которые совместимы с цитоплазмой WL1238. Также предполагается, что эти несовместимые белковые продукты имеют сайты связывания, "подогнанные" под молекулярные продукты пластидных генов, несоответствие которых приводит к несовместимости. Таким образом, предполагается, что различия в аллелях ядерных генов имеют параллель в различиях аллелей пластидных генов. В таком случае предполагаемые участники конфликта должны быть схожи в пластидных геномах 721 и L100, но отличаться от аллелей в других образцах. По этому принципу во всем пластидном геноме единственным геном-кандидатом является локус *accD*. В

линиях 721 и L100 продукт этого гена содержит одну копию гексапептида ISDTND (позиции 130-135 на Рис. 27), который тандемно повторен у остальных проанализированных линий. Еще одна возможная детерминанта в составе продукта гена *accD* – остаток глутаминовой кислоты (E) в позиции 399 (Рис. 27). Этот остаток входит в состав отрицательно заряженного поли-Е тракта, который имеет меньшую длину у WL1238, JI1794 и ВИР320 (три остатка), чем у L100 (4 остатка) и 721 (6 остатков).

На основании вышеизложенного предлагается следующая схема совместимости/несовместимости молекулярных детерминант, кодируемых пластидным локусом *accD* и ядерными локусами (Рис. 30). Данная схема предполагает, что молекулярные детерминанты, присутствующие в продукте гена *accD* у линий ВИР320 и L100, являются первичными детерминантами. Если эта детерминанта присутствует в продукте *accD* какой-то линии, то эта линия будет совместима в качестве донора цитоплазмы только с теми линиями, у которых кодируемый в ядре белок ВССР несет сайт связывания, подходящий к этой детерминанте (например, ВИР320 x L100, L100 x ВИР320). В противном случае комбинация будет несовместимой (например, ВИР320 x WL1238, ВИР320 x JI1794, ВИР320 x 721, L100 x WL1238, L100 x 721). (Какой из продуктов, ядерный или пластидный, несет "детерминанты", а какой - "сайт связывания" принято совершенно условно.) Если продукт гена *accD* лишен первичной детерминанты, совместимость будет зависеть от присутствия/отсутствия вторичной детерминанты. Если вторичная детерминанта присутствует в продукте гена *accD*, то такая цитоплазма будет совместима с продуктом ядерного гена, несущим подходящие к такой детерминанте сайты связывания (например, WL1238 x ВИР320, JI1794 x ВИР320, WL1238 x JI1794, JI1794 x WL1238), и несовместима в противном случае (например, WL1238 x 721, WL1238 x L100). Если вторичная детерминанта в продукте гена *accD* отсутствует, то такая цитоплазма будет совместима с продуктом ядерного гена как в случае наличия у него сайта связывания (например, 721 x ВИР320, 721 x WL1238), так и в случае

отсутствия такого сайта (например, 721 x L100). Однако, если продукт ядерного гена имеет невостробованный сайт связывания для вторичной детерминанты, то такая комбинация будет частично совместимой, то есть связана со сниженной фертильностью пыльцы, но при отсутствии летальных эффектов (Bogdanova et al, 2014).

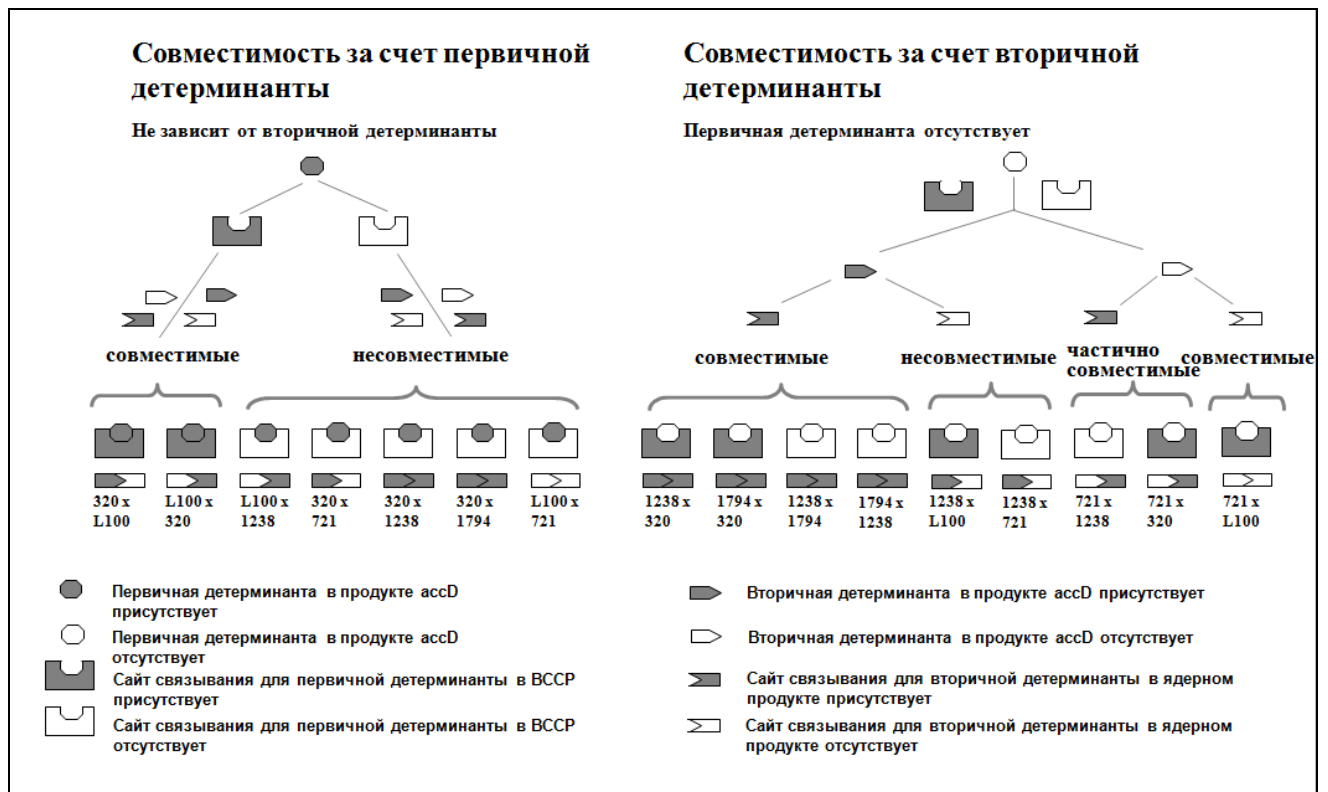


Рис. 30. Схематическое изображение совместимых и несовместимых комбинаций молекулярных детерминант в пластидном локусе *accD* и ядерных локусах. Частично совместимые комбинации связаны со сниженной фертильностью пыльцы, но не демонстрируют летального эффекта (Bogdanova et al., 2014).

Хотя представленная схема несколько сложна для восприятия, она отражает реальную ситуацию взаимной совместимости/несовместимости между разными образцами дикорастущего и культурного гороха, изученной к настоящему времени (Ядрихинский, Богданова, 2011; Bogdanova et al., 2014). Реальная картина такова, что образцы гороха нельзя сгруппировать так,

чтобы все они были совместимы внутри группы и несовместимы относительно образцов другой группы (или групп).

5.9. Ядерные локусы, потенциальные участники конфликта.

Настоящая модель ядерно-цитоплазматического конфликта предполагает, что кодируемые в ядре молекулярные детерминанты (или сайты связывания для пластидных детерминант), представлены локусом *Vccp3*, кодирующим белок-переносчик биотина и карбоксила, при этом предполагается, что этот локус идентичен изученному ранее генетическими методами локусу *Scs1* (Глава 2). Предполагается, что продукт этого локуса несет первичные детерминанты конфликта, возникающего при скрещивании диких форм гороха линий ВИР320 и L100 в качестве доноров цитоплазмы с культурным горохом. Сходный конфликт наблюдался также в некоторых скрещиваниях культурной линии WL1238 как донора цитоплазмы. Ядерный ген, ответственный за развитие такого конфликта, находится в группе сцепления III вблизи локусов, маркирующих *Scs1*, поэтому логично было предположить, что в данном случае конфликт также определяется локусом *Scs1* (Bogdanova *et al.*, 2014). В соответствии со схемой, приведенной на Рис. 30, этот конфликт связан с несовместимостью вторичных детерминант. Однако секвенирование мРНК локуса *Vccp3* показало, что он не может кодировать первичные и вторичные детерминанты одновременно. Поэтому приходится постулировать наличие еще одного ядерного локуса, тесно сцепленного с маркерами LGIII (Bogdanova *et al.*, 2014). Локус *Scs1* был картирован между геном, кодирующим фосфолипазу С, с одной стороны, и геном, кодирующим белок семейства GRAS, с другой стороны (Рис. 23). Картирование было проведено в скрещивании линий популяции РИЛ с участием линии ВИР320 (Рис. 21). Данные по расщеплению генотипов в скрещивании с участием L100 (Ядрихинский, Богданова, 2011) подтверждают данную позицию локуса *Scs1* на карте. Однако, в скрещивании с участием линии 721 (Bogdanova *et al.*, 2014) возникли растения,

кроссоверные между локусом несовместимости и окаймляющими маркерами, которые противоречили данной схеме. У этих растений локус несовместимости был гетерозиготен, тогда как оба окаймляющих маркера *PhlC* и *AJ832139*, были гомозиготны по аллелю от несовместимого родителя, в данном случае, 721. Это предполагает одну из двух возможностей: это могли быть двойные кроссоверы наподобие тех, что наблюдались вблизи локуса *scs* пшеницы (Simons et al, 2003), либо может существовать тесно сцепленный локус со сходным эффектом вне интервала *PhlC* - *AJ832139*. Первоначально была признана более вероятной версия "двойных кроссоверов", однако, анализ последовательностей мРНК локуса *Vccp3* предполагает существование другого локуса несовместимости.

Действительно, в хромосоме 3 *M. truncatula* на расстоянии 534,541 п.о. от *Vccp3* (что соответствует приблизительно 1-2 сМ) есть локус, имеющий номер Gene ID: 11411288 (Рис. 26) и кодирующий "голокарбоксилазу синтетазу *hcs2*" (Holocarboxylase synthetase *hcs2*), содержащую домен типа "биотин-(ацетил-КоА-карбоксилаза) лигаза" (Biotin-(acetyl-CoA carboxylase) ligase), который катализирует присоединение биотина к ВССР. Подобная функция гена-кандидата объясняет его вторичность в плане детерминант несовместимости по сравнению с геном, кодирующим ВССР.

Описанная выше схема открывает перспективу дальнейшего исследования взаимодействия субъединиц ацетил-коА-карбоксилазы методами генетического анализа.

С эволюционной точки зрения, ядерно-цитоплазматическое взаимодействие играет важную роль в становлении репродуктивной изоляции (Johnson, 2010; Burton et al, 2013). Можно даже задать вопрос "Существуют ли особые типы генов, предрасположенные к вызыванию гибридной несовместимости?" (Burton et al, 2013). В свете вышеизложенного представляется уместным предположить, что изменчивость локуса *accD* может представлять собой движущую силу в дивергенции популяций и видообразовании. У многих видов растений *accD* демонстрирует высокую

степень изменчивости, например, у *Oenothera* (Greiner et al., 2008, a), *Medicago truncatula* (Gurdon, Maliga, 2014). Район пластидного генома, где расположен локус *accD*, проявляет повышенную изменчивость у бобовых (Magee et al., 2010); у маслиновых (Oleaceae) в этом районе часто сосредоточены точки разрывов, приводящих к инверсиям, сопряженным с полной или частичной потерей *accD* (Lee et al., 2007). Интересно, что у гороха также была обнаружена инверсия с одной из точек разрыва вблизи *accD*, сопряженная с потерей 29 п.о. в межгенном спейсере *psaI-accD* у линии Л1794.

Белковый продукт гена *accD*, бета-субъединица карбоксилтрансферазы, образует мультимерный комплекс с рядом других субъединиц. Предполагается, что общее число субъединиц, участвующих в формировании активного комплекса, равно десяти (Tong, 2013). Все ядерные гены, кодирующие полипептиды, взаимодействующие с карбоксилтрансферазой, кодируемой пластидным геном *accD*, должны ко-адаптироваться, чтобы скомпенсировать вариабельность в локусе *accD*. Подобным образом, у приматов была зарегистрирована повышенная скорость компенсаторных аминокислотных замен в сайтах кодируемых в ядре субъединиц, которые взаимодействовали с элементами комплекса цитохром С оксидазы, кодируемыми в митохондриях (Osada, Akashi, 2012).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование началось с обнаружения репродуктивного барьера внутри вида *Pisum sativum* при гибридизации культурного гороха с некоторыми из дикорастущих сородичей и вылилось в расшифровку молекулярно-генетической основы данного феномена. В настоящей работе описаны проявления ядерно-цитоплазматического конфликта, возникающего при скрещивании дикорастущего гороха образца ВИР320 с культурным горохом. Линия ВИР320 принадлежит подвиду *Pisum sativum* subsp. *elatius* и является уникальной в том смысле, что ее гибриды с культурным горохом в зависимости от источника цитоплазмы проявляют весьма характерный фенотип, связанный со значительным нарушением морфологии растений и видимый невооруженным глазом. Хлорофилльная недостаточность, редукция листочков и прилистников, редукция боковых корней, уменьшение размеров растений позволяют легко регистрировать проявления ядерно-цитоплазматического конфликта уже в первом поколении гибридов. Другими проявлениями конфликта являются снижение фертильности пыльцы, нарушение течения мейоза, нарушение ультратрутуры хлоропластов. Было установлено, что неблагоприятные проявления ядерно-цитоплазматического конфликта могли быть компенсированы при неканоническом двуродительском наследовании пластид. Тем самым было показано, что конфликт проистекает от несовместимости ядерного и пластидного геномов. Хотя возможность двуродительского наследования хлоропластов у гороха предполагалась исходя из цитологического анализа (Corriveau, Coleman, 1988), молекулярно-генетические исследования показали исключительно материнское наследование пластид (Polans et al., 1990). Настоящим исследованием впервые была продемонстрирована возможность передачи пластид гороха по отцовской линии.

Наличие хорошо различимого фенотипа, а также принадлежность к тому же виду гороха, *Pisum sativum*, делают линию ВИР320 удобной моделью, позволяющей провести генетический анализ ядерно-цитоплазматической

несовместимости. Проведенный генетический анализ показал, что в описанном ядерно-цитоплазматическом конфликте участвуют минимум два несцепленных ядерных гена, которые были обозначены как *Scs1* и *Scs2* по аналогии с геном *scs* (species cytoplasm specific) пшеницы. Было показано, что описанные гены несовместимости являются доминантными и комплементарными, то есть явно выраженный ядерно-цитоплазматический конфликт, приводящий к возникновению характерного фенотипа гибридных растений, развивается при условии, что в каждом из локусов присутствует хотя бы один аллель от несовместимого родителя. При условии гетерозиготности одного из генов несовместимости конфликт менее выражен и проявляется в виде снижения фертильности пыльцы и более бледной хлорофилльной окраске, что, как правило, незаметно на глаз. Вероятно, именно поэтому ядерно-цитоплазматический конфликт при гибридизации культурного гороха с дикими сородичами не был описан как таковой, хотя он оказался довольно широко распространен (Bogdanova et al., 2014). Некоторые исследователи ранее отмечали аномалии фенотипа отдельных гибридов, но систематически данный вопрос не исследовали (Лутков, 1930; Ben-Ze'ev, Zohary, 1973).

С использованием анализирующих скрещиваний впервые было показано, что аллель гена *Scs1*, происходящий от культурного гороха, на фоне цитоплазмы дикорастущего гороха является спорофитной леталью и леталью для мужских гаметофитов. В отличие от него, аллель гена *Scs2*, происходящий от культурного гороха, на фоне цитоплазмы дикорастущего родителя снижает фертильность пыльцы на 30-50%, а также имеет рецессивный эффект, который проявляется в виде синдрома ядерно-цитоплазматической несовместимости – нарушение хлорофилльной пигментации, редукция листовых органов, снижение фертильности пыльцы до 20-30%. Также были получены свидетельства того, что ген *Scs2* взаимодействует с другими генами ядерного генома, которые расщепляются в картирующих популяциях.

Посредством генетического картирования было показано, что локус ядерно-цитоплазматической несовместимости *Scs1* заключен в интервал около 2,5 сМ между фланкирующими маркерами *PhlC* (AF280748) и *sym7* (AJ832139) на генетической карте III группы сцепления, физическое расстояние между ортологичными генами у *M. truncatula* составляет около 1,1 Мб. Второй ген несовместимости, *Scs2*, заключен в интервал между окаймляющими маркерами *Met2* (AB176565) и *Nca* (FG533805) на генетической карте V группы сцепления. В последнем случае размер интервала сильно варьирует в разных скрещиваниях и составляет от 3 до 20 сМ, физическое расстояние между ортологичными генами у *M. truncatula* составляет около 3,8 Мб. Генетическое картирование позволило значительно сузить интервал для поиска возможных генов-кандидатов на роль участников конфликта. Сопоставимый по глубине генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости был проведен только у пшеницы, где был поставлен на генетическую карту один из двух известных локусов несовместимости, для которого была сделана оценка длины содержащего его интервала размером около 1,1 Мб (Michalak de Jimenez et al., 2013).

Для поиска кандидатов на роль участников конфликта со стороны пластидного генома было применено высокопроизводительное секвенирование полных пластидных геномов на платформе Ion Torrent. Были определены и проаннотированы последовательности пяти пластидных геномов, принадлежащих одной культурной линии и четырем диким, две из которых имели цитоплазму совместимую, и две – несовместимую с ядерным геном *Scs1* культурного гороха. Посредством биоинформатического анализа были выявлены четыре потенциальных гена-кандидата. Выбор наиболее вероятного пластидного участника конфликта стал возможен благодаря наличию информации о генетической локализации ядерного гена-участника, поскольку в этом районе должен находиться ген, вероятнее всего, кодирующий белок с комплиментарной функцией. С учетом этой информации наиболее вероятным участником конфликта со стороны

пластидного генома является ген *accD*, кодирующий бета-субъединицу пластидной гетеромерной ацетил-коА- карбоксилазы, и со стороны ядерного генома – ген, кодирующий белок переносчик биотина и карбоксила, входящий в состав того же мультимерного ферментного комплекса. На основании биоинформатического анализа этот ядерный ген был обозначен *Vscp3*, при этом предполагается его идентичность локусу *Scs1*, описанному на основании генетического анализа.

В настоящей работе были номинированы гены-кандидаты на роль участников ядерно-цитоплазматического конфликта, возникающего при скрещивании представителей вида *Pisum sativum*. В принципе, остается теоретическая возможность того, что в конфликт вовлечены какие-то другие, неизвестные гены, которые взаимодействуют между собой неизвестным образом. Однако предложенная пара кандидатов идеально соответствует наблюдаемым генетическим взаимодействиям локусов, вовлеченных в конфликт. Показано, что локус несовместимости *Scs2* расположен в том же районе генома, что *AccA*. Таким образом, весьма вероятно, что он кодирует альфа-субъединицу карбоксилтрансферазы, входящей в состав пластидной ацетил-коА-карбоксилазы. На основании паттерна совместимости между разными представителями рода *Pisum*, принимая во внимание структуру аллелей локуса *Vscp3*, предполагается существование другого ядерного локуса (или локусов), вовлеченных в конфликт, опосредованный *accD*. Возможно, таким локусом является *hcs2*, кодирующий биотин-(ацетил-КоА-карбоксилаза) лигазу. Изменчивость в локусах *accD* и *Vscp3* хорошо соответствует картине совместимости в роде *Pisum*, однако полный спектр ядерных локусов-участников конфликта еще предстоит выяснить.

На основании полученного в данной работе знания можно предсказать совместимость/несовместимость двух форм гороха за счет ядерно-цитоплазматического конфликта, связанного с действием гена *Scs1*, исходя из структуры пластидного локуса *accD*.

В настоящей работе предложена модель ядерно-цитоплазматической несовместимости, при которой возникает конфликт пластид и ядра, за счет того, что белковые субъединицы мультимерного ферментного комплекса, кодируемые в разных клеточных геномах, плохо подходят друг к другу. Такой механизм несовместимости теоретически весьма вероятен, однако, описан до сих пор не был (Burton et al., 2013). В предложенных ранее моделях несовместимости пластид и ядра предполагались нарушения регуляторных взаимодействий (Schmitz-Linneweber et al., 2005; Greiner et al., 2008, b). В качестве пластидных факторов-участников конфликта предлагались ген, кодирующий альфа-субъединицу АТФазы табака (Schmitz-Linneweber et al., 2005) и промоторный участок в межгенном промежутке *clpP-psbB* у энотеры (Greiner et al., 2008, b). Ядерные участники конфликта при этом не изучались. Настоящее исследование впервые в мировой практике предлагает модель несовместимости ядра и пластид, включающую как пластидные, так и ядерные гены-кандидаты.

ВЫВОДЫ.

1. Впервые показано, что при гибридизации культурного гороха с дикорастущей формой, представляющей подвид *Pisum sativum* subsp. *elatius*, имеет место конфликт ядерного генома культурного гороха и пластидного генома дикого гороха, что проявляется в виде хлорофилльной недостаточности, уменьшении размера листовых органов и корней, снижении фертильности пыльцы.
2. Впервые показано, что в ядерно-цитоплазматическом конфликте у гороха участвуют как минимум два ядерных гена, обозначенные *Scs1* и *Scs2*.
3. Впервые локализованы на генетической карте гены ядерно-цитоплазматической несовместимости; локус *Scs1* картирован в группе сцепления III между маркерами *PhlC* (AF280748) и *AJ832139* (AJ832139), *Scs2* заключен в интервал между маркерами *Met2* (AB176565) и *Nca* (FG533805) в группе сцепления V.
4. Впервые установлено, что на фоне цитоплазмы дикого гороха аллели каждого из локусов, *Scs1* и *Scs2*, происходящие от культурного гороха, в гетерозиготе приводят к снижению фертильности пыльцы на 50-60%, при гетерозиготности обоих генов формируется аномальный фенотип, включающий хлорофилльную недостаточность, редукцию листовых органов и боковых корней.
5. Установлено, что аллель локуса *Scs1*, происходящий от культурного гороха, на фоне цитоплазмы дикорастущего гороха является спорофитной леталью и леталью для мужских гаметофитов. Аллель локуса *Scs2*, происходящий от культурного гороха, на фоне цитоплазмы дикорастущего родителя снижает жизнеспособность несущих его мужских гаметофитов.
6. Определены и проаннотированы нуклеотидные последовательности пяти пластидных геномов, совместимых и несовместимых с ядерным геном *Scs1* культурного гороха, на основании чего выдвинуты гены-кандидаты на роль участников ядерно-цитоплазматического конфликта со стороны пластид.

7. Впервые в качестве генов-кандидатов на роль участников ядерно-цитоплазматического конфликта номинированы как ядерный, так и пластидный локусы, кодирующие субъединицы ферментного комплекса ацетил-коА-карбоксилазы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабийчук Е.Л. Ядерно-цитоплазматическая несовместимость у цибридов с ядром *Atropa belladonna* и пластидами *Nicotiana tabacum*. / Е.Л. Бабийчук, М.А. Банникова, В.П. Момот, Н.Н. Череп, И.К. Комарницкий, С.Г. Кушнир, Ю.Ю. Глеба // Биополимеры и клетка. – 1990. – Т.6. – С.91–98.
2. Богданова В.С. Случай аномального наследования хлоропластов в скрещиваниях посевного гороха с участием одной из диких форм. / В.С. Богданова, О.Э. Костерин // Докл РАН. – 2006. – Т.406. – С.256–259.
3. Вавилов Н.И. Ботанико-географические основы селекции (Учение об исходном материале в селекции). / Н.И. Вавилов. Избранные труды. – М.-Л. Изд. АН СССР. – 1960. – Т.2. – С.21–70.
4. Войлоков А.В. Генетика постзиготической репродуктивной изоляции у растений. / А.В. Войлоков, Н.Д. Тихенко // Генетика. – 2009. – Т.45. – С.729–744.
5. Говоров Л. И. Горох. / Л. И.Говоров. Культурная флора СССР. – М.-Л. – 1937. – Т.4. – С.229–336.
6. Даниленко Н.Г. Миры геномов органелл / Н.Г. Даниленко, О.Г. Давыденко. – Минск: Тэхноложя, 2003. – 494С.
7. Кушнир С.Г. Клеточно-инженерный синтез цибридов, содержащих ядро *Nicotiana tabacum* L. и пластиды *Atropa belladonna* L. / С.Г. Кушнир, Л.Р. Шлумуков, Н.Я. Погребняк, Ю.Ю. Глеба // Докл АН СССР. – 1986. – Т.291. – С.1238–1240.
8. Лутков А.Н. Межвидовые гибриды *Pisum humile* Boiss. × *Pisum sativum* L./ А.Н.Лутков // Тр. Всесоюз. Съезда по ген., сел. и семеноводству в Ленинграде. – Л., 1929/30. – С.353–367.
9. Макашева Р. Х. Зерновые бобовые культуры. Часть 1. Горох. / Р. Х. Макашева. Культурная флора СССР. IV. – Л.: Колос, 1979. – 324С.

10. Малахов В.В. Основные этапы эволюции эукариотных организмов. / В.В.Малахов // Палеонтологический Журнал. – 2003. – №6. – С.25–32.
11. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – 4-е изд./ З.П. Паушева. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271С.
12. Першина Л.А. Особенности восстановления фертильности аллоплазматических линий, полученных на основе гибридизации самоопыленного потомка ячменно-пшеничного амфиплоида (*Hordeum vulgare* L. × *Triticum aestivum* L.) с сортами мягкой пшеницы Саратовская 29 и Пиротрикс 28. // Л.А. Першина, Э.П. Девяткина, Н.В. Трубачеева, Л.А. Кравцова, О.Б. Добровольская // Генетика. – 2012. – Т.48. – С.1372–1379.
13. Синявская М.Г. Изменение ДНК хлоропластов и митохондрий при отдаленной гибридизации у злаков. / М.Г. Синявская, Е.А. Аксенова, Л.А. Першина, С.Ф. Коваль, Н.Г. Даниленко, О.Г. Давыденко // Вестник ВОГИС. – 2005. – Т.9. – С.505–511.
14. Синявская М.Г. Наследование оргanelльных ДНК у гибридов ржи (*Secale cereale* L.) и тритикале (× *Triticale* Thch.). / М.Г. Синявская, Н.Г. Даниленко, О.Г. Давыденко, Н.М. Ермишина, Н.Б. Белько, И.А. Гордей // Генетика. – 2004. – Т.40. – С.218–223.
15. Ядрихинский А.К. Ядерно-цитоплазматический конфликт при скрещивании подвидов гороха контролируется аллелями ядерного гена третьей группы сцепления. / А.К. Ядрихинский, В.С. Богданова // Докл. Акад. Наук. – 2011. – Т.441. – С.426–429.
16. Abe K. Arabidopsis RAD51C gene is important for homologous recombination in meiosis and mitosis. / K. Abe, K. Osakabe, S. Nakayama, M. Endo, A. Tagiri, S. Todoriki, H. Ichikawa, S. Toki // Plant Physiol. – 2005. – V.139. – P.896–908.
17. Aksyonova E. Heteroplasmy and paternally oriented shift of the organellar DNA composition in barley–wheat hybrids during backcrosses with wheat

- parents. / E. Aksyonova, M. Sinyavskaya, N. Danilenko, L. Pershina, C. Nakamura, O. Davydenko // *Genome*. – 2005. – V.48. – P.761–769.
18. Altschul S.F. Basic local alignment search tool. / S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman // *J. Mol. Biol.* – 1990. – V.215. – P.403–410.
19. Anderson J.A. Interspecific nuclear-cytoplasmic compatibility controlled by genes on group 1 chromosomes in durum wheat. / J.A. Anderson, S.S. Maan // *Genome*. – 1995. – V.38. – P.803–808.
20. Aryamanesh N. Identification of genome regions controlling cotyledon, pod wall/seed coat and pod wall resistance to pea weevil through QTL mapping. / N. Aryamanesh, Y. Zeng, O. Byrne, D.C. Hardie, A.M. Al-Subhi, T. Khan, K.H.M. Siddique, G. Yan // *Theor. Appl. Genet.* – 2014. – V.127. – P.489–497.
21. Asakura N. RAPD markers linked to the nuclear gene from *Triticum timopheevii* that confers compatibility with *Aegilops squarrosa* cytoplasm on alloplasmic durum wheat. / N. Asakura, C. Nakamura, I. Ohtsuka // *Genome*. – 1997, a. – V.40. – P.201–210.
22. Asakura N. A nuclear compatibility gene, *Ncc-tmp*, of *Triticum timopheevii* for the cytoplasm of *Aegilops squarrosa*. / N. Asakura, C. Nakamura, I. Ohtsuka // *Genes Genet. Syst.* – 1997, b. – V.72. – P.71–78.
23. Asakura N. Homoeoallelic gene *Ncc-tmp* of *Triticum timopheevii* conferring compatibility with the cytoplasm of *Aegilops squarrosa* in the tetraploid wheat nuclear background. / N. Asakura, C. Nakamura, I. Ohtsuka // *Genome*. – 2000. – V.43. – P. 503–511.
24. Babiychuk E. Alterations in chlorophyll a/b binding proteins in Solanaceae cybrids. / E. Babiychuk, R. Schantz, N. Cherep, J.-H. Weil, Y. Gleba, S. Kushnir // *Mol. Gen. Genet.* – 1995. – V.249. – P.648–654.
25. Ben-Ze'ev N. Species relationships in the genus *Pisum* L. / N. Ben-Ze'ev, D. Zohary // *Israel J. Bot.* – 1973. – V.22. – P.73–91.

26. Bock R. Sense from nonsense: how the genetic information of chloroplasts is altered by RNA editing. / R. Bock // *Biochimie*. – 2000. – V.82. – P.549–557.
27. Bogdanova V.S. Inheritance of organelle DNA markers in a pea cross associated with nuclear-cytoplasmic incompatibility. / V.S. Bogdanova // *Theor. Appl. Genet.* – 2007. – V.114. – P.333–339.
28. Bogdanova V.S. Observation of the phenomenon resembling hybrid dysgenesis in a wild pea subspecies *Pisum sativum* ssp. *elatius*. / V.S. Bogdanova, V.A. Berdnikov // *Pisum Genetics*. – 2001. – 33. – P.5–8.
29. Bogdanova V.S. Genetic analysis of nuclear-cytoplasmic incompatibility in pea associated with cytoplasm of an accession of wild subspecies *Pisum sativum* subsp. *elatius* (Bieb.) Schmahlh. / V.S. Bogdanova, E.R. Galieva, O.E. Kosterin // *Theor. Appl. Genet.* – 2009. – V.118. – P.801–809.
30. Bogdanova V.S. Inheritance and genetic mapping of two nuclear genes involved in nuclear-cytoplasmic incompatibility in peas (*Pisum sativum* L.). / V.S. Bogdanova, E.R. Galieva, A.K. Yadrikhinskiy, O.E. Kosterin // *Theor. Appl. Genet.* – 2012. – V.124. – P.1503–1512.
31. Bogdanova V.S. Wild peas vary in their cross-compatibility with cultivated pea (*Pisum sativum* subsp. *sativum* L.) depending on alleles of a nuclear-cytoplasmic incompatibility locus. / V.S. Bogdanova, O.E. Kosterin, A.K. Yadrikhinskiy // *Theor. Appl. Genet.* – 2014. – V.127. – P.1163–1172.
32. Burrows P.A. Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. / P.A. Burrows, L.A. Sazanov, Z. Svab, P. Maliga, P.J. Nixon // *EMBO J.* – 1998. – V.17. – P.868–876.
33. Burton R.S. Cytonuclear genomic interactions and hybrid breakdown. / R.S. Burton, R.J. Pereira, F.S. Barreto // *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* – 2013. – V.44. – P.281–302.
34. Chapman M.J. Effect of genome-plastome interaction on meiosis and pollen development in *Oenothera* species and hybrids. / M.J. Chapman, D.L. Mulcahy // *Sexual Plant Reproduction*. – 1997. – V.10. – P.288–292.

35. Chase C.D. Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. / C.D. Chase // Trends Genet. – 2007. – V.23. – P.81–90.
36. Chiu W.L. Plastome-genome interactions affect plastid transmission in *Oenothera*. / W.L. Chiu, B.B. Sears // Genetics. – 1993. – V.133. – P.989–997.
37. Clement S.L. Variation among accessions of *Pisum fulvum* for resistance to pea weevil. / S.L. Clement, D.C. Hardie, L.R. Elberson // Crop Sci. – 2002. – V.42. – P.2167–2173.
38. Corriveau J.L. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. / J.L. Corriveau, A.W. Coleman // Am. J. Bot. – 1988. – V.75. – P.1443–1458.
39. Corriveau J.L. Cultivar variability for the presence of plastid DNA in pollen of *Pisum sativum* L.: implications for plastid transmission. / J.L. Corriveau, N.O. Polans, A.W. Coleman // Curr. Genet. – 1989. – V.16. – P.47–51.
40. Crosatti C. Cytoplasmic genome substitution in wheat affects the nuclear-cytoplasmic cross-talk leading to transcript and metabolite alterations. / C. Crosatti, L. Quansah, C. Maré, L. Giusti, E. Roncaglia, S.G. Atienza, L. Cattivelli, A. Fait // BMC Genomics. – 2013. – V.14: 868.
41. Dauborn B. Genome and plastome effects on photosynthesis parameters in *Oenothera* species of differential low-temperature tolerance. / B. Dauborn, W. Brüggemann // Physiologia Plantarum. – 1996. – V.97. – P.79–84.
42. De Martino T. Distorted segregation resulting from pea chromosome reconstructions with alien segments from *Pisum fulvum*. / T. De Martino, A. Errico, A. Lassandro, C. Conicella // J. Hered. – 2000. – V.91. – P.322–325.
43. Dibbayawan T.P. Gamma-tubulin antibody against a plant peptide sequence localises to cell division-specific microtubule arrays and organelles in plants. / T.P. Dibbayawan, J.D. Harper, J. Marc // Micron. – 2001. – V.32. – P.671–678.

44. Dragoeva A. CMS due to tapetal failure in cybrids between *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida*. / A. Dragoeva, I. Atanassov, A. Atanassov // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 1998. – V.55. – P.67–70.
45. Fernie A.R. Natural genetic variation for improving crop quality. / A.R. Fernie, Y. Tadmor, D. Zamir // Curr. Opin. Plant Biol. – 2006. – V.9. – P.196–202.
46. Fondevilla S. Identification of a new gene for resistance to powdery mildew in *Pisum fulvum*, a wild relative of pea. / S. Fondevilla, A.M. Torres, M.T. Moreno, D. Rubiales // Breeding Sci. – 2007. – V.57. – P.181–184.
47. Fondevilla S. Identification of genes differentially expressed in a resistant reaction to *Mycosphaerella pinodes* in pea using microarray technology. / S. Fondevilla, H. Küster, F. Krajinski, J.I. Cubero, D. Rubiales // BMC Genomics. – 2011. – V12: 28.
48. Frohman M.A. On beyond classic RACE (rapid amplification of cDNA ends). / M.A. Frohman // PCR Methods Appl. – 1994. – V.4. – P.s40–58.
49. Glick R. Genetically-programmed chloroplast dedifferentiation as a consequence of plastome-genome incompatibility in *Oenothera*. / R. Glick, B.B. Sears // Plant Physiol. – 1994. – V.106. – P.367–373.
50. Glimelius K. *Nicotiana* cybrids with *Petunia* chloroplasts. / K. Glimelius, H.T. Bonnett // Theor. Appl. Genet. – 1986. – V.72. – P.794–798.
51. Göpel G. Plastomabhängige Pollensterilität bei *Oenothera*. / G. Göpel // Theor. Appl. Genet. – 1970. – V.40.– P.111–116.
52. Green B.R. Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. / B.R. Green // Plant J. – 2011. – V.66. – P.34–44.
53. Greiner S. The complete nucleotide sequences of the five genetically distinct plastid genomes of *Oenothera*, subsection *Oenothera*: I. Sequence evaluation and plastome evolution. / S. Greiner, X. Wang, U. Rauwolf, M.V. Silber, K. Mayer, J. Meurer, G. Haberer, R.G. Herrmann // Nucl. Acids Res. – 2008, a – V.36. – P.2366–2378.
54. Greiner S. The complete nucleotide sequences of the 5 genetically distinct plastid genomes of *Oenothera*, subsection *Oenothera*: II. A microevolutionary

- view using bioinformatics and formal genetic data. / S. Greiner, X. Wang, R.G. Herrmann, U. Rauwolf, K. Mayer, G. Haberer, J. Meurer // *Mol. Biol. Evol.* – 2008, b. – V.25. – P.2019–2030.
55. Greiner S. The role of plastids in plant speciation. / S. Greiner, U. Rauwolf, J. Meurer, R.G. Herrmann // *Mol. Ecol.* – 2011. – V.20. – P.671–691.
56. Hajjar R. The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. / R. Hajjar, T. Hodgkin // *Euphytica.* – 2007. – V.156. – P.1–13.
57. Haldane J.B.S. Inbreeding and linkage. / J.B.S. Haldane, C.H. Waddington // *Genetics.* – 1931. – V.16. – P.357–374.
58. Hassanein A.M. Physiological studies on nuclear-organelle interaction of cybrid plants containing *Solanum nigrum* genome and *Solanum tuberosum* plastome. / A.M. Hassanein, K.A. Fayez, A.M. Ahmed // *Phyton.* – 1998. – V.37. – P.167–179.
59. Herrmann R.G. Eukaryotic genome evolution: Rearrangement and coevolution of compartmentalized genetic information. / R.G. Herrmann, R.M. Maier, C. Schmitz-Linneweber // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* – 2003. – V.358. – P.87–97.
60. Hossain K.G. Radiation hybrid mapping of the species cytoplasm-specific (*scs^{ae}*) gene in wheat. / K.G. Hossain, O. Riera-Lizarazu, V. Kalavacharla, M.I. Vales, S.S. Maan, S.F. Kianian // *Genetics.* – 2004, a. – V.168. – P.415–423.
61. Hossain K.G. Molecular cytogenetic characterization of an alloplasmic durum wheat line with a portion of chromosome 1D of *Triticum aestivum* carrying the *scs^{ae}* gene. / K.G. Hossain, O. Riera-Lizarazu, V. Kalavacharla, M.I. Vales, J.L. Rust, S.S. Maan, S.F. Kianian // *Genome.* – 2004, b. – V.47. – P.206–214.
62. Howe C.J. The origin of plastids. / C.J. Howe, A.C. Barbrook, R.E. Nisbet, P.J. Lockhart, A.W. Larkum // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* – 2008. – V.363. – P.2675–2685.

63. Jansen R.K. Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences. / R.K. Jansen, L.A. Raubeson, J.L. Boore, C.W. dePamphilis, T.W. Chumley, R.C. Haberle, S.K. Wyman, A.J. Alverson, R. Peery, S.J. Herman, H.M. Fourcade, J.V. Kuehl, J.R. McNeal, J. Leebens-Mack, L. Cui // *Methods Enzymol.* – 2005. – V.395. – P.348–384.
64. Johnson N.A. Sixty years after ‘Isolating mechanisms, evolution, and temperature’: Muller’s legacy. / N.A. Johnson // *Genetics.* – 2002. – V.161. – P.939–944.
65. Johnson N.A. Hybrid incompatibility genes: remnants of a genomic battlefield? / N.A. Johnson // *Trends Genet.* – 2010. – V.26. – P.317–325.
66. Kaló P. Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. / P. Kaló, C. Gleason, A. Edwards, J. Marsh, R.M. Mitra, S. Hirsch, J. Jakab, S. Sims, S.R. Long, J. Rogers, G.B. Kiss, J.A. Downie, G.E. Oldroyd // *Science.* – 2005. – V.308. – P.1786–1789.
67. Keeling P.J. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. / P.J. Keeling // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* – 2010. – V.365. – P.729–748.
68. Kihara H. Substitution of nucleus and its effects on genome manifestations. / H. Kihara // *Cytologia.* – 1951. – V.16. – P.177–193.
69. Kneen B.E. Non-nodulating Mutants of *Pisum sativum* (L.) cv. Sparkle. / B.E. Kneen, N.F. Weeden, T.A. LaRue // *J. Hered.* – 1994. – V.85. – P.129–133.
70. Kofler W. Mutagenesis of the genes encoding subunits A, C, H, I, J and K of the plastid NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase in tobacco by polyethylene glycol-mediated plastome transformation. / W. Kofler, H.U. Koop, G. Wanner, K. Steinmüller // *Mol. Gen. Genet.* – 1998. – V.258. – P.166–173.
71. Kosterin O.E. Relationship of wild and cultivated forms of *Pisum* L. as inferred from an analysis of three markers, of the plastid, mitochondrial and nuclear genomes. / O.E. Kosterin, V.S. Bogdanova // *Genet. Resour. Crop Evol.* – 2008. – V.55. – P.735–755.

72. Kosterin O.E. Reciprocal compatibility within the genus *Pisum* L. as studied in F1 hybrids: 1. Crosses involving *P. sativum* L. subsp. *sativum*. / O.E.Kosterin, V.S. Bogdanova // Genet. Resour. Crop Evol. – 2015. – V.62. – P.691–709.
73. Kushnir S. Functional cybrid plants possessing a *Nicotiana* genome and an *Atropa* plastome. / S.G. Kushnir, L.R. Schlumukov, N.J. Pogrebnyak, S. Berger, Y. Gleba // Mol. Gen. Genet. – 1987. – V.209. – P.159–163.
74. Kushnir S. Nucleo-cytoplasmic incompatibility in cybrid plants possessing an *Atropa* genome and a *Nicotiana* plastome. / S. Kushnir, E. Babychuk, M. Bannikova, V. Momot, I. Komarnitsky, N. Cherep, Y. Gleba // Mol. Gen. Genet. – 1991. – V.225. – P.225–230.
75. Lander E.S. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. / E.S. Lander, P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln, L. Newburg // Genomics. – 1987. – V.1. – P.174–181.
76. Lilienfeld F.A. Plastid behavior in reciprocally different crosses between two races of *Medicago truncatula* Gaertn. / F.A. Lilienfeld // Seiken Zihō. – 1962. – V.13. – P.3–38.
77. Lilienfeld F.A. A case of malfunctioning plastids in *Medicago truncatula* Gaertn. / F.A. Lilienfeld // Jap. J. Genet. – 1965. – V.40. – P.261–274.
78. Lu Y. Genetic and cellular analysis of cross-incompatibility in *Zea mays*. / Y. Lu, J.L. Kermicle, M.M. Evans // Plant Reprod. – 2014. – V.27. – P.19–29.
79. Maan S. Transfer of a species cytoplasm specific (*scs*) gene of *Triticum timopheevii* Zhuk to *T. turgidum*. / S. Maan // Genome. – 1992, a. – V.35. – P.238–243.
80. Maan S. The *scs* and *Vi* genes correct a syndrome of cytoplasmic effects in alloplasmic durum wheat. / S. Maan // Genome. – 1992, b. – V.35. – P.780–787.
81. Maan S. A gene for embryo–endosperm compatibility and seed viability in alloplasmic *Triticum turgidum*. / S. Maan // Genome. – 1992, c. – V.35. – P.772–779.

82. Maheshwari S. The genetics of hybrid incompatibilities. / S. Maheshwari, D.A. Barbash // *Annu. Rev. Genet.* – 2011. – V.45. – P.331–355
83. Matsushima R. The model plant *Medicago truncatula* exhibits biparental plastid inheritance. / R. Matsushima, Y. Hu, K. Toyoda, Sodmergen, W. Sakamoto // *Plant Cell Physiol.* – 2008. – V.49. – P.81–91.
84. Maxted N. Peas (*Pisum L.*). / N. Maxted, M. Ambrose // *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture 39: N.Maxted and S.J. Bennett (eds.).* – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. – 2001. – P.181–190.
85. McCouch S. Diversifying selection in plant breeding. / S. McCouch // *PLoS Biol.* – 2004. – V.2. – e347.
86. Michalak de Jimenez M.K. A radiation hybrid map of chromosome 1D reveals synteny conservation at a wheat speciation locus. / M.K. Michalak de Jimenez, F.M. Bassi, F. Ghavami, K. Simons, R. Dizon, R.I. Seetan, L.M. Alnemer, A.M. Denton, M. Dođramacı, H. Šimková, J. Doležel, K. Seth, M.C. Luo, J. Dvorak, Y.Q. Gu, S.F. Kianian // *Funct. Integr. Genomics.* – 2013. – V.13. – P.19–32.
87. Milne I. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. / I. Milne, G. Stephen, M. Bayer, P.J.A. Cock, L. Pritchard, L. Cardle, P.D. Shaw, D. Marshall // *Briefings in Bioinformatics.* – 2013. – V.14. – P.193–202.
88. Moffett A.A. Genetical studies in Acacias. I. The estimation of natural crossing in black wattles. / A.A. Moffett // *Heredity.* – 1956. – V.10. – P.57–67.
89. Moffett A.A. Genetical studies in Acacias. III. Chlorosis studies in interspecific hybrids. / A.A. Moffett // *Heredity.* – 1965. – V.20. – P.609–620.
90. Mráček J. Investigation of genome-plastome incompatibility in *Oenothera* and *Passiflora*. / J. Mráček // PhD thesis. – Munich: Ludwig-Maximilians-University. – 2005. – 118 P.

91. Mukai Y. Genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops*. IV. Distribution of the cytoplasm inducing variegation in common wheat. / Y. Mukai, K. Tsunewaki // *Theor. Appl. Genet.* – 1976 – V.48. – P.9–16.
92. Murata M. Origin and molecular structure of a midget chromosome in a common wheat carrying rye cytoplasm. / M. Murata, N. Nakata, Y. Yasumuro // *Chromosoma.* – 1992. – V.102. – P.27–31.
93. Ohtsuka I. Genetic differentiation in wheat genomes in relation to compatibility with *Aegilops squarrosa* cytoplasm and application to phylogeny of polyploid wheats. / I. Ohtsuka // *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* – 1991. – V.65. – part 2. – P.127–198.
94. Orr H.A. Dobzhansky, Bateson, and the genetics of speciation. / H.A. Orr // *Genetics.* – 1996. – V.144. – P.1331–1335.
95. Ouyang Y. Hybrid sterility in plant: stories from rice. / Y. Ouyang, Y.-G. Liu, Q. Zhang // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2010. – V.13. – P.186–192.
96. Perl A. Nuclear-organelle interaction in *Solanum*: interspecific cybridizations and their correlation with a plastome dendrogram. / A. Perl, D. Aviv, E. Galun // *Mol. Gen. Genet.* – 1991. – V.228. – P.193–200.
97. Peter S. Consequences of intergeneric chloroplast transfers on photosynthesis and sensitivity to high light. / S. Peter, A. Spang, P. Medgyesy, C. Schäfer // *Aust. J. Plant Physiol.* – 1999. – V.26. – P.171–177.
98. Polans N.O. Plastid inheritance in *Pisum sativum* L. / N.O. Polans, J.L. Corriveau, A.W. Coleman // *Curr. Genet.* – 1990. – V.18. – P.477–480.
99. Przywara L. Interspecific hybridization of *Trifolium repens* with *T. hybridum* using *in ovulo* embryo and embryo culture. / L. Przywara, D.W.R. White, P.M. Sanders, D. Maher // *Ann. Bot.* – 1989. – V.64. – P.613–624.
100. Quail M.A. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. / M.A. Quail, M. Smith, P. Coupland, T.D. Otto, S.R. Harris, T.R. Connor, A. Bertoni, H.P. Swerdlow, Y. Gu // *BMC Genomics.* – 2012. – V.13. – 341.

101. Rauwolf U. Mapping of genomes and plastomes of subsection *Oenothera* with molecular marker technologies. / U. Rauwolf // PhD Thesis. – 2008. – Munich: Ludwig-Maximilians-University. – 164 P.
102. Renner O. Zur Kenntniss des Pollenkompelxes flectens der *Oenothera atrovirens* Sh. et Bartl. / O. Renner // Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre. – 1943. – V.81. – P.391–483. (цит. по Greiner et al., 2011).
103. Reyes-Prieto A. The origin and establishment of the plastid in algae and plants. / A. Reyes-Prieto, A.P. Weber, D. Bhattacharya // Annu. Rev. Genet. – 2007. – V.41. – P.147–168.
104. Rieseberg L.H. Speciation genes in plants. / L.H. Rieseberg, B.K. Blackman // Ann. Bot. – 2010. – V.106. – P.439–455.
105. Sato Y. Mendel's green cotyledon gene encodes a positive regulator of the chlorophyll-degrading pathway. / Y. Sato, R. Morita, M. Nishimura, H. Yamaguchi, M. Kusaba // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – V.104. – P.14169–14174.
106. Schmitz-Linneweber C. The plastid chromosome of *Atropa belladonna* and its comparison with that of *Nicotiana tabacum*: the role of RNA editing in generating divergence in the process of plant speciation. / C. Schmitz-Linneweber, R. Regel, T.G Du, H. Hupfer, R.G. Herrmann, R.M. Maier // Mol. Biol. Evol. – 2002. – V.19. – P.1602–1612.
107. Schmitz-Linneweber C. Pigment deficiency in nightshade/tobacco cybrids is caused by the failure to edit the plastid ATPase alpha-subunit mRNA. / C. Schmitz-Linneweber, S. Kushnir, E. Babiychuk, P. Poltnigg, R.G. Herrmann, R.M. Maier // Plant Cell. – 2005. – V.17. – P.1815–1828.
108. Schötz F. Periodische Ausbleichungserscheinungen des Laubes bei *Oenothera*. / F. Schötz // Planta. – 1958. – V.52. – P.351–392.
109. Seth K. High resolution mapping of the *scs^{ti}* gene in durum wheat and conserved colinearity across three grass genomes: wheat, rice and

Brachypodium. / K. Seth // Ph.D. Thesis. – North Dakota: North Dakota State University. – 2009. – 90 P.

110. Sharma S. Prebreeding for diversification of primary gene pool and genetic enhancement of grain legumes. / S. Sharma, H.D. Upadhyaya, R.K. Varshney, C.L. Gowda // *Front. Plant Sci.* – 2013. – V.4. – 309.
111. Shimamura M. Gamma-tubulin in basal land plants: characterization, localization, and implication in the evolution of acentriolar microtubule organizing centers. / M. Shimamura, R.C. Brown, B.E. Lemmon, T. Akashi, K. Mizuno, N. Nishihara, K. Tomizawa, K. Yoshimoto, H. Deguchi, H. Hosoya, T. Horio, Y. Mineyuki // *Plant Cell.* – 2004. – V.16. – P.45–59.
112. Simons K.J. Detailed mapping of the species cytoplasm-specific (*scs*) gene in durum wheat. / K.J. Simons, S.B. Gehlhar, S.S. Maan, S.F. Kianian // *Genetics.* – 2003. – V.165. – P.2129–2136.
113. Stinson H.T. Extranuclear barriers to interspecific hybridization between *Oenothera hookeri* and *Oenothera argillicola*. / H.T. Stinson // *Genetics.* – 1960. – V.45. – P.819–839.
114. Stubbe W. Extrem disharmonische Genom-Plastom-Kombinationen und väterliche Plastidenvererbung bei *Oenothera*. / W. Stubbe // *Z. Vererbungslehre.* – 1963. – V.94. – P.392–411.
115. Stubbe W. *Oenothera* – An ideal system for studying the interaction of genome and plastome. / W. Stubbe // *Plant Molecular Biology Reporter.* – 1989. – V.7. – P.245–257.
116. Stubbe W. Inactivation of pollen and other effects of genome-plastome incompatibility in *Oenothera*. / W. Stubbe, E. Steiner // *Plant Syst. Evol.* – 1999. – V.217. – P.259–277.
117. Stubbe W. Genetische Analyse des Zusammenwirkens von Genom und Plastom bei *Oenothera*. / W. Stubbe // *Zeitschrift für Vererbungslehre.* – 1959. – V.90. – P.288–298.

118. Tanksley S.D. Seed banks and molecular maps:unlocking genetic potential from the wild. / S.D. Tanksley, S.R. McCouch // *Science*. – 1997. – V.277. – P.1063–1066.
119. Thanh N.D. Limited chloroplast gene transfer via recombination overcomes plastome-genome incompatibility between *Nicotiana tabacum* and *Solanum tuberosum*. / N.D. Thanh, P. Medgyesy // *Plant Mol. Biol.* – 1989. – V.12. – P.87–93.
120. Thanh N.D. Intertribal chloroplast transfer by protoplast fusion between *Nicotiana tabacum* and *Salpiglossis sinuata*. / N.D. Thanh, A. Pay, M.A. Smith, P. Medgyesy, L. Marton // *Mol. Gen. Genet.* – 1988. – V.213. – P.186–190.
121. Tong L. Structure and function of biotin-dependent carboxylases. / L. Tong // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2013. – V.70 – P.863–891.
122. Tsunewaki K. Genome-plasmon interactions in wheat. / K. Tsunewaki // *Jpn. J. Genet.* – 1993. – V.68. – P.1–34.
123. Tsunewaki K. Plasmon analysis of *Triticum* (wheat) and *Aegilops*. 1. Production of alloplasmic common wheats and their fertilities. / K. Tsunewaki, G.-Z. Wang, Y. Matsuoka // *Genes Genet. Syst.* – 1996. – V.71. – P.293–311.
124. Ureshino K. Relationship between nuclear genome construction and the plastome-genome incompatibility of progenies from intra- and inter-ploid cross of evergreen azaleas × *Rhododendron japonicum* f. *flavum*. / K. Ureshino, T. Abe, M. Akabane // *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* – 2010. – V.79. – P.91–96.
125. Ureshino K. Appearance of albino seedlings and ptDNA inheritance in interspecific hybrids of azalea. / K. Ureshino, I. Miyajima, Y. Ozaki, N. Kobayashi, A. Michishita, M. Akabane // *Euphytica*. – 1999. – V.110. – P.61–66.

126. van der Meer J.P. Hybrid chlorosis in interspecific crosses of *Oenothera*: polygenic inheritance of the nuclear component. / J.P. van der Meer // *Canad. J. Genet. Cytol.* – 1974. – V.16. – P.193–201.
127. Weeden N.F. List of genes postulated to be on pea LGIII between *Fed1* and just distal to *Egl1*. / N.F. Weeden, M.D. Moffett // *Pisum Genetics.* – 2007. – V.39. – P.45–63.
128. Weeden N.F. A consensus linkage map for *Pisum sativum*. // N.F. Weeden, T.H.N. Ellis, G.M. Timmerman-Vaughan, W.K. Swiecicki, S.M. Rozov, V.A. Berdnikov // *Pisum Genetics.* – 1998. – V.30. – P.1–4.
129. Wroth J.M. Possible role for wild genotypes of *Pisum* spp. to enhance ascochyta blight resistance in pea. / J.M. Wroth // *Aust. J. Exp. Agric.* – 1998. – V.38. – P.469–479.
130. Yamagata Y. Mitochondrial gene in the nuclear genome induces reproductive barrier in rice. // Y. Yamagata, E. Yamamoto, K. Aya, K.T. Win, K. Doi, Sobrizal, T. Ito, H. Kanamori, J. Wu, T. Matsumoto, M. Matsuoka, M. Ashikari, A. Yoshimura // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – V.107. – P.1494–1499.
131. Yao J.-L. Multiple gene control of plastome-genome incompatibility and plastid DNA inheritance in interspecific hybrids of *Zantedeschia*. / J.-L. Yao, D. Cohen // *Theor. Appl. Genet.* – 2000. – V.101. – P.400–406.
132. Yao J.L. Plastid DNA inheritance and plastome-genome incompatibility in interspecific hybrids of *Zantedeschia* (Araceae). / J.L. Yao, D. Cohen, R.E. Rowland // *Theor. Appl. Genet.* – 1994. – V.88. – P.255–260.
133. Yao J.L. Interspecific albino and variegated hybrids in the genus *Zantedeschia*. / J.L. Yao, D. Cohen, R.E. Rowland // *Plant Sci.* – 1995. – V.109. – P.199–206.
134. Zubko M.K. Novel 'homeotic' CMS patterns generated in *Nicotiana* via cybridization with *Hyoscyamus* and *Scopolia*. / M.K. Zubko, E.I. Zubko, Y.V. Patskovsky, O.A. Khvedynich, J. Fisahn, Y. Gleba, O. Schieder // *J. Exp. Bot.* – 1996. – V.47. – P.1101–1110.

135. Zubko M.K. Extensive developmental and metabolic alterations in cybrids *Nicotiana tabacum* (+*Hyoscyamus niger*) are caused by complex nucleo-cytoplasmic incompatibility. / M.K. Zubko, E.I. Zubko, A.V. Ruban, K. Adler, H.P. Mock, S. Misera, Y.Y. Gleba, B. Grimm // *Plant J.* – 2001. – V.25. – P.627–639.
136. Zubko M.K. Self-fertile cybrids *Nicotiana tabacum* (+ *Hyoscyamus aureus*) with a nucleo-plastome incompatibility. / M.K. Zubko, E.I. Zubko, Y. Gleba // *Theor. Appl. Genet.* – 2002. – V.105. – P.822–828.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Богданова В.С., Костерин О.Э. Случай аномального наследования хлоропластов в скрещиваниях посевного гороха с участием одной из диких форм. // Докл. Акад. Наук – 2006. – Т.406. – 256–259.
2. Bogdanova V.S. Inheritance of organelle DNA markers in a pea cross associated with nuclear-cytoplasmic incompatibility. // Theor. Appl. Genet. – 2007. – М.114. – Р.333–339.
3. Kosterin O.E., Bogdanova V.S. Relationship of wild and cultivated forms of *Pisum L.* as inferred from an analysis of three markers, of the plastid, mitochondrial and nuclear genomes. // Genet. Resour. Crop Evol. – 2008. – V.55. – Р.735–755.
4. Богданова В.С., Галиева Э.Р. Нарушения мейоза как проявление ядерно-цитоплазматической несовместимости при скрещивании подвидов посевного гороха. // Генетика. – 2009. – Т. 45. – С.711–716.
[Bogdanova V.S., Galieva E.R. Meiotic Abnormalities as Expression of Nuclear–Cytoplasmic Incompatibility in Crosses of *Pisum sativum* Subspecies. // Russian Journal of Genetics. – 2009. – V.45. – P.623–627.]
5. Bogdanova V.S., Galieva E.R., Kosterin O.E. Genetic analysis of nuclear-cytoplasmic incompatibility in pea associated with cytoplasm of an accession of wild subspecies *Pisum sativum* subsp. *elatius* (Bieb.) Schmahlh. // Theor. Appl. Genet. – 2009. – V.118. – P.801–809.
6. Kosterin O.E., Zaytseva O.O., Bogdanova V.S., Ambrose M. New data on three molecular markers from different cellular genomes in Mediterranean accessions reveal new insights into phylogeography of *Pisum sativum L.* subsp. *elatuis* (Beib.) Schmahlh. // Genet. Resour. Crop Evol. – 2010. – V.57. – P.733–739.
7. Ядрихинский А.К., Богданова В.С. Ядерно-цитоплазматический конфликт при скрещивании подвидов гороха контролируется аллелями ядерного гена третьей группы сцепления. // Докл. Акад. Наук. – 2011. – Т. 441. – С.426–429.

[Yadrikhinskiy A.K. Bogdanova V.S. Nuclear-cytoplasm conflict in crosses of pea subspecies is controlled by alleles of a nuclear gene on Linkage Group III. // Doklady Biological Sciences. – 2011. – V.441. – P.392–395.]

8. Bogdanova V.S., Galieva E.R., Yadrikhinskiy A.K., Kosterin O.E. Inheritance and genetic mapping of two nuclear genes involved in nuclear-cytoplasmic incompatibility in peas (*Pisum sativum* L.). // Theor. Appl. Genet. – 2012. – V.124. – 1503–1512.

9. Zaytseva O.O., Bogdanova V.S., Kosterin O.E. Phylogenetic reconstruction at the species and intraspecies levels in the genus *Pisum* (L.) (peas) using a histone H1 gene. // Gene. – 2012. – V.504. – P.192–202.

10. Bogdanova V.S., Kosterin O.E., Yadrikhinskiy A.K. Wild peas vary in their cross-compatibility with cultivated pea (*Pisum sativum* subsp. *sativum* L.) depending on alleles of a nuclear-cytoplasmic incompatibility locus. // Theor. Appl. Genet. – 2014. – V.127. – P.1163–1172.

11. Kosterin O.E., Bogdanova V.S. Efficiency of hand pollination in different pea (*Pisum*) species and subspecies. // Ind. J. Genet. Plant Breed. – 2014. – V.74. – P.50–55.

12. Костерин О.Э., Богданова В.С. Стадия развития цветка, оптимальная для искусственного опыления, варьирует в роде Горох (*Pisum* L.). // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18 – С. 478–485.

13. Kosterin O.E., Bogdanova V.S. Reciprocal compatibility within the genus *Pisum* L. as studied in F₁ hybrids: 1. Crosses involving *P. sativum* L. subsp. *sativum*. // Genet. Resour. Crop Evol. – 2015. – V. 62. – P. 691–709.

14. Bogdanova V.S., Zaytseva O.O., Mglinets A.V., Shatskaya N.V., Kosterin O.E., Vasiliev G.V. Nuclear-cytoplasmic conflict in pea (*Pisum sativum* L.) is associated with nuclear and plastidic candidate genes encoding acetyl-CoA carboxylase subunits. // PLoS One. – 2015. – 10(3):e0119835.

15. Zaytseva O.O., **Bogdanova V.S.**, Mglinets A.V., Kosterin O.E. Refinement of the collection of wild peas (*Pisum* L.) and search for the area of pea

domestication with a deletion in the plastidic psbA-trnH spacer. // Genet. Resour. Crop Evol. - 2016. - doi:10.1007/s10722-016-0446-4.

Публикации в журналах, не входящих в список ВАК:

1. Bogdanova V.S., Kosterin O.E. A chloroplast DNA marker frequently found in wild peas. // *Pisum Genetics*. – 2005, – V.37. – P.40–42.
2. Bogdanova V.S., Kosterin O.E. A mitochondrial DNA marker frequently found in wild peas. // *Pisum Genetics*. – 2006, – V.38. – P.1–2.
3. Bogdanova V.S., Kosterin O.E. Hybridization barrier between *Pisum fulvum* Sibth. et Smith and *P. sativum* L. is partly due to nuclear-chloroplast incompatibility. // *Pisum Genetics*. – 2007. – V.39. – P.8–9.
4. Bogdanova V.S., Yadrikhinskiy A.K. Mapping the st locus in respect to three molecular markers on Linkage Group III. // *Pisum Genetics*. – 2010. – V.42, P.41–42.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. Отличия пластидных геномов, совместимых (721, J11794) и несовместимых (ВИР320, L100) с ядерным геном *Scs1* культурной линии WL1238, от пластидного генома WL1238. Зарегистрированы у указанных линий.

IG – межгенный спейсер, АК – аминокислота

| N | позиция в пластидном геноме WL1238 | Отличие | Район | Категория | Аминокислота | 320 | L100 | 721 | 1794 |
|----|------------------------------------|----------------|----------------|--------------|--------------|-----|------|-----|------|
| 1 | 126 | вставка 8 п.о. | IG trnH – psbA | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 2 | 140 | T>A | IG trnH – psbA | некодирующий | | | | | 1794 |
| 3 | 618 | G>T | psbA | синонимичная | R | 320 | L100 | 721 | |
| 4 | 1500 | T>A | IG psbA – trnK | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 5 | 1506 | A>C | IG psbA – trnK | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 6 | 3000 | A>C | matK | АК замена | F>L | | | 721 | |
| 7 | 3275 | C>T | matK | АК замена | D>N | | L100 | | |
| 8 | 3884 | T>C | trnK, интрон 2 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 9 | 4089 | G>T | trnK, интрон 2 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 10 | 4331 | G>T | IG trnK – rbcL | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 11 | 4363 | A>C | IG trnK – rbcL | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 12 | 4459 | A>G | IG trnK – rbcL | некодирующий | | 320 | | | |
| 13 | 4564 | C>A | IG trnK – rbcL | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 14 | 4579 | вставка 4 п.о. | IG trnK – rbcL | некодирующий | | | | 721 | |

| | | | | | | | | | |
|----|------------------|-----------------------------------|----------------|--------------|-----|-----|--------|-----|------|
| 15 | 4586 | T>G | IG trnK – rbcL | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 16 | 4587 | T>A | IG trnK – rbcL | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 17 | 4588 | C>A | IG trnK – rbcL | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 18 | 5562 | G>T | rbcL | синонимичная | L | 320 | | | |
| 19 | 5748 | A>G | rbcL | синонимичная | R | 320 | L100 | 721 | |
| 20 | 6727 | C>A | IG rbcL – atpB | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 21 | 6792 - 6808 | Пропуск в сборке L100 17 п.о. | IG rbcL – atpB | некодирующий | | | L100 | | |
| 22 | 6796 | вставка 2 п.о. | IG rbcL – atpB | некодирующий | | | | | 1794 |
| 23 | 6800 | C>G | IG rbcL – atpB | некодирующий | | | | 721 | |
| 24 | 7004 | A>C | atpB | АК замена | N>H | 320 | L100 | 721 | |
| 25 | 7485 | G>A | atpB | АК замена | R>K | 320 | L100 | 721 | |
| 26 | 7684 | T>C | atpB | синонимичная | S | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 27 | 9406 | C>A | trnV, интрон | некодирующий | | 320 | | | |
| 28 | 9592 | вставка G | trnV, интрон | некодирующий | | | L100 ? | | |
| 29 | 11924 | делеция A | IG ndhJ – trnF | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 30 | 11953 | G>T | IG ndhJ – trnF | некодирующий | | | | 721 | |
| 31 | 12027 | вставка 6 п.о. | IG ndhJ – trnF | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 32 | 12063 | вставка 4 п.о. | IG ndhJ – trnF | некодирующий | | | | | 1794 |
| 33 | 12150 | A>G | IG ndhJ – trnF | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 34 | 12625 | C>A | IG trnF – trnL | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 35 | 13260 | A>T | IG trnL – trnT | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 36 | 13359 | G>T | IG trnL – trnT | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 37 | 13820 | A>T | IG trnL – trnT | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 38 | 13845 | G>T | IG trnL – trnT | некодирующий | | | | 721 | |
| 39 | 13829 - 14224 | Пропуск в сборке L100 396 п.о. | IG trnL – trnT | некодирующий | | | L100 | | |
| 40 | 13833 - | Пропуск в сборке 320 | IG trnL – trnT | некодирующий | | 320 | | | |

| | | | | | | | | | |
|----|------------------|---------------------------------|----------------|--------------|---|-----|------|-----|------|
| | 14090 | 258 п.о. | | | | | | | |
| 41 | 13920 - 13983 | Пропуск в сборке 721 64 п.о. | IG trnL – trnT | некодирующий | | | | 721 | |
| 42 | 13941 | C>A | IG trnL – trnT | некодирующий | | | | | 1794 |
| 43 | 14092 – 14095 | делеция 4 п.о. | IG trnL – trnT | некодирующий | | | | 721 | 1794 |
| 44 | 14133 | G>T | IG trnL – trnT | некодирующий | | 320 | | | |
| 45 | 14147 | вставка 24 п.о. | IG trnL – trnT | некодирующий | | | | 721 | |
| 46 | 14147 | вставка 27 п.о. | IG trnL – trnT | некодирующий | | | | | 1794 |
| 47 | 14351 | G>T | IG trnL – trnT | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 48 | 15764 | G>T | IG rps4 – trnS | некодирующий | | 320 | L100 | | |
| 49 | 15965 | G>A | IG trnS – ycf3 | некодирующий | | | | 721 | |
| 50 | 15987 – 16001 | делеция 15 п.о. | IG trnS – ycf3 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 51 | 16324 | G>T | ycf3, интрон 1 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 52 | 16511 | G>C | ycf3, интрон 1 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 53 | 16846 | T>G | ycf3, интрон 1 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 54 | 17700 | A>G | ycf3, интрон 2 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 55 | 19141 | C>A | IG psaC – ndhD | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 56 | 19868 | G>T | ndhD | синонимичная | L | 320 | L100 | 721 | |
| 57 | 20411 | A>C | ndhD | синонимичная | I | 320 | L100 | 721 | |
| 58 | 20651 | C>T | ndhD | синонимичная | P | 320 | L100 | 721 | |
| 59 | 20727 | C>G | IG ndhD – trnI | некодирующий | | | | | 1794 |
| 60 | 20957 – 21320 | делеция 364 п.о. | IG ndhD – trnI | некодирующий | | | | | 1794 |
| 61 | 21310 – 21549 | делеция 240 п.о. | IG ndhD – trnI | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 62 | 21571 – | делеция 5 п.о. | IG ndhD – trnI | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |

| | | | | | | | | | |
|----|------------------|----------------------------------|----------------|--------------|-----|-----|--------|-----|------|
| | 21575 | | | | | | | | |
| 63 | 21712 | A>G | IG ndhD – trnI | некодирующий | | | | 721 | |
| 64 | 21859 | A>C | IG ndhD – trnI | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 65 | 21880 | G>C | IG ndhD – trnI | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 66 | 22272 | T>G | IG ndhD – trnI | некодирующий | | 320 | L100 | | |
| 67 | 22500 – 22509 | Пропуск в сборке L100 10 п.о. | IG trnI – ycf2 | некодирующий | | | L100 | | |
| 68 | 22552 | C>A | IG trnI – ycf2 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 69 | 23003 | T>G | ycf2 | АК замена | N>K | 320 | L100 | 721 | |
| 70 | 23640 | A>T | ycf2 | АК замена | I>L | 320 | L100 | 721 | |
| 71 | 23802 | C>G | ycf2 | АК замена | Q>E | 320 | L100 | 721 | |
| 72 | 24420 – 24422 | делеция 3 п.о. | ycf2 | делеция 1 АК | K | | L100 ? | | |
| 73 | 24662 | T>C | ycf2 | синонимичная | I | | | | 1794 |
| 74 | 24861 | T>A | ycf2 | АК замена | C>S | 320 | L100 | 721 | |
| 75 | 25239 | A>C | ycf2 | АК замена | I>L | 320 | L100 | | |
| 76 | 25596 | A>G | ycf2 | АК замена | T>A | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 77 | 25675 | T>C | ycf2 | АК замена | L>S | 320 | L100 | 721 | |
| 78 | 25938 | A>C | ycf2 | АК замена | K>Q | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 79 | 26060 | A>G | ycf2 | синонимичная | S | 320 | L100 | 721 | |
| 80 | 26303 | A>G | ycf2 | синонимичная | K | 320 | L100 | 721 | |
| 81 | 26706 | C>A | ycf2 | АК замена | Q>K | 320 | L100 | | |
| 82 | 27204 | C>T | ycf2 | синонимичная | L | 320 | L100 | | |
| 83 | 27392 | A>C | ycf2 | АК замена | E>D | 320 | L100 | 721 | |
| 84 | 27486 | G>A | ycf2 | АК замена | E>K | | | | 1794 |
| 85 | 27510 | G>C | ycf2 | АК замена | A>P | 320 | L100 | 721 | |
| 86 | 28197 | T>G | IG ycf2 – trnG | некодирующий | | 320 | | 721 | |
| 87 | 28241 | T>G | IG ycf2 – trnG | некодирующий | | | | 721 | |

| | | | | | | | | | |
|-----|------------------|----------------------------------|-----------------|--------------|---|-----|------|-----|------|
| 88 | 28242 | A>C | IG ycf2 – trnG | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 89 | 28342 | T>G | IG ycf2 – trnG | некодирующий | | | | | 1794 |
| 90 | 29412 | C>G | IG rps14 – psaB | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 91 | 32191 | G>A | psaA | синонимичная | G | | | | 1794 |
| 92 | 34238 – 34251 | Пропуск в сборке L100 14 п.о. | IG psaA – psbM | некодирующий | | | L100 | | |
| 93 | 34276 – 34282 | делеция 6 п.о. | IG psaA – psbM | некодирующий | | | | 721 | |
| 94 | 34911 | A>T | IG psbM – trnD | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 95 | 35275 – 35279 | делеция 5 п.о. | IG trnD – trnY | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 96 | 35292 | G>C | IG trnD – trnY | некодирующий | | | | | 1794 |
| 97 | 35611 | A>C | IG trnY – trnE | некодирующий | | | | 721 | |
| 98 | 36775 | A>C | IG trnT – psbD | некодирующий | | 320 | L100 | | |
| 99 | 37484 – 37498 | делеция 15 п.о. | IG trnT – psbD | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 100 | 37536 | G>T | IG trnT – psbD | некодирующий | | 320 | | | |
| 101 | 37664 | C>G | IG trnT – psbD | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 102 | 38224 | A>G | psbD | синонимичная | L | 320 | L100 | 721 | |
| 103 | 39119 | C>T | psbC | синонимичная | A | 320 | L100 | | |
| 104 | 40840 | вставка 4 п.о. | IG trnS – psbZ | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 105 | 41028 | C>A | IG trnS – psbZ | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 106 | 41380 | вставка 21 п.о. | IG psbZ – trnL | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 107 | 41495 – 41499 | Пропуск в сборке L100 5 п.о. | IG psbZ – trnL | некодирующий | | | L100 | | |
| 108 | 42539 | G>T | IG trnR – rrn5 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 109 | 46319 | A>C | trnA, интрон | некодирующий | | 320 | L100 | | |
| 110 | 47561 | A>G | trnI, интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |

| | | | | | | | | | |
|-----|------------------|-----------------|-----------------|--------------|-----|-----|------|-----|------|
| 111 | 48035 | G>C | IG trnI – rrn16 | некодирующий | | 320 | L100 | | |
| 112 | 48205 | A>C | IG trnI – rrn16 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 113 | 49781 | T>G | IG rrn16 – trnV | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 114 | 49782 | A>C | IG rrn16 – trnV | некодирующий | | | | | 1794 |
| 115 | 50127 | C>G | IG trnV – rps12 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 116 | 50610 | G>C | IG trnV – rps12 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 117 | 50788 – 50793 | делеция 6 п.о. | IG trnV – rps12 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 118 | 50951 | C>T | IG trnV – rps12 | некодирующий | | | | 721 | |
| 119 | 51078 | C>G | IG trnV – rps12 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 120 | 51816 | T>A | IG rps12 – rps7 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 121 | 53323 | G>C | ndhB, интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 122 | 54879 – 54939 | делеция 61 п.о. | IG ndhB – ycf1 | некодирующий | | | | 721 | |
| 123 | 56274 | C>G | ycf1 | АК замена | H>D | 320 | L100 | 721 | |
| 124 | 56768 | T>G | ycf1 | АК замена | I>M | 320 | L100 | 721 | |
| 125 | 56818 | A>G | ycf1 | АК замена | Q>R | 320 | L100 | 721 | |
| 126 | 56986 | G>A | ycf1 | АК замена | G>D | 320 | L100 | 721 | |
| 127 | 57033 | G>C | ycf1 | АК замена | E>Q | 320 | L100 | 721 | |
| 128 | 57290 | A>T | ycf1 | синонимичная | P | 320 | L100 | 721 | |
| 129 | 57425 | A>G | ycf1 | синонимичная | V | 320 | L100 | 721 | |
| 130 | 57917 | G>T | ycf1 | АК замена | L>F | 320 | L100 | 721 | |
| 131 | 57942 | A>G | ycf1 | АК замена | R>G | | | 721 | |
| 132 | 57955 | T>C | ycf1 | АК замена | L>P | 320 | L100 | | |
| 133 | 58083 | G>T | ycf1 | АК замена | D>Y | | | | 1794 |
| 134 | 58398 | C>A | ycf1 | АК замена | Q>K | 320 | L100 | 721 | |
| 135 | 58450 | G>T | ycf1 | АК замена | S>I | 320 | L100 | 721 | |
| 136 | 58450 | вставка 6 п.о. | ycf1 | вставка 2 АА | YN | 320 | L100 | 721 | |

| | | | | | | | | | |
|-----|------------------|----------------------------------|-----------------|--------------|-----|-----|------|-----|------|
| 137 | 58558 | G>A | ycf1 | АК замена | C>Y | 320 | L100 | | |
| 138 | 59526 | T>G | ycf1 | АК замена | F>V | 320 | L100 | | |
| 139 | 59552 | C>A | ycf1 | АК замена | N>K | 320 | L100 | 721 | |
| 140 | 59764 | A>G | ycf1 | АК замена | Q>R | 320 | L100 | 721 | |
| 141 | 60104 | A>T | ycf1 | синонимичная | F | 320 | L100 | | |
| 142 | 60318 – 60407 | Пропуск в сборке L100 90 п.о. | IG ycf1 – rps15 | некодирующий | | | L100 | | |
| 143 | 60332 – 60368 | Пропуск в сборке 320 37 п.о. | IG ycf1 – rps15 | некодирующий | | 320 | | | |
| 144 | 60341 – 60370 | Пропуск в сборке 721 30 п.о. | IG ycf1 – rps15 | некодирующий | | | | 721 | |
| 145 | 60354 – 60359 | делеция 6 п.о. | IG ycf1 – rps15 | некодирующий | | | | | 1794 |
| 146 | 60483 | T>C | IG ycf1 – rps15 | некодирующий | | | L100 | | |
| 147 | 63446 | G>T | ndhA, интрон | некодирующий | | | | | 1794 |
| 148 | 63451 | C>A | ndhA, интрон | некодирующий | | 320 | | 721 | |
| 149 | 63475 | A>C | ndhA, интрон | некодирующий | | | | | 1794 |
| 150 | 63659 | A>G | ndhA, интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 151 | 63665 | A>C | ndhA, интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 152 | 63792 | A>G | ndhA, интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 153 | 64130 | A>T | ndhA, экзон 2 | АК замена | L>F | 320 | L100 | 721 | |
| 154 | 64373 | G>T | ndhA, экзон 2 | синонимичная | P | | | 721 | |
| 155 | 64680 | G>T | ndhI | синонимичная | G | 320 | L100 | 721 | |
| 156 | 65011 | T>G | ndhI | АК замена | L>V | 320 | L100 | 721 | |
| 157 | 65039 – 65122 | Пропуск в сборке L100 84 п.о. | IG ndhI – ndhG | некодирующий | | | L100 | | |
| 158 | 65151 | A>C | IG ndhI – ndhG | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 159 | 65319 – | делеция 5 п.о. | IG ndhI – ndhG | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |

| | | | | | | | | | |
|-----|------------------|--------------------|--------------------------------|--------------|-----|-----|------|-----|------|
| | 65323 | | | | | | | | |
| 160 | 65421 | A>T | IG ndhI – ndhG | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 161 | 66086 – 66094 | делеция 9 п.о. | IG ndhG – psbE | некодирующий | | | | 721 | |
| 162 | 66781 | A>G | IG psbF – psbL | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 163 | 67326 | A>C | IG psbJ – petA | некодирующий | | | | 721 | |
| 164 | 67412 | G>C | IG psbJ – petA | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 165 | 67477 | T>G | IG psbJ – petA | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 166 | 67575 | G>C | IG psbJ – petA | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 167 | 67789 | вставка 6 п.о. | IG psbJ – petA | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 168 | 68561 | C>A | petA | синонимичная | G | 320 | L100 | 721 | |
| 169 | 68841 | G>A | petA | АК замена | A>V | | | | 1794 |
| 170 | 68928 | C>T | IG petA – cemA | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 171 | 69607 | G>C | cemA | АК замена | T>S | 320 | L100 | 721 | |
| 172 | 69615 | G>T | cemA | АК замена | F>L | | | | 1794 |
| 173 | 69647 | G>T | cemA | АК замена | H>N | 320 | L100 | 721 | |
| 174 | 69751 | T>G | cemA | АК замена | E>A | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 175 | 69871 | C>A | IG cemA – ycf4 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 176 | 70013 | T>C | ycf4 | псевдоген | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 177 | 70411 | C>T | ycf4 | псевдоген | | 320 | L100 | 721 | |
| 178 | 70419 | T>A | ycf4 | псевдоген | | | | 721 | |
| 179 | 70512 | делеция T | ycf4 | псевдоген | | 320 | L100 | 721 | |
| 180 | 70707 | C>A | IG psaI – accD | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 181 | 70787 – 70815 | делеция 29 п.о. | IG psaI – accD | некодирующий | | | | | 1794 |
| 182 | 70816 – 74257 | инверсия 3442 п.о. | IG psaI–accD – IG psbI–trnS | некодирующий | | | | | 1794 |
| 183 | 70818 | C>T | IG psaI – accD | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |

| | | | | | | | | | |
|-----|------------------|------------------|------|---------------|-----------------|-----|------|-----|------|
| 184 | 70876 | T>G | accD | Stop > 8 АК | SNWTE NEN | | | | 1794 |
| 185 | 71009 | C>G | accD | АК замена | E>Q | 320 | L100 | | |
| 186 | 71304 | T>G | accD | синонимичная | I | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 187 | 71464 | T>G | accD | АК замена | Q>P | 320 | L100 | 721 | |
| 188 | 71480 | вставка 9 п.о. | accD | вставка 3 АК | EEE | | | 721 | |
| 189 | 71480 | вставка 3 п.о. | accD | вставка 1 АК | Q | 320 | | | |
| 190 | 71480 | вставка 3 п.о. | accD | вставка 1 АК | E | | L100 | | |
| 191 | 71525 | G>T | accD | АК замена | Q>K | 320 | L100 | 721 | |
| 192 | 71526 | A>C | accD | АК замена | N>K | 320 | L100 | | |
| 193 | 71540 | C>G | accD | АК замена | E>Q | 320 | L100 | | |
| 194 | 71548 | G>C | accD | АК замена | P>R | 320 | L100 | 721 | |
| 195 | 71552 | G>T | accD | АК замена | H>N | 320 | L100 | 721 | |
| 196 | 71641 | T>G | accD | АК замена | Q>P | | | 721 | |
| 197 | 71658 – 71759 | делеция 102 п.о. | accD | делеция 34 АК | | 320 | L100 | | |
| 198 | 71658 – 71750 | делеция 93 п.о. | accD | делеция 31 АК | | | | 721 | |
| 199 | 71929 | T>G | accD | АК замена | Q>P | 320 | L100 | | 1794 |
| 200 | 71956 | T>C | accD | АК замена | E>R | 320 | L100 | | |
| 201 | 71957 | C>T | accD | АК замена | тот же кодон | 320 | L100 | | |
| 202 | 72002 | C>G | accD | АК замена | D>H | 320 | L100 | | |
| 203 | 72004 | C>A | accD | АК замена | S>I | 320 | L100 | | |
| 204 | 72034 – 72036 | делеция 3 п.о. | accD | делеция 1 АК | E | 320 | L100 | | |
| 205 | 72046 | G>C | accD | АК замена | P>R | 320 | L100 | 721 | |
| 206 | 72066 – | делеция 24 п.о. | accD | делеция 8 АК | | 320 | L100 | | |

| | | | | | | | | | |
|-----|------------------|-----------------|--------------------------|---|-----|-----|------|-----|------|
| | 72089 | | | | | | | | |
| 207 | 72134 | вставка 18 п.о. | accD | вставка 6 АК | | 320 | L100 | 721 | |
| 208 | 72227 | вставка 9 п.о. | accD | вставка 3 АК | DTN | | | | 1794 |
| 209 | 72261 – 72278 | делеция 18 п.о. | accD | делеция 6 АК | | | L100 | 721 | |
| 210 | 72301 | C>G | accD | АК замена | R>T | | | 721 | |
| 211 | 72313 | A>C | accD | АК замена | I>R | | | | 1794 |
| 212 | 72321 | C>A | accD | АК замена | R>S | 320 | L100 | 721 | |
| 213 | 72508 | T>G | accD | АК замена | K>T | 320 | L100 | | |
| 214 | 72512 | C>G | accD | АК замена | D>H | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 215 | 72644 – 72664 | делеция 21 п.о. | accD – IG accD – trnQ | некодирующий – делеция Start – Сдвиг рамки | | 320 | L100 | 721 | |
| 216 | 72658 – 72659 | делеция 2 п.о. | IG accD – trnQ | некодирующий | | | | | 1794 |
| 217 | 72677 – 72685 | делеция 9 п.о. | IG accD – trnQ | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 218 | 72693 | C>A | IG accD – trnQ | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 219 | 72775 | T>C | IG accD – trnQ | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 220 | 72845 – 72850 | делеция 6 п.о. | IG accD – trnQ | некодирующий | | | | | 1794 |
| 221 | 72845 – 72855 | делеция 11 п.о. | IG accD – trnQ | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 222 | 72920 | T>C | IG accD – trnQ | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 223 | 72928 | вставка 9 п.о. | IG accD – trnQ | некодирующий | | 320 | L100 | | |
| 224 | 72941 | C>G | IG accD – trnQ | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 225 | 73059 | T>C | IG accD – trnQ | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |

| | | | | | | | | | |
|-----|------------------|----------------------------------|----------------|--------------|---|-----|------|-----|------|
| 226 | 73082 | A>C | IG accD – trnQ | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 227 | 73120 | C>T | trnQ | tRNA | | | | | 1794 |
| 228 | 73252 – 73254 | делеция 3 п.о. | IG trnQ – psbK | некодирующий | | | L100 | | |
| 229 | 73352 | T>G | IG trnQ – psbK | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 230 | 73641 | T>G | IG psbK – psbI | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 231 | 73844 | вставка C | IG psbK – psbI | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 232 | 74116 | C>A | IG psbI – trnS | некодирующий | | 320 | | | |
| 233 | 74520 | T>G | IG trnS – trnG | некодирующий | | | | 721 | |
| 234 | 74627 | A>T | IG trnS – trnG | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 235 | 74787 | T>G | IG trnS – trnG | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 236 | 75427 | G>T | trnG, интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 237 | 75687 | G>T | trnG, интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 238 | 75709 | A>T | trnG, интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 239 | 75861 – 75862 | делеция 2 п.о. | IG trnG – trnR | некодирующий | | | L100 | 721 | 1794 |
| 240 | 75939 | G>T | IG trnG – trnR | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 241 | 75991 | T>C | IG trnG – trnR | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 242 | 76007 – 76025 | Пропуск в сборке L100 19 п.о. | IG trnG – trnR | некодирующий | | | L100 | | |
| 243 | 76209 | A>T | IG trnR – atpA | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 244 | 76273 | C>A | IG trnR – atpA | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 245 | 78488 | G>T | atpF, интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 246 | 79356 | A>C | IG atpF – atpH | некодирующий | | | | | 1794 |
| 247 | 80288 – 80290 | делеция 3 п.о. | IG atpH – atpI | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 248 | 80347 | T>C | IG atpH – atpI | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 249 | 81183 | A>G | atpI | синонимичная | F | | | 721 | |

| | | | | | | | | | |
|-----|-------|----------------|------------------|--------------|-----|-----|------|-----|------|
| 250 | 82224 | вставка 4 п.о. | IG rps2 – rpoC2 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 251 | 82259 | T>A | IG rps2 – rpoC2 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 252 | 82418 | C>G | IG rps2 – rpoC2 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 253 | 82487 | C>A | rpoC2 | АК замена | L>F | 320 | L100 | 721 | |
| 254 | 82847 | A>C | rpoC2 | синонимичная | P | 320 | L100 | 721 | |
| 255 | 83697 | G>T | rpoC2 | АК замена | S>Y | 320 | L100 | 721 | |
| 256 | 83810 | G>T | rpoC2 | синонимичная | S | | | 721 | |
| 257 | 83861 | G>A | rpoC2 | синонимичная | I | 320 | L100 | | |
| 258 | 84422 | G>A | rpoC2 | синонимичная | I | 320 | L100 | 721 | |
| 259 | 84425 | T>A | rpoC2 | АК замена | K>N | | L100 | | |
| 260 | 84859 | G>T | rpoC2 | синонимичная | R | | | 721 | |
| 261 | 84928 | C>G | rpoC2 | АК замена | E>Q | 320 | L100 | 721 | |
| 262 | 85856 | C>G | rpoC2 | АК замена | M>I | 320 | L100 | 721 | |
| 263 | 85934 | C>G | rpoC2 | синонимичная | V | 320 | L100 | 721 | |
| 264 | 86706 | G>C | IG rpoC2 – rpoC1 | некодирующий | | | | | 1794 |
| 265 | 86850 | G>C | rpoC1 экзон2 | АК замена | Q>E | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 266 | 87250 | G>C | rpoC1 экзон2 | синонимичная | T | 320 | L100 | 721 | |
| 267 | 88270 | G>T | rpoC1 экзон2 | синонимичная | P | 320 | L100 | 721 | |
| 268 | 88834 | T>G | rpoC1 интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 269 | 88876 | вставка 4 п.о. | rpoC1 интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 270 | 90999 | C>T | rpoB | АК замена | A>T | 320 | L100 | | |
| 271 | 92644 | C>T | rpoB | синонимичная | V | 320 | L100 | 721 | |
| 272 | 92810 | A>T | IG rpoB – trnC | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 273 | 92811 | вставка C | IG rpoB – trnC | некодирующий | | | L100 | | |
| 274 | 93443 | T>A | IG rpoB – trnC | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 275 | 93471 | вставка 4 п.о. | IG rpoB – trnC | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 276 | 93482 | G>C | IG rpoB – trnC | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |

| | | | | | | | | | |
|-----|------------------|-----------------------|------------------|--------------|-----|-----|------|-----|------|
| 277 | 93707 | T>C | IG rpoB – trnC | некодирующий | | | L100 | | |
| 278 | 93954 | вставка 4 п.о. | IG trnC – petN | некодирующий | | 320 | L100 | | |
| 279 | 93954 | вставка 4 п.о. | IG trnC – petN | некодирующий | | | | 721 | |
| 280 | 94315 | вставка 5 п.о. | IG trnC – petN | некодирующий | | 320 | L100 | | |
| 281 | 94329 | G>C | IG trnC – petN | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 282 | 94401 – 94406 | делеция 6 п.о. | IG trnC – petN | некодирующий | | | | | 1794 |
| 283 | 94448 – 94459 | делеция 12 п.о. | IG trnC – petN | некодирующий | | | | | 1794 |
| 284 | 94672 | T>A | IG petN – clpP | некодирующий | | | | 721 | |
| 285 | 94742 | вставка 9 п.о. | IG petN – clpP | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 286 | 95089 | C>A | IG petN – clpP | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 287 | 95230 | T>A | IG petN – clpP | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 288 | 95773 | G>A | clpP экзон 1 | синонимичная | V | 320 | L100 | 721 | |
| 289 | 96280 | вставка 10 п.о. | clpP интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 290 | 96647 | A>C | IG clpP – rps12 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 291 | 96656 | G>C | IG clpP – rps12 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 292 | 96748 | A>T | IG clpP – rps12 | некодирующий | | | | | 1794 |
| 293 | 96798 | T>G | IG clpP – rps12 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 294 | 96880 | T>C | IG clpP – rps12 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 295 | 97238 | G>C | IG rps12 – rpl20 | некодирующий | | 320 | L100 | | |
| 296 | 97520 | G>A | IG rps12 – rpl20 | некодирующий | | | | 721 | |
| 297 | 97643 | вставка 6 п.о. | IG rps12 – rpl20 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 298 | 98027 | C>G | rpl20 | АК замена | Q>E | 320 | L100 | 721 | |
| 299 | 99302 | G>C | IG rpl33 – psaJ | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 300 | 98449 – 98454 | делеция 6 п.о. | IG rpl33 – psaJ | некодирующий | | | | | 1794 |
| 301 | 100092 – | Пропуск в сборке L100 | IG psaJ – trnP | некодирующий | | | L100 | | |

| | | | | | | | | | |
|-----|--------------------|----------------------------------|------------------|--------------|-----|-----|------|-----|------|
| | 100117 | 26 п.о. | | | | | | | |
| 302 | 100683 | C>T | trnW | tRNA | | 320 | L100 | 721 | |
| 303 | 100775 | A>C | IG trnW – petG | некодирующий | | 320 | L100 | | |
| 304 | 100967 | G>T | IG petG – petL | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 305 | 101044 | T>A | IG petG – petL | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 306 | 102557 | G>C | psbB | синонимичная | T | 320 | L100 | 721 | |
| 307 | 103076 | C>A | psbB | синонимичная | V | | | | 1794 |
| 308 | 103594 | T>C | psbT | синонимичная | F | 320 | L100 | 721 | |
| 309 | 104359 | A>G | petB интрон | некодирующий | | | | 721 | |
| 310 | 104615 | A>G | petB интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 311 | 104824 – 104828 | делеция 5 п.о. | petB интрон | некодирующий | | | | 721 | |
| 312 | 104981 | G>T | petB интрон | некодирующий | | 320 | L100 | | |
| 313 | 105067 | C>G | petB интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 314 | 107337 | T>G | IG petD – rpoA | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 315 | 107374 | A>C | IG petD – rpoA | некодирующий | | 320 | L100 | | |
| 316 | 107570 | A>C | rpoA | АК замена | L>V | 320 | L100 | 721 | |
| 317 | 108604 | T>G | rps11 | синонимичная | V | 320 | L100 | 721 | |
| 318 | 109088 | A>T | IG rps11 – rpl36 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 319 | 109133 | T>A | IG rps11 – rpl36 | некодирующий | | | | | 1794 |
| 320 | 109134 | C>G | IG rps11 – rpl36 | некодирующий | | | | | 1794 |
| 321 | 109135 | T>A | IG rps11 – rpl36 | некодирующий | | | | | 1794 |
| 322 | 109115 – 109134 | Пропуск в сборке L100 20 п.о. | IG rps11 – rpl36 | некодирующий | | | L100 | | |
| 323 | 109303 | T>G | IG rpl36 – rps8 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 324 | 109903 | C>T | IG rpl36 – rps8 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 325 | 109911 – 109915 | делеция 5 п.о. | IG rpl36 – rps8 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |

| | | | | | | | | | |
|-----|--------------------|----------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----|-----|------|-----|------|
| 326 | 109931 | A>C | IG rpl36 – rps8 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 327 | 110136 | G>T | rps8 | синонимичная | P | 320 | L100 | 721 | |
| 328 | 110421 | C>A | IG rps8 – rpl14 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 329 | 110488 | вставка 5 п.о. | IG rps8 – rpl14 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 330 | 110665 – 110670 | делеция 6 п.о. | IG rps8 – rpl14 | некодирующий | | | | 721 | |
| 331 | 110687 | T>A | IG rps8 – rpl14 | некодирующий | | | L100 | | |
| 332 | 110752 | C>G | IG rps8 – rpl14 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 333 | 111992 | T>G | rpl16 интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 334 | 112028 | делеция T | rpl16 интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 335 | 112346 | G>T | rpl16 интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 336 | 112376 | A>T | rpl16 интрон | некодирующий | | 320 | L100 | | |
| 337 | 112378 | C>A | rpl16 интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 338 | 112382 | T>A | rpl16 интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 339 | 112748 | T>G | rpl16 интрон | некодирующий | | | | | 1794 |
| 340 | 113105 | T>A | rps3 | синонимичная | I | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 341 | 113553 | T>G | rps3 | АК замена | K>T | | | 721 | |
| 342 | 113692 – 116696 | делеция 5 п.о. | IG rps3 – rps19 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 343 | 113831 | C>A | IG rps3 – rps19 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 344 | 114075 | C>G | IG rps3 – rps19 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 345 | 114132 – 114135 | делеция 4 п.о. | IG rps3 – rps19 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | 1794 |
| 346 | 115503 | G>T | rpl2 интрон | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 347 | 116137 – 116141 | делеция 5 п.о. | IG rpl2 – rpl23 – rpl23/pseudo | некодирующий – псевдоген | | 320 | L100 | | |
| 348 | 116360 | G>A | rpl23 /pseudo/ | псевдоген | | | | | 1794 |
| 349 | 116399 | C>G | rpl23 /pseudo/ | псевдоген | | 320 | L100 | 721 | |

| | | | | | | | | | |
|-----|--------------------|----------------------------------|-----------------|---------------|-----|-----|--------|-----|------|
| 350 | 117518 | C>G | ccsA /ycf5/ | АК замена | R>T | | | 721 | |
| 351 | 117574 | A>C | ccsA /ycf5/ | синонимичная | V | 320 | L100 | | |
| 352 | 117586 | T>A | ccsA /ycf5/ | АК замена | L>F | | | 721 | |
| 353 | 118516 | C>A | IG trnL – rpl32 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 354 | 118586 | A>T | IG trnL – rpl32 | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 355 | 118675 | G>T | IG trnL – rpl32 | некодирующий | | | | 721 | |
| 356 | 118678 – 118776 | Пропуск в сборке L100 99 п.о. | IG trnL – rpl32 | некодирующий | | | L100 | | |
| 357 | 118891 | T>G | IG rps8 – rpl14 | некодирующий | | | L100 ? | | |
| 358 | 118957 – 118989 | делеция 33 п.о. | rpl32 | делеция 11 АК | | | | | 1794 |
| 359 | 118981 – 118989 | делеция 9 п.о. | rpl32 | делеция 3 АК | GSG | 320 | L100 | 721 | |
| 360 | 119241 | C>G | IG rpl32 – ndhF | некодирующий | | 320 | L100 | | |
| 361 | 119626 | C>G | IG rpl32 – ndhF | некодирующий | | | | | 1794 |
| 362 | 121972 | вставка 5 п.о. | IG ndhF – trnH | некодирующий | | 320 | L100 | 721 | |
| 363 | 122147 | C>A | IG ndhF – trnH | некодирующий | | | | 721 | |