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

На правах рукописи

ДОБРОВОЛЬСКАЯ ОКСАНА БОРИСОВНА

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МОРФОГЕНЕЗА СОЦВЕТИЯ ПШЕНИЦЫ

03.02.07 - генетика

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный консультант д.б.н., профессор Е.А. Салина

Новосибирск – 2018

оглавление

ВВЕДЕНИЕ 7
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 21
1.1. Эволюционная история злаков 22
1.2. Происхождение и эволюция мягкой пшеницы <i>T. aestivum</i> L
1.3. Особенности организации геномов злаков 29
1.4. Строение цветка и соцветия злаков 31
1.4.1. Морфологическая характеристика соцветия пшеницы (род
<i>Triticum</i> L.)
1.4.2. Многоколосковые формы пшеницы 37
1.4.3. Изучение генетической регуляции признака «ветвистоколосость/
многоколосковость» пшеницы 43
1.4.4. Многоколосковые формы ржи и ячменя 46
1.5. Этапы органогенеза высших растений 48
1.6. Особенности развития соцветий злаков 51
1.7. Генетическая регуляция морфогенеза соцветия злаков 57
1.7.1. Роль ортологов <i>LFY/FLO</i> в развитии соцветия злаков 58
1.7.2. Консервативность сигнального пути CLAVATA-WUSCHEL,
координирующего пролиферацию и дифференцировку клеток меристем,
у высших растений 60
1.7.3. Генетическая регуляция инициации и поддержания активности
аксиальных меристем соцветия злаков 64
1.7.4. Генетическая регуляция установления идентичности и
детерминированности колосковых меристем 65
1.8. Заключение к Главе 1 69
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 72
2.1. Растительный материал72
2.1.1. Линии пшеницы с нестандартными морфотипами колоса 72
2.1.2. Популяции гибридов76

2.1.2.1. Мягкая пшеница <i>Т. aestivum</i> L 76
2.1.2.2. Рожь посевная S. cereale L
2.2. Оценка фенотипов растений 77
2.3. Световая и электронная микроскопия 78
2.4. Выделение ДНК растений 78
2.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 79
2.6. Микросателлитный анализ 80
2.7. SSCP-анализ
2.8. Электрофорез ДНК в агарозном геле. Подготовка продуктов ПЦР для
секвенирования
2.9. Анализ первичной структуры ДНК 83
2.10. Выделение РНК растений. Обратная транскрипция 84
2.11. Количественная ОТ-ПЦР 85
2.12. Построение молекулярно-генетических карт хромосом, картирование
генов
2.13. Картирование локусов количественных признаков (QTL) 88
2.14. Разработка и картирование новых микросателлитных (SSR)
маркеров
2.15. Скрининг ВАС-библиотеки пшеницы сорта Чайниз Спринг и
установление первичной структуры ДНК ВАС-клонов 89
2.16. С-дифференциальное окрашивание 90
2.17. Флуоресцентная in situ гибридизация 90
Глава 3. ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РАЗВИТИЯ СОЦВЕТИЯ ЛИНИЙ
ПШЕНИЦЫ С НЕСТАНДАРТНЫМИ МОРФОТИПАМИ КОЛОСА
3.1. Особенности строения колоса многоколосковых линий пшеницы 92
3.1.1. Многоколосковые линии мягкой пшеницы <i>T. aestivum</i>
3.1.2. Особенности строения колоса многоколосковых линий
тетраплоидных и диплоидных видов пшеницы 99
3.2. Изучение особенностей развития соцветий многоколосковых линий
мягкой пшеницы с применением методов микроскопии 103

3.2.1. Развитие соцветия морфотипа MRS (линия NIL-mrs1) 104
3.2.2. Развитие соцветий морфотипа HS (линии MC1611, Skle128) и GB
(линия Ruc204)
3.2.3. Развитие соцветий морфотипа VSS (линии Ruc57 и Ruc62) 112
3.3. Анализ особенностей развития соцветия мутантной линии КТ 3-24
Т. топососсит с ветвистым колосом113
3.4. Изучение особенностей развития соцветия многоколосковых линий
тетраплоидных видов пшеницы114
3.5. Изучение особенностей развития соцветия многоколосковой линии
морфотипа f-tR (ложно-истинное ветвление) 116
3.6. Изучение ранних этапов развития колоса со спиральным
расположением колосков линий мягкой пшеницы нестандартного
морфотипа SCR119
3.7. Обсуждение и заключение к Главе 3 123
Глава 4. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ
МНОГОКОЛОСКОВЫХ ФЕНОТИПОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ T. aestivum L.
И РЖИ ПОСЕВНОЙ <i>S. cereale</i> L
4.1. Молекулярно-генетическое картирование гена mrs1,
детерминирующего признак MRS 128
детерминирующего признак MRS
детерминирующего признак MRS 128 4.2. Влияние перестроек хромосомы 2D на фенотип колоса мягкой пшеницы. 139 4.3. Определение генетического вклада делеций хромосомы 2D в формирование многоколоскового фенотипа пшеницы 149 4.4. Изучение генетического контроля признака «многоколосковость»
детерминирующего признак MRS 128 4.2. Влияние перестроек хромосомы 2D на фенотип колоса мягкой пшеницы 139 4.3. Определение генетического вклада делеций хромосомы 2D в формирование многоколоскового фенотипа пшеницы 149 4.4. Изучение генетического контроля признака «многоколосковость» линии MC1611 мягкой пшеницы 153
детерминирующего признак MRS 128 4.2. Влияние перестроек хромосомы 2D на фенотип колоса мягкой пшеницы. 139 4.3. Определение генетического вклада делеций хромосомы 2D в формирование многоколоскового фенотипа пшеницы 149 4.4. Изучение генетического контроля признака «многоколосковость» линии MC1611 мягкой пшеницы 153 4.5. Изучение генетического контроля фенотипа колоса monstrosum ржи
детерминирующего признак MRS 128 4.2. Влияние перестроек хромосомы 2D на фенотип колоса мягкой пшеницы. 139 4.3. Определение генетического вклада делеций хромосомы 2D в формирование многоколоскового фенотипа пшеницы 149 4.4. Изучение генетического контроля признака «многоколосковость» линии MC1611 мягкой пшеницы 153 4.5. Изучение генетического контроля фенотипа колоса monstrosum ржи посевной S. cereale 159

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ Глава 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ **ОРГАНИЗАЦИИ** ГЕНА mrs1. КОНТРОЛИРУЮЩЕГО МНОГОКОЛОСКОВЫЙ ФЕНОТИП КОЛОСА МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ..... 169 5.1. Установление гена-кандидата на роль гена *mrs1* 169 5.2. Установление структурной организации локусов WFZP в геноме мягкой пшеницы 174 5.3. Изучение особенностей экспрессии гена WFZP 178 5.4. Определение локализации генов WFZP-A-B-D в делеционных бинах хромосом 2А, 2В и 2D 180 5.5. картирование микросателлитных Разработка И маркеров К WFZP-локусам мягкой пшеницы 180 5.6. Определение WFZP-A-B-D структуры генов-гомеологов y многоколосковых линий мягкой пшеницы и линий со стандартным 5.7. Обсуждение и заключение к Главе 5 190 6. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ Глава ИЗУЧЕНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНА WFZP ДИПЛОИДНЫХ И ТЕТРАПЛОИДНЫХ 6.1. Определение структурной организации гена WFZP-А диплоидных видов пшеницы 196 6.2. Определение структурной организации гена WFZP-А тетраплоидных видов пшеницы 198 6.3. Изучение структурной организации промоторного района ортологов 6.4. Изучение взаимодействия генов WHEAT FRIZZY PANICLE и SHAM 6.4.1. Гибриды PI 67339 × R-107...... 203

6.4.2. Гибриды PI 67339 × <i>К</i> -40750	
6.5. Обсуждение и заключение к Главе 6	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	
выводы	221
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	227
ПРИЛОЖЕНИЕ	

введение

проблемы. Актуальность Пшеница, включая два наиболее широко возделываемых вида, мягкую (*Triticum aestivum* L., геном BBAADD, 2n = 42) и твердую (*Triticum durum* Desf., геном BBAA, 2n = 28), принадлежит к наиболее важным сельскохозяйственным культурам, являясь основным продуктом питания для 30% населения земного шара (Shewry, 2009). В связи с постоянным ростом населения, увеличение урожайности пшеницы – актуальная задача, для решения которой могут быть применены новые научные подходы. Решение практических задач селекции невозможно без получения новых фундаментальных знаний о структурно-функциональной организации генома и транскриптома растений, без понимания молекулярногенетических механизмов, лежащих в основе формирования хозяйственноценных признаков. К числу таких признаков относят качественные и количественные характеристики пшеницы, соцветия колоса, непосредственно связанные с продуктивностью.

Последовательные этапы определяют развития соцветия его архитектуру, от которой зависит число цветков и строение системы проводящих соцветия, способность тканей влияющее на растения обеспечивать развивающиеся плоды продуктами фотосинтеза. У злаков каждый цветок дает начало только одной зерновке, и число фертильных цветков соцветия определяет общее число зерновок. Таким образом, особенности строения соцветия злаков оказывают влияние и на число, и на размер зерновок – критические экономические параметры продуктивности зерновых злаков (Цвелев, 1976; Kellogg et al., 2013).

Генетическая регуляция процессов развития растения в целом и соцветия в частности в настоящее время наиболее полно изучена у модельных видов растений, прежде всего у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Prunet, Jack, 2014), а среди однодольных – у культивируемых видов: риса (*Oryza sativa* L.) и кукурузы (*Zea mays* L.) (Bommert, Whipple, 2017). Что

касается мягкой пшеницы *T. aestivum* и ее близкородственных видов, то генетические факторы, контролирующие процессы развития соцветия (колоса), у них в настоящее время изучены в меньшей степени. В связи с этим фундаментальное значение и очевидную практическую значимость представляют исследования, направленные на идентификацию генов, контролирующих развитие соцветия пшеницы, изучение их структурно-функциональной организации, а также установление взаимодействия генов и идентификация генных сетей.

Степень разработанности темы. Изучению строения соцветия пшеницы, колоса, выявлению генетических факторов, регулирующих его морфологические характеристики, традиционно уделялось и в настоящее время продолжает уделяться большое внимание (Дорофеев и др., 1979; Гончаров, 2012).

Признаки, маркирующие колос пшеницы, являются таксономически значимыми, К. Линней положил их в основу систематики рода Triticum. К числу основных/ключевых генов, контролирующих такие таксономически значимые признаки колоса, относят гены Q, C и S (Дорофеев и др., 1979; Гончаров, 2012). Дорофеев и соавт. (1979) отмечали, что переход основных генов (Q, C, S) из одного аллельного состояния в другое может кардинально изменить хозяйственную характеристику пшеницы, делая ее рентабельной для возделывания. Ген Q считают главным геном доместикации и одним из основных регуляторов развития, он оказывает плейотропное влияние на ряд хозяйственно важных признаков – спельтоидность, форму и жесткость чешуи, ломкоколосость, длину колоса, высоту растения (Unrau et al., 1950; Sears, 1952, 1954; MacKey, 1954; Muramatsu, 1963, 1979, 1985, 1986; Kato et al., 1999, 2003; Faris, Gill, 2002; Faris et al., 2003; Simons et al., 2006; Zhang et al., 2011). Ген С контролирует компактность колоса гексаплоидной пшеницы *T. compactum* Host., доминантный аллель обуславливает компактную, а рецессивный – стандартную (нормальную) форму колоса (Johnson et al., 2008). Ген S контролирует форму зерновки, рецессивный аллель гена обуславливает

округлую форму зерновки вида *Т. sphaerococcum* Perciv. (Sears, 1947). Генотип мягкой пшеницы по главным генам может быть определен как *QcS* (Гончаров, 2012).

Генетические факторы, контролирующие морфологичские признаки колоса пшеницы, исследовались с применением методов классической генетики и цитогенетики (McIntosh, 1973). Методы молекулярной биологии, по мере их разработки, также привлекались к изучению генетического контроля морфологических особенностей строения колоса пшеницы. В настоящее время для многих главных генов (major genes) и генов с минорными эффектами определено положение на молекулярно-генетических картах хромосом, но только у единичных генов установлена структурная организация. Среди таксономически значимых генов (Q, C, S) и ряда других генов, определяющих морфологические признаки колоса, достаточно полно изучен только один, ген *Q*. Определена его первичная структура, установлены функции (Faris et al., 2003), показаны особенности регуляции данного гена (Debernardi et al., 2017; Greenwood et. al., 2017). Что же касается остальных генов, контролирующих морфологические признаки колоса, то большинства ИЗ них определено положение на для молекулярногенетических картах (Haque et al., 2012; Yoshiya et al., 2012; Amagai et al., 2014a, 2014b, 2017; Kosuge et al., 2012; Katkout et al., 2014 и др.).

Различные аспекты развития соцветия интенсивно изучались на протяжении последних десятилетий, но наиболее изученными к настоящему времени являются модельные виды двудольных растений *A. thaliana*, *Antirrhinum majus* L., а среди однодольных – *O. sativa* и *Z. mays*. Что касается представителей трибы Triticeae, пшеницы и близкородственных видов, гены, контролирующие процессы развития соцветия, колоса, изучены недостаточно. За последние 10–15 лет идентифицирован и охарактеризован ряд таких генов у мягкой пшеницы *T. aestivum*, например, ген *wheat FLORICAULA/ LEAFY (WFL)* (Shitsukawa et al., 2006), гены с гомеозисной активностью B: *wheat PISTILLATA (WPI)*, *wheat APETALA3 (WAP3)* (Hama et

al., 2004); AP1-подобный ген *WAP1* (другое название *VRN1*) (Murai et. al., 2003), (*wheat SEPALLATA*) *WSEP* (Shitsukawa et al., 2007), однако данные, имеющиеся на настоящий момент, все еще недостаточны и разрозненны.

генов, контролирующих Для выявления развитие соцветия, применялось два основных подхода, первый основан на использовании разнообразия определенному и/или природного ПО признаку экспериментального мутагенеза. Его упрощенная схема выглядит следующим образом: определяется положение гена, детерминирующего мутантный фенотип, на молекулярно-генетической карте, затем проводится позиционное клонирование, определяется структурная организация гена и выявляются изменения на уровне ДНК, которые приводят к аномалиям формировании признака. Для развития при валидации результатов используются методы трансформации растений или серии генетически независимых мутантов. В основе второго подхода лежит использование методов сравнительной генетики и геномики: на основе первичной структуры генов, достаточно хорошо изученных у модельных видов растений, и по ее гомологии выделяют гены у других, часто менее изученных видов.

Использование позиционного клонирования (первый подход) у пшеницы было долгое время затруднено из-за отсутствия референсного генома, который стал доступен в 2017 г. (IWGSC Reference Sequence v1.0, http://www.wheatgenome.org/). Вместе с тем, с помощью позиционного клонирования были выделены и детально охарактеризованы отдельные гены пшеницы: основной ген доместикации – Q (Faris et al., 2003), ген, контролирующий реакцию на фотопериод *PHOTOPERIOD-1* (*Ppd1*) (Beales et al., 2007; Boden et al., 2015), гены, определяющие тип развития *VERNALIZATION 1, 2, 3* (*Vrn1, 2, 3*) (Yan et al., 2004, 2006, Shimada et al., 2009).

Подход выделения генов по гомологии (второй подход) использовался более интенсивно. В результате его применения были выделены многочисленные гены, вовлеченные в процесс развития соцветия пшеницы (Hama et al., 2004; Shitsukawa et al., 2006, 2007; Zhang et al., 2015 и др.).

Однако отсутствие мутантов по этим генам у пшеницы препятствовало полному и точному установлению их функций.

Следует отметить, что, в целом, у пшеницы наиболее изученным является генетический контроль перехода от вегетативной фазы развития к генеративной (Yan et al., 2004, 2006, Shimada et al., 2009, Nishiura et al., 2014; Tanaka et al., 2017). Что же касается исследования генетической регуляции последующих стадий развития соцветия, включающих основные морфогенетические события – инициацию и дифференцировку органов соцветия, в основе которых лежат ключевые процессы развития растений – установление идентичности и детерминированности меристем, то знания в этой области остаются фрагментарными и разрозненными.

Было установлено, что наряду с высоко консервативными путями регуляции развития соцветий злаков, существуют блоки или отдельные гены в их составе, регулирующие развитие специфичных для некоторых таксонов структур соцветия (Tanaka et al., 2013). Изучение таких путей регуляции возможно на образцах вида (таксона), который характеризуется развитием этих специфических структур. Основными особенностями строения колоса пшеницы являются отсутствие ветвистости и многоцветковость колоска, базовой структуры в составе соцветия злаков (Цвелев, 1976). Эти отличительные черты строения соцветия пшеницы подразумевают наличие особенностей и в генетических механизмах, регулирующих его развитие.

Исследование генетического контроля формирования соцветия пшеницы, определение консервативных и специфических блоков генетических путей регуляции его развития имеет как фундаментальное значение, расширяя наши представления о генетических механизмах, лежащих в основе формирования разнообразия форм соцветий растений, так и очевидную практическую значимость.

Цель и задачи исследования. Цель настоящего исследования заключалась в изучении генетической регуляции морфогенеза соцветия пшеницы (*Triticum* L.). Основное внимание уделялось развитию колоска – базовой структуры в составе соцветия злаков. В работе были поставлены следующие задачи:

1. Обосновать и применить стратегию, направленную на исследование генетической регуляции морфогенеза соцветия растений со сложными аллополиплоидными геномами на примере мягкой пшеницы *T. aestivum* L.

2. Сформировать и охарактеризовать генетическую коллекцию линий пшеницы с нарушениями морфогенеза соцветия в результате детального анализа особенностей развития соцветий линий и форм диплоидных, тетраплоидных и гексаплоидных видов пшеницы с нестандартными морфологическими типами (морфотипами) колоса, которые характеризуются формированием на уступах колосового стержня дополнительных колосков и эктопических «веточек», а также нарушенным (спиральным) порядком расположения колосков на колосовом стержне.

3. Выявить и изучить генетические факторы, управляющие морфогенезом соцветия пшеницы, на основе анализа геномного состава генетических моделей, выделенных среди созданной коллекции линий пшеницы с нарушениями морфогенеза соцветия, локализации мутантных генов на молекулярно-генетических картах хромосом, выполнения комплементационного анализа, установления взаимодействия генов и определения функций выявленных генов.

4. Установить структурно-функциональную организацию генов, регулирующих морфогенез соцветия пшеницы, на основе синтении геномов злаков с применением подхода позиционного клонирования. Научная новизна работы. В настоящей работе получен ряд новых приоритетных результатов исследований генетических механизмов, регулирующих развитие соцветие пшеницы. Впервые были идентифицированы гены И локусы количественных признаков, определяющие формирование многоколосковых фенотипов мягкой пшеницы, определена их локализация на молекулярно-генетических картах хромосом, установлены их функции в развитии соцветия.

Впервые в геноме мягкой пшеницы с использованием позиционного клонирования выделены гомеологи гена *Wheat FRIZZY PANICE (WFZP)*, являющиеся ключевыми регуляторами развития соцветия злаков на стадии формирования колоска – структуры, характерной только для представителей семейства Злаки. Впервые изучена структурно-функциональная организация этих генов у диплоидных, тетраплоидных и гексаплоидных видов пшеницы, показана их роль в развитии. Впервые показано, что мутации генов *WFZP* вызывают формирование дополнительных колосков на уступах колосового стержня пшеницы. На примере генов *WFZP* впервые показан неодинаковый вклад гомеологичных копий генов сложного аллополиплоидного генома в контроль морфогенеза соцветия.

Впервые показано, что в установлении идентичности цветковых меристем многоцветкового колоска пшеницы участвуют гены *WFZP* и *SHAM RAMIFICATION 2* (*SHR2*), которые действуют независимо на разных этапах развития колоска и возможно принадлежат разным генетическим путям регуляции развития. Впервые экспериментально доказано наличие генов *Ramified Spike* (*RS*), участвующих в контроле развития колоска пшеницы, и показано их взаимодействие с геном *SHR2*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработана стратегия исследования морфогенеза соцветия растений co сложным Стратегия аллополиплоидным геномом. включает В себя комплекс экспериментальных исследований, выполненных на моделях – коллекциях происхождения мутантов различного co сходными нарушениями В

программе развития соцветия, принадлежащих как одному виду, так и различным видам в пределах одного полиплоидного ряда рода *Triticum* L. Комплексный подход, примененный в данной работе, и полученные знания являются основой для дальнейших научных исследований, направленных на понимание механизмов генетической регуляции процессов развития соцветия растений, идентификации генов и генных сетей, определению возможных генов-мишеней направленного воздействия на программы развития растений с целью получения новых перспективных линий и форм злаков с улучшенными качествами, в частности, высокой урожайностью.

Сформирована и детально охарактеризована коллекция линий пшеницы с нарушениями морфогенеза соцветия, которая послужит для идентификации новых генов, управляющих развитием соцветия, установления ИХ локализации в геноме, изучения структурно-ИХ функциональной организации, что дополнит и расширит наши представления о процессах развития растений в целом.

Разработанные в ходе выполнения исследований новые молекулярные ДНК маркеры (COS, SSR) будут использованы в проектах по молекулярногенетическому картированию генов и локусов количественных признаков пшеницы и ее сородичей, а также по определению геномного состава новых перспективных линий и форм пшеницы.

Разработанный в данной работе подход к определению функциональной роли генов на основе использования мутантов разного происхождения будет востребован для изучения функций различных генов пшеницы и других видов растений. Метод выделения генов, основанный на синтении геномов, имеющих общее происхождение, может быть применен в исследованиях различных видов растений, в первую очередь тех, чьи геномы еще не секвенированы.

Актуальность исследований и значимость результатов подтверждается поддержкой грантами РФФИ (№№ 10-04-01458-а, 12-04-00897-а, 13-04-90932, 15-04-05371-а, 18-04-00483-а).

Полученные результаты используются при чтении курса лекций в Новосибирском государственном аграрном университете «Генетика развития растений», а также на школах молодых ученых (г. Екатеринбург, 2015; г. Новосибирск, 2016).

Методология и методы диссертационного исследования. При выполнении диссертационного исследования разработан и использован комплексный подход, сочетающий методы световой и электронной микроскопии, методы классической генетики и современные подходы молекулярной генетики и геномики. Это позволило получить полную информацию о локализации и структурной организации генов, управляющих морфогенезом соцветия пшеницы на стадии формирования колоска, точно интерпретировать полученные результаты исследований и изучить фенотипические эффекты генов на разных этапах развития соцветия пшеницы.

Исследования выполнены на материале уникальной коллекции линий пшеницы с нарушениями морфогенеза соцветия, сформированной и детально охарактеризованной в ходе выполнения работы. Для решения поставленных в работе задач были привлечены генетические (почти изогенные, замещенные, делеционные линии) и геномные (ВАС-библиотеки) ресурсы мягкой пшеницы.

Молекулярно-генетическое картирование с использованием различных ДНК маркеров (SSR, COS-SSCP) было применено для установления положения локусов изучаемых генов на молекулярно-генетических картах хромосом. Методы сравнительной генетики позволили определить геныкандидаты на роль генов, управляющих процессами развития соцветия пшеницы. Для выделения генов в аллополиплоидном геноме мягкой пшеницы был использован метод позиционного клонирования. Первичная структура локусов изучаемых генов была установлена с применением высокопроизводительного секвенирования ДНК. Для уточнения И интерпретации результатов молекулярно-генетических геномных И исследований (наличие делеций локусов генов) были использованы

современные методы анализа кариотипов растений в сочетании с микросателлитным анализом.

Уникальность используемых экспериментальных моделей, которые включают коллекции линий пшеницы с нарушениями морфогенеза соцветия, наряду с применением современных методов геномного анализа растений и методов микроскопии делают работу полностью оригинальной.

Основные положения, выносимые на защиту.

- 1. Изменения ранних этапов развития соцветия пшеницы, связанные с нарушением установления идентичности флоральных меристем, формированию соцветий приводят К С нестандартными морфологическими типами, которые характеризуются наличием дополнительных колосков и/или «веточек» на уступах колосового стержня.
- 2. Ген Wheat FRIZZY PANICLE, кодирующий транскрипционный фактор семейства AP2/ERF, является одним из ключевых регуляторов развития соцветия пшеницы на стадии формирования колоска базовой структуры соцветия семейства Злаки. Вклад гомеологичных копий гена WFZP в контроле формирования фенотипических признаков соцветий аллополиплоидных видов пшеницы эволюционной линии Emmer не одинаков и зависит от принадлежности к геному A, B или D.
- 3. Генетический контроль установления идентичности флоральных меристем многоцветкового колоска пшеницы на разных стадиях его развития обеспечивается независимо действующими генами *WFZP* и *SHAM RAMIFICATION 2 (SHR2)*.

Степень достоверности результатов. Высокая достоверность полученных результатов определяется подтверждением их с использованием различных подходов (молекулярно-генетические исследования, анализ кариотипов) и различных генетических моделей (мутанты разного происхождения, изогенные линии, делеционные линии, серия линий, несущих гены общего происхождения в разной генотипической среде). Достоверность локализации

генов/локусов количественных признаков на молекулярно-генетических картах хромосом подтверждена использованием нескольких картирующих популяций. Установление функциональной роли изучаемых генов выполнено серии мутантов с использованием независимого происхождения. Достоверность выявленных различий подтверждена стандартными методами статистической обработки результатов. Методы установления геномного состава линий и форм пшеницы, подходы молекулярно-генетического картирования генов И сравнительного картирования геномов были апробированы и адаптированы для решения задач диссертационной работы. Научные результаты признаны в мире, что подтверждено публикациями в высокорейтинговых международных (в квартиле Q1) и отечественных научных журналах, рекомендованных Перечнем ВАК. Полученные в рамках диссертационной работы и опубликованные результаты исследований процитированы в ведущих международных изданиях – Nature Plants, Plant Cell, Plant Physiology и др.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на международных И всероссийских съездах, симпозиумах, конгрессах, конференциях, в том числе: Втором Международном симпозиуме «Геномика генетических ресурсов растений» (г. Болонья, Италия, 2010 г.), Первой конференции «Генетика, Международной геномика И биотехнология растений» (г. Новосибирск, Россия, 2010 г.), Пятнадцатой международной конференции Европейского объединения по генетике злаков (EWAC) (г. Нови-Сад, Сербия, 2011 г.), международной конференции «Генетические геномика пшеницы» (г. Новосибирск, Россия, 2011 г.), ресурсы И Европейском заседании по геномике растений (г. Стамбул, Турция, 2011 г.), Второй Международной конференции «Генетика, геномика и биотехнология растений» (г. Иркутск, Россия, 2012 г.), Третьей международной Вавиловской конференции «Идеи Н.И. Вавилова в современном мире» (г. Санкт-Петербург, Россия, 2012 г.), Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной

физиологии растений» (г. Москва, Россия, 2013 г.), Девятой Международной биоинформатике конференции по геномной регуляции И структурной/системной биологии (г. Новосибирск, Россия, 2014 г.), VI съезде ВОГиС (г. Ростов-на-Дону, Россия, 2014 г.), Третьей международной конференции «Генетика, биотехнология растений» геномика И (г. Новосибирск, Россия, 2015 г.), Девятой Международной конференции по биоинформатике геномной регуляции и структурной/системной биологии (г. Новосибирск, Россия, 2016 г.), Международной конференции «Беляевские чтения», посвященной 100-летию академика АН СССР Д.К. Беляева (г. Новосибирск, Россия, 2017 г.), Второй Всероссийской конференции с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (г. Новосибирск, Россия, 2017 г.), Четвертой Международной конференции «Генетика, геномика и биотехнология растений» (г. Алма-Аты, Казахстан, 2017 г.).

Публикации. Общее число работ по теме диссертации, включая сборники трудов конференций, составляет 37, в том числе 21 статья в международных и отечественных журналах (из них 17 статей в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 293 страницах печатного текста, содержит 16 таблиц и 68 рисунков. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, приложения и списка цитированной литературы, содержащего 280 источников.

Личный вклад автора.

Автору принадлежит постановка цели и задач исследования, выполнение основных экспериментов, обработка данных, интерпретация и обобщение полученных результатов. Анализ развивающихся соцветий с использованием методов световой и электронной микроскопии, молекулярно-генетическая часть экспериментальной работы и анализ полученных результатов выполнены автором самостоятельно. Картирующие популяции пшеницы

были получены в сотрудничестве с коллегами Лаборатории хромосомной инженерии злаков ИЦиГ СО РАН к.б.н. Л.И. Лайковой и О.М. Поповой. Картирующая популяция ржи получена д.б.н. А.В. Войлоковым (Санкт-ИОГеН PAH, Петербургский филиал Г. Санкт-Петербург, Россия). Биоинфоматическая обработка результатов секвенирования последовательностей ДНК в составе ВАС-клонов выполнена д-ром О. Шосон (Dr. Au. Chosson, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)-Université Blaise Pascal Unité Mixte de Recherche-1095, Клермон-Ферран, Франция). Дифференциальное С-окрашивание хромосом было выполнено д.б.н. Е. Д. Бадаевой, (Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН г. Москва), FISH-анализ выполнен к.б.н. И.Г. Адониной (ИЦиГ СО РАН г. Новосибирск).

Благодарности. Выражаю глубокую признательность д.б.н. Л.А. Першиной (ИЦиГ СО РАН) за ценные советы и рекомендации при подготовке рукописи диссертационной работы. Благодарю научного консультанта д.б.н. Е.А. Салину за помощь в написании диссертационной работы. Выражаю благодарность д-ру П. Мартинеку (Dr. P. Martinek), проф. Ватанабэ (Prof. N. Watanabe) и д.б.н. А.В. Войлокову за предоставление уникального растительного материла исследований и за плодотворное сотрудничество при изучении многоколосковых линий пшеницы и ржи. Выражаю глубокую признательность д-ру Ж. Сальсу (Dr. J. Salse) за помощь и сотрудничество при проведении позиционного клонирования. Выражаю благодарность д.б.н. Е.Д. Бадаевой и к.б.н И.Г. Адониной за помощь в исследовании кариотипов изучаемых линий пшеницы. Выражаю глубокую благодарность д.б.н. Л.И. Лайковой и О. М. Поповой за помощь и сотрудничество при получении гибридов и картирующих популяций пшеницы. Благодарю А.А. Красникова, сотрудника Центрального сибирского ботанического сада (г. Новосибирск), за помощь и сотрудничество в изучении развития соцветий злаков с использованием методов микроскопии. Благодарю к.б.н. В.С. Коваля за помощь в подготовке иллюстративного материала диссертации. Выражаю

благодарность К.И. Поповой (НГАУ, г. Новосибирск), О.А. Рощиной и М. В. Баклановой (ИЦиГ СО РАН) за помощь в проведении экспериментов. Благодарю за помощь и поддержку коллег из ИЦиГ СО РАН – член-корр. А.В. Кочетова, д.б.н. Ю.Л. Орлова и к.б.н. О.Г. Силкову. Благодарю за помощь и поддержку всех сотрудников лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики растений и лаборатории хромосомной инженерии злаков.

Исследования выполнялись при финансовой поддержке гранта по мобильности ученых от Департамента Науки, Технологии и Космоса Посольства Франции в России (2012) и грантов РФФИ (№№ 10-04-01458-а, 12-04-00897-а, 13-04-90932, 15-04-05371-а; 18-04-00483-а).

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Отдел покрытосеменных или цветковых растений включают два основных класса: двудольные (около 275 000 видов) и однодольные (около 65 000 видов) растения, а также небольшие таксоны — Magnoliids (2500 видов), Chloranthaceae (50 видов) и *Ceratophyllum* (5 видов) (Soltis et al., 2008). По результатам филогенетических исследований покрытосеменные растения возникли около 120 – 170 миллионов лет назад во временном промежутке от мелового периода до позднего триаса (Bell et al., 2005). Первые ископаемые растения с признаками покрытосеменных были обнаружены в пластах мелового периода (Magallon, 2010).

Среди однодольных растений самым многочисленным семейством является семейство орхидные Orchidáceae (Soltis et al., 2008), вторым по числу видов стоит важное в хозяйственном отношении семейство злаков Poaceae Barnh. (Gramineae Juss.), которое включает 759 родов, 11554 видов (Magallon, 2010). Злаки произрастают на всех континентах земного шара и составляют значительную часть многих биоценозов. К этому семейству принадлежат такие важные сельскохозяйственные культуры, как пшеница (Triticum L.), рис (Oriza L.), кукуруза (Zea L.), ячмень (Hordeum L.), рожь (Secale L.) (Цвелев, 1976). Рис и кукуруза относятся к трибам Orizea Dum. и Andropogoneae Dum., соответсвенно. Роды Triticum L., Aegilops L., Secale L. и Hordeum L. относятся к трибе Triticeae, включающей в целом более 150 видов разного уровня плоидности, среди которых мягкая пшеница *T.aestivum* L., твердая пшеница *T. turgidum* L., однозернянка *T. monococcum* L., рожь Secale cereale L., ячмень Hordeum vulgare L. – экономически важные хлебные зерновые культуры (Цвелев, 1976; Ortiz et al., 2008).

Род Triticum еще в начале прошлого столетия был разделен на три основные группы: однозернянки, эммеры и спельты, различающиеся по числу хромосом (Schulz, 1913; Sakamura, 1918). Было обнаружено, что однозернянки – это диплоиды с числом хромосом на диплоидный геном 14

(2n = 14), эммеры – тетраплоиды (2n = 14), а спельты являются гексаплоидами (2n = 42) (Sakamura, 1918). Цитогенетические исследование показали, что пшеницы имеют число хромосом на гаплоидный геном равное или кратное семи (у полиплоидных пшениц) (Feldman et al., 1995). В настоящее время пшеницы разделяют на диплоидные, тетраплоидные и гексаплоидные (Дорофеев и др., 1979; Гончаров, 2012).

Мягкая или хлебная пшеница *T. aestivum* L. (2n = 6x = 42) – одна из наиболее важных сельскохозяйственных культур, возделывается на 220 миллионах гектаров, является основным продуктом питания для 30% населения земного шара, обеспечивая 20% потребляемых человеком калорий (Shewry, 2009).

1.1. Эволюционная история злаков

Результаты филогенетических исследований И анализ данных секвенирования геномов высших растений, полученные за последние 20 лет, позволили выдвинуть гипотезу о происхождения однодольных растений, согласно которой они произошли от общего предка (Most Recent Common Ancestors, MRCA) (обзор Pont, Salse, 2017). Кариотип предполагаемого предка злаков (Ancestral Grass Karyotype, AGK) был представлен семью хромосомами (протохромосомами), 8 581 древними содержащими протогенов (Murat et al., 2014b).

Эволюция однодольных растений сопровождалась несколькими раундами дупликаций или полиплоидизации геномов. Полиплоидизация возникает в результате умножения полного набора хромосом. При умножении одного и того же генома образуются автополиплоиды, а при объединении в одном ядре разных геномов в результате отдаленной гибридизации формируются аллополиплоиды.

Полагают, что в результате древнего события тетраплоидизации (палеотетраплоидизации) предкового генома (n = 7), произошедшего 90 млн

лет назад, и последующих двух реципрокных транслокаций сформировался промежуточный кариотип предполагаемого предка злаков, состоящий из 12 протохромосом с 16 464 протогенами (Murat et al., 2014b). Современные геномы злаков имеют общее происхождение и могут быть реконструированы на основе семи (пре-тетраплоидизация) или двенадцати (посттетраплоидизация) хромосом предкового кариотипа.

За циклами полиплоидизации следовала структурно-функциональная диплоидизация геномов, в процессе которой целые блоки дуплицированных генов были делетированы, происходил сайленсинг генов, наблюдалась активация мобильных генетических элементов, реорганизация хромосом и, так называемое, субгеномное доминирование (Levy, Feldman, 2002; Chen, Ni, 2006; Wang et al., 2005; Pont, Salse, 2017). Субгеномное доминирование выражалось в сохранении копий генов одного из предковых геномов (один из дуплицированных блоков генов), далее эти участки генома оставались менее фракционированными (less fractionated, LF) или консервативными, в то же время происходила массовая потеря генных копий другого предкового генома, что приводило к появлению более фракционированных (more fractionated, MF) или пластичных участков генома (Salse, 2016).

Феномен субгеномного доминирования был обнаружен и у двудольных, A. thaliana (Thomas et al., 2006), хлопчатника (Renny-Byfield et al., 2015), и у однодольных растений – злаков (Woodhouse et al., 2010; Schnable et al., 2012a, пластичными Schnable et al., 2012b). Различия между (MF)И консервативными (LF) районами геномов растений заключаются не только в различном уровне делеций или сохранности предковых генов, но и (1) в смещении функционального репертуара дуплицированных генов, сохранившихся (палеотетраплоидизация) тройках В парах ИЛИ (2)преобладающей (палеогексаплоидизация), В экспрессии генов, принадлежащих LF-району по сравнению с MF-районом, (3) в большей однонуклеотидных (SNP) И инсерционно-делеционных частоте полиморфизмов пластичных MF-районов, (4) в неодинаковом распределении

мобильных элементов, некодирующих малых РНК и эпигенетических меток (Edger, Pires, 2009; Cheng et al., 2012, 2013; 2014; 2016a, 2016б; Fang et al., 2012). Вследствие этих структурно-функциональных изменений геномов происходила дивергенция на независимые филогенетические ветви, и формировались новые таксоны (Wang et al., 2005; Salse, 2012). Гибридизация между представителями дивергировавших таксонов растений с последующей дупликацией геномов приводила к появлению новых полиплоидов.

У представителей подсемейства рисовые Oryzoideae сохранилось число хромосом предполагаемого промежуточного предка злаков (n = 12). В ходе эволюции геном риса претерпел хромосомные перестройки (Pont, Salse, 2012). Анализ хромосомной локализации более 2000 дуплицированных генов риса *O. Sativa* L. показал, что основная часть дуплицированных блоков хромосом риса имеет относительно небольшой размер, что предполагает большое число транслокаций, которые произошли после дупликации генома (Goff et al., 2002).

Формирование предкового генома представителей подсемейства просовые Panicoideae (n = 10) сопровождалось слиянием двух хромосом предполагаемого промежуточного предка злаков (Pont, Salse, 2017). Структура современного генома сорго *Sorghum bicolor* (L.) Moench сходна с предковым геномом Panicoidea, а геном кукурузы, Z. mays L. (n = 10) прошел через цикл полиплоидизации. Кукуруза является древним сегментным аллотетраплоидом (Gaut, Doebley, 1997; Gaut, 2001), ее геном возник в результате дупликации базового набора хромосом и последующих транслокаций и слияний хромосом (Salse, 2012).

1.2. Происхождение и эволюция мягкой пшеницы T. aestivum L.

Формирование предкового кариотипа подсемейства Pooideae (хромосомы T1-T7) из промежуточного предкового кариотипа злаков (хромосомы A1-A12) сопровождалось несколькими хромосомными слияниями и предковый кариотип трибы Triticeae состоял из семи хромосом:

T1 = A10 + A5, T2 = A7 + A4, T3 = A1, T4 = A11 + A3, T5 = A9 + A12, T6 = A2, T7 = A8 + A6 (Salse, 2012; Pont, Salse, 2017). Современный геном ячменя *H. vulgare* сохранил первоначальное число хромосом (n = 7) и кариотип этого вида в настоящее время считают референсным в исследованиях по сравнительной геномике Triticeae (Murat et al., 2014a). Дивергенция Triticeae предкового генома вследствие дупликаций целого генома (аллополиплоидизации) или его отдельных сегментов, крупных хромосомных перестроек привела к образованию новых таксонов (Salse et al., 2009; Abrouk et al., 2010; Pont et al., 2011).

Мягкая пшеница *T. aestivum* L. имеет сложную эволюционную историю и возникла в результате двух циклов аллополиплоидизации. 0.5 млн лет назад произошла гибридизация между диплоидным видом *T. urartu* Thum. ex Gandil. (2n = 2x = 14; геном AA), дикой однозернянкой, и видом (видами) наиболее близким(и) современному виду *Aegilops speltoides* Tausch (2n = 2x = 14; геном SS), в результате чего возник природный аллотетраплоид – вид *T. dicoccoides* (Korn. ex Aschers. et Graebn.) Schweinf. (2n = 2x = 28; геном BBAA) (Feldman et al., 1995; Huang et al., 2002; Salamini et al., 2002; Petersen et al., 2006). Второй цикл аллополиплоидизации между тетраплоидным видом пшеницы *T. dicoccum* (Schrank) Schuebl. (2n = 4x = 28; геном BBAA) и диплоидным видом *Ae. tauschii* Coss. (2n = 2x = 14; геном DD) возник аллогексаплоидный вид – мягкая пшеница *T. aestivum* L. (2n = 6x = 42; геном BBAADD) (Feldman et al., 1995; Huang et al., 2002) (Рисунок 1.1).

Результаты многих исследований показали, что субгеном А эволюционно наиболее близок геному вида *T. urartu* (обзор Rasheed et al., 2018). Изучение эволюционной динамики мобильных элементов и мутаций субгеномов пшеницы и близкородственных диплоидных видов обнаружило, что 71% мутаций предкового генома A (ancestor A, AncA) перешли в современный субгеном A (El Baidouri et al., 2017).

Предок генома В остается неизвестным, так как дикорастущие виды с высокой степенью гомологии к субгеному В пшеницы найдены не были. На настоящий момент остается не ясным моно- или полифилитическое происхождение имеет геном В. Предложено две гипотезы: 1) существовал единственный предок генома В, которым являлся вид генетически близкий к Ae. speltoides, 2) геном В произошел в результате гибридизации с несколькими неизвестными представителями секции Sitopsis (полифилетическое происхождение) (обзор Rasheed et al., 2018). По данным El Baidouri с соавт. (2017) современный субгеном В унаследовал только 42% мутаций ОТ предкового генома AncB близкородственного геному Ae. speltoides. Авторы предположили, что причина найденных различий может быть связана не столько с происхождением, но и с большим накоплением мутаций.

Субгеномы A, B и D пшеницы имеют общее происхождение. Сравнительный анализ ассемблированных геномов пшеницы и диплоидных близкородственых видов показал, что дивергенция геномов А и В от общего предка произошла 7 млн. лет назад, то есть задолго до возникновения тетраплоидного генома пшеницы (Marcussen et al., 2014). Происхождение генома D в настоящее время является предметом широкой дискуссии. Marcussen с соавт. (2014) на основе анализа ассемблированных геномов мягкой пшеницы и пяти диплоидных близкородственных видов предложил сценарий гомоплоидного происхождения генома D, который предполагает, что этот геном произошел в результате гомоплоидной гибридизации с предковыми А- и В-геномами с сохранением у гибрида числа хромосом, характерного для родительских видов. Li с соавт. (2015a, 2015b) провели оценку ассемблированных ядерных и хлоропластных геномов пшеницы и близкородственных диплоидных видов, в результате чего пришли к выводу, что гомоплоидное происхождение генома D было более сложным, чем предполагалось paнee (Marcussen et al., 2014), и включало несколько раундов гибридизации в разные промежутки времени.



Рисунок 1.1 – Схематическая диаграмма, изображающая происхождение генома мягкой пшеницы *T. aestivum* (Mayer et al., 2014)

В гибридизации участвовали не только виды с предковыми геномами А и В, но и независимый предок D-генома.

Таким образом, мягкая пшеница *Т. aestivum* является естественным аллогексаплоидом, субгеномы А, В и D которого общее имеют происхождение и ко-эволюционировали в составе единого генома на протяжении длительного периода времени. Наряду с крупными событиями процессе эволюции аллополиплоидизации, В пшеницы произошли специфичные для этого вида транслокации между хромосомами 4А-5А и 4A-7B (El Baidouri et al., 2017).

Формирование аллополиплоидного генома пшеницы сопровождалось субгеномным доминированием (Pont et al., 2013; El Baidouri et al., 2017). Сравнительный анализ последовательностей ДНК риса, сорго, кукурузы и Brachypodium distachyon (L.) Р.Веаич. показал, что геномное доминирование наблюдалось при формировании древнего 12-хромосомного промежуточного кариотипа, в результате чего современные злаки, включая представителей Triticeae, унаследовали древние LF- и MF-блоки хромосом (Pont, Salse, 2017). Процесс формирования тетраплоидного (0.5 млн лет назад) и гексаплоидного (10000 лет назад) геномов пшеницы также сопровождался субгеномным доминированием, при котором субгеном А стал доминирующим (стабильным, консервативным), а субгеном В – восприимчивым (склонным к накоплению мутаций). Второй цикл полиплоидизации привел к свехдоминированию, при котором тетраплоидный геном (субгеномы А и В) стал восприимчивым, а субгеном D доминирующим (Pont et al., 2013; Pont, Salse, 2017; El Baidouri et al., 2017). В результате нескольких циклов аллополиплоидизации, каждый из которых сопровождался субгеномным доминированием, в современном геноме пшеницы сформировались наиболее стабильные районы: хромосомы 2DS, 2DL, 3D, 4D, 5DL, 6DS, 6DL и наиболее пластичные районы: 1B, 2B (центромера), 5BS, 6B (центромера), 7B (Pont, Salse, 2017).

Таким образом, аллополиплоидизация играла важное значение в эволюционной истории злаков. Наличие нескольких близкородственных

субгеномов у аллополиплоидов способствует сохранению функционального состояния генома в случаях возникновения крупных хромосомных перестроек, вплоть до потери целых хромосом.

1.3. Особенности организации геномов злаков

ДНК растений ядерного генома состоит ИЗ уникальных И кодирующих ДНК, низкокопийных последовательностей а также ДНК, включая высокоповторяющиеся повторяющейся умерено-И (Heslop-Harrison, Schmidt, 1998). Умереннопоследовательности повторяющиеся последовательности могут выполнять кодирующие функции (гены рибосомальной РНК). Высокоповторяющаяся ДНК, как правило, не кодирует белки и представлена в основном мобильными элементами.

Отличительной особенностью злаков является ядерного генома высокое содержание (до 90–95%) высоко повторяющихся последовательностей ДНК (Li et al., 2004; Paux et al., 2006). Наиболее крупным классом повторяющихся элементов у растений являются LTRретротранспозоны, они составляют более половины размера их геномов. У пшеницы транспозонами представлено от 5 до 11% ДНК, на долю остальных повторяющихся последовательностей ДНК приходится около 30% (Paux et al., 2006). Причины высокого содержания повторяющихся последовательностей ДНК растений до конца не ясны, полагают, что они играют важную роль в поддержании структуры хромосом, распознавании и расхождении хромосом во время митоза и мейоза, выполняют функцию защиты теломерных участков хромосом (Vershinin et al., 1995; Kubis et al., 1998, Sykorova et al., 2003). Обнаружено, что видообразование у растений сопровождается быстрыми изменениями фракции повторяющихся последовательностей ДНК (Flavell et al., 1979; Cuadrado, Jouve, 2002; Dvorak, 1998).

Размер ядерного генома высших растений варьирует в широких пределах: от 119 м.п.н (миллион пар нуклеотидов) до 17 000 м.п.н (Salse,

2012), при этом средний размер генома высших растений у однодольных составляет 10 200 м.п.н, а у двудольных – 2 800 м.п.н. Число генов у растений варьирует в широких пределах: от 19 000 до 58 984 (Salse, 2012). Разница в размере геномов прежде всего связана с различным содержанием мобильных элементов. Так, например, геном A. thaliana, размер которого составляет 119 м.п.н. содержит 19% мобильных элементов, а в геноме кукурузы (2 365 м.п.н.) – 84% мобильных элементов (Salse, 2012). Различия в близкородственных размере геномов таксонов являются следствием событий, например, полиплоидизации, Эволюционных при которой происходит мультипликация целых геномов или амплификации отдельных последовательностей ДНК. Кроме того, межвидовая гибридизация сопровождалась делециями ДНК (Ma, Gustafson, 2008).

Большой размер и сложный состав геномов злаков представителей трибы Triticeae, существенно затрудняли их секвенировние. Так, если геном риса *O. sativa*, размер которого составляет 450 м.п.н., был «прочитан» в 2005 году (International Rice Genome Sequencing Project, 2005), то первые результаты чернового секвенирования генома пшеницы появились в 2012 году (Brenchley et al., 2012). Результаты полногеномного секвенирования мягкой пшеницы, определение референсных последовательностей хромосом пшеницы были получены только в 2017 году (IWGSC Reference Sequence v1.0, http://www.wheatgenome.org/).

Отсутствие референсного генома пшеницы существенно затрудняло выделение генов и изучение генетических механизмов, лежащих в основе формирования фенотипических признаков мягкой пшеницы. К числу таких признаков относятся качественные и количественные характеристики соцветия пшеницы, колоса, которые непосредственно связаны с продуктивностью этой экономически значимой зерновой культуры.

1.4. Строение цветка и соцветия злаков

Цветок является важнейшей репродуктивным органом покрытосеменных растений, непосредственно связанным с процессами опыления, оплодотворения и развития зародыша, формированием семян и плодов. Изучение механизмов, лежащих в основе развития и роста цветка и соцветия – важная фундаментальная проблема современной биологии и генетики развития растений, имеющая очевидную практическую важность.

Главная особенность цветка злаков – его приспособление к опылению ветром, выражающееся в редукции околоцветника, формировании крупных пыльников, выработке большого количества пыльцы. У многих представителей злаков имеются обоеполые цветки, но встречается немало видов и родов с раздельнополыми цветками, которые могут находиться в пределах одного колоска, соцветия или растения, а также соцветий разных растений (двудомность), например, у видов *Festuca* sect. Leucopoa (Цвелев, 1976).

Гинецей (совокупность плодолистиков/пестиков цветка) злаков одноплодолистиковый с двумя-тремя перистыми рыльцевыми ветвями, иногда срастающимися по всей длине, с одним семязачатком (Цвелев, 1976).

У большинства современных злаков имеется три тычинки, но встречаются некоторые роды с 1-2 тычинками, например, *Cinna* L. (одна тычинка), *Diandrochloa* de Winter (две тычинки). Общий предок злаковых имел, по-видимому, 6 тычинок, расположенных в два круга. Такое число тычинок сохранилось в настоящее время у большинства бамбуков, многих представителей трибы Orizeae. В результате вторичного ветвления шести тычиночных нитей у представителей рода *Ochlandra* Thwait. (тропических бамбуков) может формироваться до 120 тычинок. Срастаясь между собой, тычиночные нити могут образовывать трубку, как у бамбуков *Gigantochloa* Kurz. (Цвелев, 1976).

Цветки содержат небольшие бесцветные чешуйки, злаков расположенные между пыльниками и цветковыми чешуями, - цветковые пленки или лодикулы (лат. lodicula). Число и морфологические особенности строение лодикул (форма, наличие И трихом И дp.) являются систематическим признаком и характеризуют не только отдельные роды, но и целые трибы. Цветки злаков обычно содержат по две, реже три лодикулы. Выполняемые лодикулами функции разнообразны и определяются их строением: защита цветка от механических повреждений, накопление питательных веществ для развития зерновки, раздвигание цветковых чешуй во время цветения (Цвелев, 1976). У пшеницы имеется пара лодикул, основная функция которых заключается в раздвигании цветковых чешуй (Дорофеев и др., 1979).

Характерная особенность цветка злаков – наличие пары чешуевидных прицветных листьев (брактей), которые закрывают репродуктивные органы цветка и называются верхняя (palea) и нижняя (lemma) цветковые чешуи. В то врем как природа верней цветковой чешуи не вполне ясна, нижнюю чешую считают видоизмененным кроющим листом, при этом сама нижняя цветковая чешуя гомологична листовому влагалищу, а ость, отходящая от ее верхушки, – листовой пластинке. На верхней цветковой чешуе отсутствуют какие-либо придатки в виде остей. У многих родов злаков верхние цветковые чешуи имеют вид очень мелких чешуек без жилок или полностью редуцированы, как, например, у ряда видов *Agrostis* (Цвелев, 1976).

У представителей семейства злаков (Poaceae) цветки собраны в соцветия. Соцветия всех злаковых, за исключением одной рано дивергировавшей ветви, подсемейства Anomochlooideae, характеризуются общей чертой – цветки развиваются в составе определенной структуры – колоска. Н.Н. Цвелев (1976) определял колосок, как элементарное соцветие злаковых, а в современной англоязычной литературе колосок обычно рассматривают как укороченную/редуцированную веточку, при этом термин "spikelet" обозначает миниатюрный колос (Malcomber et al., 2006).

Колосок имеет сходное строение и общие черты развития у всех злаков. В состав колоска большинства злаков входят цветки, состоящие из завязи, пыльников, лодикул, цветковых чешуй, которые заключены в колосковые чешуи. Многоцветковый колосок состоит из оси колоска (rachilla), на которой поочередно двумя рядами расположены цветки, заключенные в цветковые чешуи, а у основания колоска располагается пара брактей (чешуевидных прицветных листьев), не имеющих цветков, верхняя и нижняя колосковые чешуи (glumae). Размер колосковых чешуй злаков варьирует от очень крупных, охватывающих весь колосок, до мелких или даже полностью редуцированных. В многоцветковых колосках они часто сходны по строению с нижними цветковыми чешуями (Цвелев, 1976). Обобщенная схема строения колоска злаков представлена на Рисунке 1.2.



Рисунок 1.2 – Схематическое изображение многоцветкового колоска злаков. ВКЧ – верхняя колосковая чешуя; Ло – лодикулы; ВЦвЧ – верхняя цветковая чешуя; Зав – завязь с рыльцевыми ветвями; НК – ножка колоска; НКЧ – нижняя колосковая чешуя; НЦвЧ – нижняя цветковая чешуя; ОБП – ось бокового побега, несущего цветок; ОК – ось колоска; Тч – тычинки (Цвелев, 1976)

У представителей подсемейства Anomochlooideae колоска, как такового, нет, но есть его «эквивалент», лишенный колосковых и цветковых чешуй (Clark, Judziewicz, 1996) (Рисунок 1.3). Подсемейство Pharoideae – самая ранняя эволюционная ветвь, у которой наблюдается формирование типичного колоска (Malcomber et al., 2006).



Рисунок 1.3 – Филогения злаков с обозначением основных морфологических преобразований (обозначены красными точками): супрессии брактей (suppressed bract), формирования колоска (spikelet), образования парных колосков (paired spikelets), щетинок (bristles), формирования двурядного расположения колосков в соцветии (distichous phylotaxy) (Bommert, Whipple, 2017)

Число цветков в колоске злаков варьирует от 1 до 10 (иногда до 30). Н.Н. Цвелев (1976) рассматривал одноцветковые и двуцветковые колоски в качестве редукции первичных многоцветковых колосков, полагая, что эволюция колосков шла по пути уменьшения числа цветков, но сами колоски образовывали сложные соцветия. Malcomber с соавт. (2006) сообщает, что появление многоцветкового колоска у злаков происходит после отделения эволюционной ветви Pharoideae.

Таким образом, колосок представляет собой элементарное соцветие в составе сложного соцветия злаков.

Соцветия немногочисленных представителей злаков (например, рода *Lygeum*) представлено единственным терминальным (верхушечным) колоском, у большинства же представителей злаковых соцветие имеет более сложное строение. Длина и особенности строения главной оси соцветия, степень ветвления, расположение и развитие боковых веточек, обуславливают большое разнообразие в строении соцветий злаков.

В классической таксономической литературе колосок было принято рассматривать в качестве аналога цветка, как терминальной структуры боковой оси соцветия (Malcomber et al., 2006), на основе чего соцветия злаков были разделены на следующие типы:

1. Колос – соцветие, у которого колоски располагаются непосредственно на оси колосового стержня (сидячие колоски), как у пшеницы, ржи и ячменя, при этом, если колоски одноцветковые, колос является простым, если же колоски многоцветковые – сложным;

2. Метелка представляет собой разветвленное соцветие, колоски которого развиваются на боковых осях (веточках) разного порядка. Метелка встречается у большинства представителей злаков, включая рис, овсы, сорго, просо. Число, длина и расположение веточек может варьировать, и метелка может быть густой или редкой, сжатой или раскидистой. Если веточки метёлки многочисленны и коротки, то формируется колосовидная метёлка;

3. Кисть (или кистевидная метелка) – соцветие, колоски которого расположены на главной оси на ножках (стебельках), примером кистевидной метелки может служить соцветие представителей рода *Brachypodium* P. Beauv. (коротконожка).

Кроме того, у злаков (например, представителей родов сорговых, просовых) встречаются смешанные типы соцветий, у которых сложные колосья собраны в пучки или метелки (Цвелев, 1976).

Соцветие злаков может быть, как терминальным (или верхушечным), так и аксиальным, формироваться в пазухах листа. У большинства злаков морфология терминального и аксиальных соцветий одинакова, исключение составляют представители трибы Andropogoneae (кукуруза, сорго, сахарный тростник), аксиальные соцветия которых менее разветвлены (Malcomber et al., 2006). Наиболее это выражено на соцветиях кукурузы *Z. mays,* терминальное соцветие которой, метелка, разветвлено, а аксиальное соцветие, початок (колосовидное соцветие с утолщенной осью), не разветвлено.

Соцветие представителей трибы Triticeae, к которому относятся такие важные зерновые культуры как пшеница, ячмень и рожь, представляет собой колос и в норме не разветвлено; колоски расположены непосредственно на главной оси колоса, на уступах колосового стержня. У гексаплоидной мягкой пшеницы *T. aestivum* (BBAADD) рост главной оси колоса детерминирован и заканчивается формированием верхушечного (терминального колоска), у диплоидной пшеницы *T. monococcum* (AA) терминальный колосок либо рудиментарен, либо отсутствует (Bonnet, 1936). В отличие от пшеницы, рост оси колоса ячменя *H. vulgare* не детерминирован и колос ячменя не имеет верхушечного/терминального колоска (Bonnet, 1936).

Число латеральных сидячих колосков на уступе колосового стержня может различаться и является важной таксономической характеристикой (Muramatsu, 2009; Sakuma et al., 2011). Оно может быть фиксированным, или варьировать (Muramatsu, 2009). Так, у пшеницы и ржи на уступах колосового стержня располагается по одному сидячему колоску, а у ячменя либо один колосок (двурядный колос), либо три колоска (шестирядный колос). Нефиксированное число колосков на уступе формируется у представителей рода *Elymus* L. (Muramatsu, 2009).

1.4.1. Морфологическая характеристика соцветия пшеницы (род *Triticum* L.)

Соцветия видов пшеницы рода *Triticum* L. являются терминальными и формируются в верхней части стебля. Колосовой стержень длиной 3–15 см состоит из члеников, в верхней части каждого из которых расположено по одному сидячему колоску, колоски расположены двумя правильными продольными рядами, формируя двурядный колос. Колосок пшеницы
многоцветковый и содержит 2-4 (до 7) цветка, расположенные на оси колоска. Цветки в верхней (дистальной) части колоска не развиваются полностью и/или стерильны, из 2–4 (до 7) цветков плодущими являются 1–3 (до 4). Колосок имеет две колосковых чешуи (исключение – вид *T. jakubzineri* Udacz. et Schachm., у которого формируется 4 колосковых чешуи) длиной 9-17 мм, редко (у *T. polonicum*) длиной 25-32 мм, выполняющие защитные функции. Между колосковыми чешуями на оси колоска расположены обоеполые цветки. Каждый цветок прикрыт и защищен цветковыми чешуями – наружной (нижней) и внутренней (верхней). Наружные цветковые чешуи длиной 7–17 мм (реже 15–20 мм у *T. polonicum* L.) несут ость у остистых форм или остевидный придаток у безостых форм. Внутренние чешуи обычно несколько короче наружных. Между наружной и внутренней чешуями расположены генеративные органы цветка – завязь и три тычинки. У основания завязи находятся две бесцветные пленочки (лодикулы), которые при цветении набухают, способствуя открыванию цветка (Цвелев, 1976; Дорофеев и др., 1979).

Пшеница – самоопыляющееся растение, однако она не является облигатным самоопылителем и у нее может наблюдаться перекрёстное опыление при помощи ветра. Плод – зерновка, не срастающаяся с цветковыми чешуями у голозерных форм (например, *T. turgidum* L.) или срастающаяся – у пленчатых форм (например, *T. dicoccoides*). Виды пшеницы разного уровня плоидности различаются числом зерновок в колоске. Так, диплоидные виды пшеницы содержат по одной зерновке в колоске, тетраплоидные по 2 (редко 3), а гексаплодиные – 4 (редко 5–6) (Цвелев, 1976; Дорофеев и др., 1979; Shitsukawa et al., 2009).

1.4.2. Многоколосковые формы пшеницы

Практически все виды пшеницы имеют простой колос. Исключением является тетраплоидная пшеница тучная *T. turgidum* (BBAA).

Ветвистоколосые формы *T. turgidum* известны около 2000 лет, Плиний Старший упоминал их под названием *ramosum* и *centigranum* (23–79 гг. н.э.) (Дорофеев и др., 1979). За долгую историю существования ветвистые формы пшеницы тучной получили множество различных названий: "*Miracle*", "*Mummy*", "*Egyptian*", "*Seven-headed*" и др. (Dahlgren, 1922; Дорофеев и др., 1979). В 18-м веке К. Линней выделил ветвистоколосую пшеницу в отдельный вид *T. compositum* (Дорофеев и др., 1979). В дальнейшем систематики рассматривали ее как особую группу вида *T. turgidum* или его ветвистоколосые разновидности. В настоящее время ветвистоколосые формы выделены в группу *T. turgidum* convar. *comositum* (L.f) А. Filat., которая включает в себя около двадцати разновидностей (Дорофеев и др., 1979). Все эти ветвистоколосые формы *T. turgidum* имеют общий фенотип колоса: дополнительные колоски развиваются на боковых осях («веточках») колоскового стержня и непосредственно на уступах колосового стержня. Колос такого типа получил название тургидного.

Percival (1921) дает детальное описание колоса тургидного типа в монографии "The wheat plant": верхняя часть колоса нормального типа с единичными колосками на уступах колосового стержня, на нескольких нижних уступах развивается по два колоска, распложенных рядом под прямым углом друг к другу. «Веточки» или «вторичные колосья» варьируют по длине, наиболее длинные достигают 3-4 см, каждая из которых содержит по 10-14 колосков, зерновки обычно видны из-под коротких колосковых чешуй. Базальные вторичные колосья обычно рудиментарны и несут Несмотря миниатюрные колоски. широкое распространение, на ветвистоколосые формы пшеницы *T. turgidum* не культивируются в больших масштабах. Хорошо развитый колос тургидного типа разновидности *T. turgidum* var. *mirabile* Körn, наиболее возделываемой пшеницы с ветвистым колосом, состоит из 115–120 колосков, которые содержат до 140–150 зерновок, для среднеразвитого колоса эти показатели составляют 85-90 колосков и до 80-100 зерновок.

Ареалы произрастания и экологические характеристики групп *T. turgidum* convar. *compositum* и *T. turgidum* convar. *turgidum* в целом совпадают, однако среди тибетского экотипа ветвистоколосые формы отсутствуют (Дорофеев и др., 1979).

Среди представителей твердой пшеницы вида Т. durum (BBAA) ветвистоколосые формы менее распространены (Дорофеев, 1968; Дорофеев и 1979). сообщил дp., Coffman (1924)0 появлении спонтанных многоколосковых мутантов в посевах твердой пшеницы Т. durum сорта Mindum. Фенотип колоса обнаруженных мутантов отличался от тургидного тем, что два, реже три дополнительных сидячих колоска, развивались непосредственно уступах колосового стержня. В 1952 г. на были найдены М.М. Якубцинером ветвистоколосые формы твердой пшеницы в сортах Акмолинка 5 и Гордеиформе 10 и выделены в новые разновидности ramosohodeiforme и ramosoapulicum (Дорофеев, 1968). В.Ф. Дорофеев во время экспедиции по Закавказью в 1961–1964 гг. обнаружил оригинальные формы твердой пшеницы с ветвистым колосом – var. ramosohodeiforme и var. ramosoapulicum в естественных условиях произрастания пшеницы, где встречались многие разновидности твердой, тучной и мягкой пшениц (Дорофеев, 1968).

Ветвистоколосые формы и формы с двойными колосками были обнаружены у тетраплоидной пшеницы вида *Т. dicoccum*, отмечалось гибридное происхождение некоторых ветвистоколосых образцов этого вида. Изредка ветвистоколосые формы встречались среди образцов тетраплоидного вида *Т. polonicum* (Percival, 1921).

Диплоидные виды пшеницы (АА) имеют простой колос, ветвистоколосых форм диплоидных видов пшеницы описано не было (Дорофеев и др., 1979; Гончаров, 2012). Индуцированные мутанты с ветвистым колосом были получены д-ром Yamashita во второй половине прошлого века (Amagai et al., 2014b).

Формирование ветвистого колоса не характерно для мягкой пшеницы T. aestivum L. (BBAADD), как и для гексаплоидных пшениц в целом. По сообщению Coffman (1924) формы мягкой пшеницы с дополнительными колосками на уступах колосового стержня были описаны Meunssier в 1918 г. По фенотипу колоса эти формы напоминали спонтанных мутантов сорта Mindum твердой пшеницы. Percival (1921) описывает формирование дополнительных (сверхчисленных) колосков у мягкой пшеницы T. aestivum, обращая внимание на то, что они могут развиваться (1) под прямым углом к основному колоску на одном уступе или же (2) в параллельных плоскостях один над другим. Часто такие дополнительные колоски (второго типа) рудиментарны, состоят из видоизмененных колосковых чешуй, но изредка в них развиваются по одному-два зерна. Наиболее часто дополнительные колоски подобного типа встречаются у китайских сортов мягкой пшеницы на более поздних побегах, в то время как первый колос выглядит вполне нормальным. Признак проявляется не каждый сезон, но может возникать повторно (Percival, 1921).

Ветвистоколосые формы мягкой пшеницы могут появляться в результате отдаленной гибридизации (Цицин, 1954; Алиева, Аминов, 2013) и воздействия мутагенами (Мельник, Пастухов, 1984; Sharman, 1944; Swaminathan et al., 1966). Так, Swaminathan и соавторы (1966) сообщили о получении мутанта N.P. 797 мягкой пшеницы с тургидным типом колоса в результате воздействия изотопом S³⁵ на семена мягкой пшеницы. Линии мягкой пшеницы с дополнительными/сверхчисленными колосками на уступах были выделены В.В. Мельником (Мельник, Пастухов, 1984) при обработке семян пшеницы сорта Саратовская 29 химическим мутагеном нитрозометилмочевиной.

Спонтанно ветвистоколосые формы мягкой пшеницы появляются редко. Koric (1973, 1980) сообщила о получении ветвистоколосой формы мягкой пшеницы на основе спонтанного мутанта – ветвистоколосого тератологического растения, обнаруженного среди потомков F₆ от

скрещивания сортов мягкой пшеницы с нормальным колосом. Фенотип колоса этой формы был аналогичен тургидному типу колоса *T. turgidum*. Признак стабильно наследовался и был перенесен в различные сорта мягкой пшеницы, которые было предложено выделить в отдельную группу *Triticum aestivum ramifera* S.K. Еще одним примером спонтанного образования многоколосковых форм мягкой пшеницы является Тибетская трехколосковая пшеница *Triticum aestivum* L. concv. *tripletum* (Li et al., 2011).

Со второй половины прошлого века для описания ветвистых колосьев и колосьев с дополнительными сидячими колосками на уступах было предложено использовать один обобщающий термин "supernumerary spikelets, SS" – колос со сверхчисленными колосками (Pennel, Halloran, 1983). Термин получил широкое распространение и используется в настоящее время для описания всех многоколосковых форм пшеницы. Группа многоколосковых форм (SS-форм) пшеницы гетерогенна. Уже в ранних работах Koric (1973, 1980), Pennel и Halloran (1983) выделяли два типа. Первый тип получил название «колос с истинной ветвистостью» (Ramified Spike, RS; синоним – Genuine Branching, GB), у которого наблюдается формирование боковых осей/«веточек» и дополнительные колоски развиваются, как на уступах, так и на «веточках». К этому типу относится тургидный тип ветвления T. turgidum. У второго типа многоколосковых форм дополнительные колоски сидячие и формируются непосредственно на уступах колосового стержня, чаще всего по два колоска на уступе. Такой тип получил название четырехрядный колос (Four Rowed Spike, FRS; синоним tetrastichon), он встречается как у тетраплоидных видов T. durum и T. turgidum (Coffman, 1924; Klindworth et al., 1990а), так и у гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* (Martinek, 1998).

Martinek и Bednar (Martinek, 1998; Martinek, Bednar, 2001) в зависимости от взаимного расположения дополнительных сидячих колосков на уступах колосового стержня пшеницы предложили выделять несколько нестандартных морфотипов колоса:

1) Многорядный колос (multi-row spike, MRS) – кластеры сверхчисленных колосков (до 10 колосков) расположены на одном уступе колосового стержня;

2) Горизонтальные колоски (horizontal spikelets, HS), синоним «tetrastichon sessile spikelets» – два или три колоска расположены на уступе колосового стержня в горизонтальной плоскости, к этому морфотипу относится описанный выше FRS;

3) Вертикальные или парные колоски (VSS, vertical sessile spikelets) – пара колосков расположены на уступе один над другим в параллельных плоскостях, этот фенотип также называли "banana spikelets" или "tween spikelets" (Sears, 1954).

4) Выделенный Martinek и Bednar (2001) морфотип «истинное ветвление колоса» (Genuine Branching, GB) полностью соответствует описанному ранее фенотипу RS/тургидный тип ветвления колоса (Koric, 1973, 1980; Pennel, Halloran, 1983).

Наряду с истиной ветвистоколосостью мягкой пшеницы, колос пшеницы Вавилова *T. vavilovii* (Thum.) Jakubz. (BBAADD) часто также называют ветвистым. Однако фенотип колоса существенно отличается от колоса с тургидным типом ветвления, так как дополнительные колоски на уступах колосового стержня этой пшеницы не развиваются, а наблюдается удлинение оси колоска, на которой формируется множество цветков (Дорофеев и др., 1979). Такой тип ветвления колоса называют вавилоидным, а морфотип получил название ложная ветвистость колоса (sham ramification, SHR) (Martinek, 1998). Тетраплоидная пшеница Якубцинера *T. jakubzineri* (BBAA) имеет сходный фенотип, ложноветвистый колос (Amagai et al., 2014а). Алиева и Аминов (2013) показали, что формы с вавилоидным типом ветвления колоса могут возникать в результате отдаленной гибридизации.

Наряду с истинной и ложной ветвистостью колоса выделяют ложноистинное ветвление (false-true ramification или false-true ramified spike, f-tRS)

(Amagai et al., 2017). У этого морфотипа формируется удлиненная ось колоска, на которой развиваются, как сверхчисленные колоски в дистальной части, так и пара нормальных зерновок в базальной части. Данный морфотип описан у образцов тетраплоидной пшеницы *T. turgidum* (Amagai et al., 2017).

1.4.3. Изучение генетической регуляции признака «ветвистоколосость/ многоколосковость» пшеницы

Генетику ветвистоколосости/многоколосковости пшеницы начали изучать более 100 лет назад. В 1910 г. Е. von Tschermak сообщил, что признак ветвистоколосости T. turgidum генетически детерминирован, находится под моногенным рецессивным контролем. Ген был обозначен bh от лат. brachitus (Гончаров, 2012). Рецессивный характер наследования признака У тетраплоидных и гексаплоидных пшениц был позднее подтверждён результатами многих исследований (Pennell, Halloran, 1983; Klindworth et al., 1990a; Peng et al., 1998; Martinek, Bednar, 2001).

Было обнаружено, что на стабильность экспрессии признака ветвистоколосости оказывают воздействие факторы окружающей среды, в том числе температура, фотопериод (Sharman, 1944; Pennell, Halloran, 1983). Вместе с тем обнаружили стабильную экспрессию признака у отдельных линий, что свидетельствует о влиянии генотипической среды (Pennell, Halloran, 1983).

(1967) Sharman сообщил 0 моногенном типе наследования ветвистоколосости у тетраплоидной пшеницы. По результатам исследований Klindworth с соавт. (1990а) RS-фенотип линии PI1349056 тетраплоидной пшеницы T. turgidum детерминирован одним главным геном, на экспрессию которого оказывают влияние гены С минорными эффектами. С использованием серии дисомных замещенных линий по хромосомам Dгенома тетраплоидной пшеницы 'Langdon', главный ген, *bh*, был локализован в хромосоме 2A (Klindworth et al., 1990b), затем с помощью 'Langdon' 2A-

телоцентрической линии была уточнена его локализация в коротком плече 2AS (Klindworth et. al., 1997).

По результатам исследований Когіс (1973, 1980), выполненных на потомках спонтанного ветвистоколосого мутанта (*T. aestivum ramifera*), гексаплодиные пшеницы несут два комплементарно взаимодействующих гена Rm (ramifera) и *Ts* (tetrastichon), а также доминантный ингибитор, *Nr* (*Normalizator*).

Реппеll и Halloran (1983) сообщили о наличии у мягкой пшеницы (линия AUS 15910) двух рецессивных генов, определяющих многоколосковость и, в дополнение к ним, наличие супрессора ветвистости. Было показано, что коммерческие сорта пшеницы со стандартным колосом несут гены ветвистости колоса, которые не проявляются из-за присутствия гена-супрессора (Pennell, Halloran, 1983). Klindworth с соавт. (1990b) подтвердили наличие гена-супрессора ветвистости колоса в геноме мягкой пшеницы и локализовали его в хромосоме 2D.

Peng с соавт. (1998) с использованием моносомного анализа обнаружили, что хромосомы 2D, 4A, 5A и 4B (минорный эффект) включены в генетический контроль тургидного типа колоса у линии мягкой пшеницы "Yupi Branching", показывая, таким образом, полигенный характер наследования признака. Влияние генетического фактора(ов) хромосомы 2D на формирование сверхчисленных колосков у индуцированного мутанта мягкой пшеницы MC1611 было также обнаружено Лайковой с соавт. (2005) с применением моносомного анализа.

Sun с соавт. (2009) показали, что SS-фенотип линии 51885, полученной в результате скрещивания октоплодного тритикале и мягкой пшеницы, находится под контролем двух доминантных генов и нескольких генов с минорными эффектами.

В середине 50-х годов прошлого столетия Sears (1954) описал появление колосьев с «редупликацией колосков» у растений-нуллисомиков по хромосомам 2A и 2D мягкой пшеницы. Позднее Muramatsu (2009)

обнаружил, что эффект нуллисомии может полностью компенсироваться увеличением числа гомеологичных хромосом, и колосья нули-тетрасомной линии Tetra-2A Nulli-2D (2n = 42, 19"+1"") имеют дикий фенотип, а на уступах колосового стержня развивается по одному колоску. Хромосомные перестройки, включая делеции и отсутствие целой хромосомы, были обнаружены линий мягкой других пшеницы с сидячими И y дополнительными колосками стержня И разветвлением колосового (Swaminathan et al., 1966; Košner, Foltýn, 1989).

Несмотря на некоторую противоречивость данных в отношении числа и характера наследования генов, определяющих SS-фенотипы пшеницы, которую можно отчасти объяснить генетической гетерогенностью изучаемых линий разного происхождения, результаты исследований с использованием генетического и цитогенетического анализа показали участие генетических факторов хромосом гомеологичной группы 2 пшеницы в контроле SSфенотипа (Sears, 1954; Klindworth et al., 1990b, 1997; Peng et al., 1998; Muramatsu, 2009; Лайкова и др., 2005). Позднее с применением методов молекулярно-генетического картирования были ЭТИ результаты подтверждены. Так, генетический локус, определяющий фенотип Тибетской трехколосоковой формы мягкой пшеницы был картирован в хромосоме 2AS (Li et al., 2011); гены $bh \ u \ bh^m$, детерминирующие ветвистость колоса тетраплоидной и диплоидной пшениц, соответственно, были картированы в хромосомах 2AS и 2A^mS, соответственно (Haque et al., 2012; Amagai et al., 2014b).

Аliyeva и Aminov (2011) обнаружили, что признак ложная ветвистоть или вавилоидный тип ветвления колоса линии пшеницы 166-Schakheli находится под рецессивным моногенным контролем. Amagai с соавт. (2014а) локализовали ген *sham ramification 1 (shr1)*, детерминирующий ложное ветвление колоса *T. jakubzineri*, в длинном плече хромосомы 5А. Таким образом, было показано что морфотип колоса SHR – ложная ветвистость колоса находится под контролем гена *shr1* (Amagai et al., 2014а).

Исследуя генетический контроль морфотипа истинно-ложное ветвление колоса у линий тетраплоидной пшеницы T. turgidum, Amagai с соавт. (2014а) установили, что признак находится под моногенным рецессивным контролем. Ген, детерминирующий мутантный фенотип, был обозначен sham ramification 2 (shr2), поскольку на этом этапе исследований авторы не обнаружили различий между фенотипами изучаемых линий и линий с вавилоидным типом ветвления колоса (морфотип sham ramification, SHR). Позднее детальный анализ фенотипа колоса линий позволил выделить отдельный морфотип ложно-истинное ветвление (false-true ramification) (Amagai et al., 2017), однако сам ген по-прежнему называется shr2. С использованием микросателлитных маркеров, ген shr2 был картирован в длинном плече хромосомы 2A (Amagai et al., 2014a).

1.4.4. Многоколосковые формы ржи и ячменя

Многоколосковые/ветвистоколосые формы встречаются не только у пшеницы, но и у других представителей трибы Triticeae: ржи (*Secale* L.) и ячменя (*Hordeum* L.).

Колос ржи Secale L. двурядный, на уступах расположено по одному двух- (реже трех-) цветковому колоску. У ржи посевной S. cereale L. колос простой; многоколосковые формы встречаются редко у разновидностей var. vulgare Kőrn., var. tuberkulanum V. et V. Antr., var. clausopaleatum Vav. (Антропов и др., 1986). Ботаникам давно известны две основные формы ржи с разным характером ветвления – лопастным и типа «ежевки», они были отнесены к двум разновидностям var. compositum Lam. и var. monstrosum Kcke. (Жегалов, 1930). Такие ветвистоколосые формы были выделены из различных популяций ржи (Вавилов, 1926; Цицин, 1954; Sybenga, Prakken, 1962).

Для колоса *compositum* характерно небольшое число разветвлений на основном стержне, при этом каждая «веточка» представляет собой

маленький колос с расположенными на уступах колосками. Ветвистоколосые формы типа *monstrosum* характеризуются наличием на каждом уступе нескольких колосков, ветвлением стержня колоска – на оси колоска первого порядка расположены укороченные оси второго порядка, и многоцветковостью. Большая часть колосков монстрозного колоса не развивается полностью, а бывает представлена мелкими чешуйками, лишенными сформировавшихся пестиков и тычинок.

Проявление признака *compositum* может варьировать в пределах одного растения, а колосья типа *monstrosum* развиваются, как правило, на всех стеблях растения (Смирнов, Соснихина 1984). Ветвистость колоса по типу *monstrosum* детерминирована гомозиготностью по рецессивному аллелю одного гена (Нечас, 1961; Sybenga, Prakken, 1962). Sybenga и Prakken (1962) обозначили рецессивный аллель *с* из-за сходства описанного ими монстрозного фенотипа колоса, который они обозначили *«canary»*, с соцветием канареечника. Другие обозначения для гена, детерминирующего монстрозный колос, *– monstrosum ear 1 (mo1)* (De Vries, Sybenga, 1984); *monstrosum (m)* (Schlegel, 2014). С использованием серии цитогенетических тестерных линий, несущих транслокации (De Vries, Sybenga, 1984), и позднее морфологических и изозимных маркеров (Benito et al., 1991), ген *mo1* был картирован в коротком плече хромосомы 2R.

Колос представителей рода *Hordeum* L., в зависимости от числа колосков на уступах колосового стержня, бывает двурядным (на каждом уступе колосового стержня формируется по одному колоску) и шестирядным (3 колоска на уступе). Колоски одноцветковые. Колосовой стержень простой, разветвление встречается очень редко (Антропов и др., 1986). Однако получены многочисленные индуцированные мутанты культурного ячменя *H. vulgare*, среди которых есть и ветвистоколосые (Sholz, Lemman, 1958; Castiglioni et al., 1998; Rossini et al., 2006). Разветвленный колос ячменя относят к типу *compositum*, он характеризуется развитием дополнительных колосков на вторичных осях колоса/ «веточках», которые развиваются на

уступах колоса. Обнаружено несколько генов, локализованных в хромосомах 2H (*composutum 2* (*com2*), син. *branched 1* (*brc1*)), 3H (*six-rowed spike4* (*Vrs4*)) и 5H (*compositum 1*), которые отвечают за ветвистость колоса ячменя. Фенотип колоса мутанта *brc1* (*branched 1*) сходен с RS (GB)-морфотипом пшеницы – дополнительные колоски развиваются на вторичных осях колоска. Контролирующий этот фенотип ген был локализован в коротком плече хромосомы 2H (Castiglioni et al., 1998; Rossini et al., 2006; Poursarebani et al., 2015).

Таким образом, были обнаружены генетические локусы, отвечающие за формирование сверхчисленных колосков/ветвистого колоса представителей трибы Triticeae, расположенные в синтенных районах гомеологичных хромосом (2AS, 2DS, 2R, 2H). Это может означать наличие ортологичных серий генов, по меньшей мере, в пределах трибы Triticeae. Наряду с этим, идентификация генетических локусов и в других хромосомах свидетельствует о сложном генетическом контроле и наличии разных генетических механизмов, лежащих в основе регуляции признака.

1.5. Этапы органогенеза высших растений

Несмотря на морфологическое разнообразие, существуют общие для покрытосеменных растений закономерности и последовательность процессов органогенеза побегов и соцветий. Изучение морфофизиологических особенностей прохождения этапов органогенеза растений позволило разделить органогенез на отдельные этапы, и далее приводится описание основных 12-и этапов органогенеза растений, выделенных Куперман (1968).

Первый этап начинается с прорастания семян и образования всходов. На этом этапе идет процесс дифференцировки конуса нарастания, представленного клетками меристемы, в результате чего формируются различные ткани и органы. У пшеницы первый этап протекает в течение нескольких дней и завешается развертыванием второго и третьего листа (Куперман, 1968; Батыгина, 1987).

На протяжении **второго** этапа происходит дальнейшая дифференцировка конуса нарастания на узлы, междоузлия и примордии листьев, в пазухах листьев закладываются бугорки осей 2-го порядка, начинается процесс кущения – ветвление подземного стеблевого узла, или узла кущения. В зависимости от условий прохождения 2-го этапа однолетних злаков в пределах одного и того же сорта может сильно варьировать габитус куста – от одностебельных до многостебельных. В целом, у всех высших растений габитус растений зависит от продолжительности 2-го этапа, интенсивности метамерного роста вегетативных органов (Куперман, 1968).

Ha этапе в результате морфогенетических третьем сложных преобразований происходит переход вегетативного апекса побега в репродуктивное состояние. На этом этапе у злаков конус нарастания начинает значительно увеличиваться, вытягивается в длину, приобретает булавовидную форму с вытянутой конусовидной верхушкой, образуются сегменты (членики) оси соцветия. Число закладывающихся метамерных структур соцветия зависит от темпов прохождения этого этапа и находится под влиянием окружающей среды. Так, неблагоприятные условия (засуха, длительная оттепель) на этом этапе приводят к сокращению числа члеников колоса, к полной гибели побега. При задержке развития на третьем этапе И благоприятных органогенеза при для роста условиях заметно увеличивается число члеников зачаточного колоса и, таким образом, увеличивается число колосков в колосе, либо число веточек в метелке у метельчатых злаков (Куперман, 1968; Батыгина, 1987).

На четвертом этапе продолжается дальнейшая дифференцировка элементов соцветия, у пшеницы наблюдается закладка колосковых чешуй и формирование конусов нарастания следующего порядка. У видов растений с простыми соцветиями в боковых конусах нарастания формируется по одному зачаточному цветку. У видов, имеющих сложное соцветие, боковые конусы нарастания начинают ветвиться. Таким образом, четвертый этап характеризуется ветвлением осей соцветия. У пшеницы и ржи из боковых конусов нарастания образуется по одному колоску. Дифференцировка листьев на главной оси побега пшеницы к этому этапу прекращается (Куперман, 1968; Батыгина, 1987).

Пятый этап характеризуется началом формирования и дифференцировки цветка. Закладываются органы цветка: тычинки, пестик и покровные органы. В конце этого этапа в тычинках и пестиках образуются спорогенные ткани цветка. Соцветие пшеницы достигает длины 0,5–0,7 см и к окончанию пятого этапа в колоске имеется 4–6 хорошо сформированных цветков. У мягкой пшеницы может закладываться 8–10 цветков, но зерновки формируется только в 2–6 (Куперман, 1968; Батыгина, 1987).

Шестой этап органогенеза – важный этап для формирования гамет. В пыльниках и семяпочках происходят процессы микроспорогенеза и мегаспорогенеза. У пшеницы колос достигает размера 1,5–2 см. Наблюдается значительное увеличение в размере цветковых чешуй, тычинок, формируются ости на цветочных чешуях. Кроме усиленного роста всех генеративных органов усиливается рост стебля, листовых пластинок (Куперман, 1968; Батыгина, 1987).

На седьмом этапе завершается гаметогенез. Наблюдается значительное увеличение в размере колоса и его элементов. Условия произрастания (питание, освещенность, влагообеспеченность и др.) определяют плотность соцветия (Куперман, 1968).

Восьмой этап органогенеза совпадает у пшеницы с выколашиванием и характеризуется дальнейшей дифференцировкой зародышевого мешка и пыльцы (Куперман, 1968; Батыгина, 1987).

На девятом этапе ограногенеза происходят процессы опыления и оплодотворения и в результате двойного оплодотворения образуется зародыш и эндосперм. К концу 9-го этапа соцветие достигает максимального размера (Куперман, 1968; Батыгина, 1987).

На десятом и одиннадцатом этапах ограногенеза происходит формирование и рост плода, зерновки. На одиннадцатом этапе завершается формирование зародыша. В клетках эндосперма образуется крахмал, формируется алейроновый слой. При неблагоприятных условиях окружающей среды зерновки оказываются щуплыми. На двенадцатом этапе происходит превращение питательных веществ зерновки в запасные (Куперман, 1968; Батыгина, 1987).

Таким образом, основные процессы морфогенеза соцветия злаков и колоса пшеницы, в частности, протекают на 2–5-м этапах ограногенеза растения, когда происходит переход к генеративной стадии развития, закладываются и дифференцируются органы соцветия.

1.6. Особенности развития соцветий злаков

Меристемы – образовательные ткани растений, содержащие пул стволовых клеток (Батыгина, 2014). Особенности архитектуры растений в большой степени определяются активностью первичных меристем, которые закладываются в ходе эмбрионального развития: апикальной меристемы побега (ПАМ) и корня (КАМ). ПАМ и КАМ обеспечивают рост осевых органов – побега и главного корня, и формирование надземной и подземной частей растения. Bo вегетативной фазы ПАМ время развития последовательно инициирует листовые примордии (зачатки). В пазухах листа формируются вторичные аксиальные меристемы, которые затем развиваются во вторичные побеги. Результатом перехода растения от вегетативной стадии развития к генеративной является преобразование апикальной меристемы побега в меристему нового типа – меристему соцветия (МС). У некоторых видов растений, например, *A. thaliana* ПАМ напрямую инициирует меристему цветка, у злаков же развиваются промежуточные типы меристем (Bommert et al., 2005).

Переход от функционирования одной меристемы к другой – сложный многоступенчатый процесс, в регуляцию которого вовлечено множество генов. Соцветие метельчатых злаков, таких как рис, кукуруза (мужское соцветие), сорго состоит из главной оси, длинных веточек и колосков, а колос пшеницы, ржи, ячменя – из главной оси и колосков. Каждая из этих уникальных структур развивается из определенного типа специализированных меристем, которые обычно называют в зависимости от органов, которым они дают начало, – меристемы веточек, меристемы колосков и др. Таким образом, сложное соцветие злаков формируется из меристем нескольких типов.

Каждую свойства: меристему характеризуют два основных идентичность детерминированность. Идентичность меристемы И определяется по типу зачатков органов, которые данная меристема инициирует (Bartlett, Thompson, 2014). Детерминированные меристемы представлены группами клеток, которые постепенно расходуются после инициации определенного (как правило, фиксированного) числа органов, а недетерминированные, напротив, состоят из само-возобновляемого пула клеток и продолжают инициировать структуры соцветия (стебель, листья, веточки, цветки) на протяжении жизненного цикла растений (Bartlett, 2014). Thompson, Для большинства растений цветковых детерминированность меристемы означает переход К установлению идентичности цветковой (флоральной) меристемы, однако злаки являются исключением, их меристемы соцветия могут быть детерминированы способами, которые предшествуют или не связаны с приобретением идентичности флоральных меристем. Для фенологического описания была предложена «гомеотическая» развития соцветия злаков модель переключения идентичности меристем, в рамках которой меристемы проходят через ряд последовательных преобразований от меристемы соцветия к цветковым меристемам (McSteen et al., 2000; Laudencia-Chingcuanco, Hake, 2002).

Общая схема развития соцветия злаков выглядит следующим образом: апикальная переход к генеративной фазе, когда меристема побега преобразуется в меристему соцветия, сопровождается быстрым увеличением ее размера и не редко сменой филлотаксиса (порядка расположения органов относительно главной оси) (Taguchi-Shiobara et al., 2011; Bartlett, Thompson, 2014). Далее меристема соцветия формирует главную ось соцветия и дает начало латеральным меристемам боковых осей соцветия (другое название – первичные аксиальные меристемы соцветия или меристемы веточек у метельчатых злаков). Латеральные меристемы, в свою очередь, могут давать начало латеральным меристемам следующего порядка и далее, либо могут прекращать развитие, либо переходить к формированию колоска. Колосковая меристема может быть детерминированной и ее развитие заканчивается закладкой терминального цветка после формирования определенного, как фиксированного числа цветков (рис, ячмень). правило, кукуруза, Недетерминированная колосовая меристема инициирует некоторое (не определенное точно) число цветков перед тем, как дегенерировать (*B. distachyon*, пшеница) (Kellog et al., 2013; Bartlett, Thompson, 2014).

Kellog с соавт. (2000) при изучении морфологии соцветия злаков предложилаи рассматривать отдельные компоненты фенотипа в виде модулей, которые могут комбинироваться различными способами, с учетом особенностей их развития. Развитие меристем соцветия злаков может идти по трем различным путям: (1) терминироваться развитием колоска, (2) давать начало меристемам следующего порядка или (3) прекращать развитие. Если меристема дает начало латеральной меристеме следующего порядка, то эта меристема, в свою очередь, также может развиваться по одному из трех описанных выше путей и, что важно, каждый этап развития оси следующего порядка не зависит от предыдущего, таким образом в процессе эволюции могут реализоваться любые комбинации. Так, если меристема соцветия дает начало единственной колосковой меристеме, то соцветие представлено единственным терминальным колоском, что у злаков встречается редко (Lygeum). У большинства же злаков меристема соцветия дает начало латеральным меристемам, которые либо сразу же терминируются развитием колоска (*Brachyelytrum*), либо дают начало меристемам осей следующего порядка, в результате чего происходит ветвление соцветия (метельчатые злаки). Пути развития апикальной меристемы соцветия и латеральных меристем, как правило, различаются (Malcomber et al., 2006). Таким образом, модификации основной схемы развития соцветия приводят к разнообразию форм соцветий злаков (Рисунок 1.4).



Рисунок 1.4 – Схемы развития и строения соцветий риса (а), метелки (б) и початка (в) кукурузы и колоса пшеницы (г) MB – меристемы веточек; MC – меристема соцветия; пMB – первичные меристемы веточек; вMB – вторичные меристемы веточек; КМ – колосковая меристема; ПКМ – парная колосковая меристема; ТКМ – терминальная колосковая меристема (меристема терминального колоска) (Bommert, Whipple, 2017)

У риса апикальная меристема соцветия сначала инициирует первичные (меристемы веточек), аксиальные меристемы которые дают начало вторичным аксиальным меристемам и на более поздних этапах развития – меристемам (Рисунок 1.4). Таким образом, колосковым колосковые меристемы инициируются из первичных и вторичных аксиальных меристем соцветия и дают начало одному фертильному цветку, двум стерильным цветковым чешуйкам и паре колосковых чешуек. Колосковые чешуйки в большой степени редуцированы и называются рудиментарными (Thompson, Hake, 2009).

Для соцветий кукурузы и мужского, и женского типов характерно развитие парных колосковых меристем, которые встречаются только у представителей Andropogoneae. Несмотря на существенную разницу в морфологии женского и мужского соцветий кукурузы, развитие их идет сходным образом и основное различие заключается в том, что у мужского соцветия (метелки) формируются меристемы веточек, а у початка (женского соцветия) веточки не образуются. (Рисунок 1.4) (Bommert et al., 2005; Thompson, Hake, 2009).

Колос представителей трибы Triticeae – пшеницы, ржи, ячменя, развивается в соответствии с основной схемой развития соцветия злаков; главной особенностью развития является отсутствие меристем веточек. Колосковые меристемы инициируются непосредственно меристемой соцветия (Рисунок 1.4). Различия в развитии соцветий между отдельными представителями трибы связаны не с наличием/отсутствием специфичных меристем, а с особенностями их функционирования. Так, меристема соцветия у мягкой пшеницы терминирована, а у ячменя не детерминирована. Колосковая меристема пшеницы, напротив, не детерминирована, а ячменя детерминирована. При этом у ячменя формируются три колосковые меристемы. центральный колосок всегда развивается полностью. a латеральные могут быть либо полностью развиты, либо стерильны (или в них

развиваются только тычинки), в результате чего формируется либо двурядный, либо шестирядный колос (Pourkheirandish, Komatsuda, 2007).

Развитие колоса пшеницы идет по следующему пути: меристема соцветия последовательно дает начало латеральным меристемам, которые развиваются в латеральные колоски (колосковые меристемы), пока не сформируется терминальный (верхушечный) колосок. Каждая латеральная (колосковая) меристема развивается в единственный латеральный колосок, состоящий из множества цветков (Bonnet, 1936). Колосковая меристема инициирует органы колоска и флоральной меристемы, которые появляются в следующей последовательности: первыми становятся различимыми примордии двух колосковых чешуй, затем инициируются флоральные меристемы и на их периферии формируются примордии двух цветковых чешуй, далее происходит дифференцировка органов цветка (двух лодикул, пестика и трех тычинок).

Колосок пшеницы недетерминированный и состоит из нескольких цветков, которые развиваются акропетально. Недетерминированный характер колосковых меристем присущ всем видам пшеницы, независимо от уровня плоидности (Shitsukawa et al., 2009). Число фертильных цветков в колоске зависит от общего числа цветковых меристем и числа цветков с гипоплазией, у цветков дистальной части колоска обнаружено два типа гипоплазии: органы цветка инициируются, но не развиваются полностью (диплоидные пшеницы), органы цветка закладываются и развиваются, но цветки стерильны (тетраплоидные и гексаплоидные виды пшениц), в результате чего у диплоидных видов пшеницы фертильным оказывается только один базальный цветок, у тетраплодных – чаще всего два цветка, а у гексаплоидной мягкой пшеницы – 4-5 цветков. Таким образом, гетерохрония в развитии цветков колоска у видов пшеницы разного уровня плоидности является причиной различий в числе зерновок в колоске зрелого колоса (Shitsukawa et al., 2009).

Полагают, что метелка является более примитивной формой соцветия и колос появился позднее в ходе эволюции (Sakuma et al., 2011).

1.7. Генетическая регуляция морфогенеза соцветия злаков

Кукуруза (Z. mays) и рис (O. sativa) – представители семейства Злаков, у которых генетическая регуляция развития соцветия наиболее полно изучена. Прежде всего это связано с доступностью генетических ресурсов, разработкой молекулярных и биотехнологических подходов анализа геномов и получением результатов секвенирования геномов. Так, у кукурузы получены многочисленные мутанты с измененной морфологией соцветия (Bommert et al., 2005), а рис O. sativa – первый вид злаков, чей геном был секвенирован (International Rice Genome Sequencing Project, 2005) и к настоящему времени хорошо аннотирован, что открывало возможности позиционного клонирования. Кроме того, у риса хорошо разработаны методы трансформации, что дает возможность уточнять функциональную роль выделенных с помощью позиционного клонирования генов (Bommert et al., 2005). В последнее время число видов злаков, которые являются модельными для изучения различных биологических процессов, увеличилось и включает B. distachyon, ячмень H. vulgare, и, совсем недавно – сетарию итальянскую Setaria italica (L.) P. Beauvois (Bommert, Whipple, 2017). Синтения геномов злаков позволила проводить позиционное клонирование у видов злаков, чей геном был изучен в меньшей степени. Гены, управляющие развитием соцветия, были идентифицированы благодаря использованию мутантов (в основном кукурузы и риса), у которых нарушена морфология соцветия и цветка; большая часть этих генов регулирует инициацию и судьбу меристем (Bommert et al., 2005; Sreenivasulu, Schnurbusch, 2012).

Переход от вегетативной стадии развития к генеративной или инициация цветения растений происходит под действием внешних и внутренних стимулов. Этот этап не проявляется морфологически, но на его протяжении происходят важные физиологические изменения, в основе которых лежат молекулярно-генетические преобразования; известны холодовой, фотопериодический, гиббереллиновый и автономный сигнальные пути индукции цветения (Лутова и др., 2010).

1.7.1. Роль ортологов *LFY/FLO* в развитии соцветия злаков

Гены ортологи двудольных модельных видов *A. thaliana LEAFY (LFY)* и *A. majus FLORICAULA (FLO)* играют ключевую роль в формировании флоральной меристемы, являясь интеграторами информации, поступающей от разных путей инициации цветения (обзоры Jack, 2004; Prunet, Jack, 2014). *LFY* и *FLO* кодируют транскрипционные факторы ($T\Phi$), специфичные только для растений. У мутантов *flo* и *lfy* нарушен метаморфоз побега в цветки, что приводит к формированию вегетативных побегов вместо цветков и цветков с аномалиями (Jack, 2004).

У кукурузы Z. mays были идентифицированы две копии гомологов ZFL1 (Zea mays FLO/LFY 1) и ZFL2 (Zea mays FLO/LFY 2) (Bomblies et al., 2003). Анализ двойных мутантов *zfl1zfl2* обнаружил нарушения В идентичности и детерминированности флоральных меристем и мужского, и (Bomblies al., 2003). ZFL1 соцветий Гены ZFL2 женского et И экспрессируются в меристемах соцветия, высокий уровень экспрессии наблюдается в парных колосковых меристемах и сохраняется во флоральных меристемах на стадии инициации органов цветка (Bomblies et al., 2003). Паттерн экспрессии генов FLO/LFY двудольных и генов ZFL1, ZFL2 кукурузы совпадает, что наряду со сходством мутантных фенотипов предполагает консервативность функций генов ортологов у двудольных и Z. mays.

Паттерн экспрессии гена риса *RFL* (rice *FLORICAULA/LEAFY*), гомолога *FLO/LFY*, отличается от *LFY/FLO*: ген экспрессируется в апикальных участках развивающегося соцветия на ранних этапах развития,

но не экспрессируется ни в первичных и/или вторичных аксиальных меристемах веточек, ни во флоральных меристемах (Kyozuka et al., 1998). Кроме того, транскрипты RFL обнаружены в эпидермальных клетках листа. Rao c coaвт. (2008) показали, что снижение уровня экспрессии гена RFL вызывает существенную задержку перехода растения к цветению, вплоть до отсутствия цветения, а повышенный уровень экспрессии, напротив, вызывает быстрый переход к цветению. Кроме того, снижение уровня экспрессии RFL влияет на архитектуру соцветия, приводя к уменьшению числа первичных веточек, содержащих несколько колосков с фертильными цветками, и полной редукции вторичных веточек. Полный нокдаун экспрессии RFL приводит к редукции вторичных побегов растения (Rao et al., 2008).

В 2012 г. был охарактеризован мутант риса *aberrant panicle organization* 2 (*apo2*), у которого наблюдалось уменьшение размера метелки и числа веточек в результате более раннего развития колосковых меристем и нарушения развития цветка, укорочение пластохрона (Ikeda-Kawakatsu et al., 2012). В результате позиционного клонирования был выделен ген, отвечающий за мутантный фенотип, им оказался ген *APO2*, идентичный ранее изученному гену *RFL* (Ikeda-Kawakatsu et al., 2012).

Таким образом, *RFL*(*APO2*) риса является мастер-регулятором различных генетических путей, управляющих процессами развития. У мутантов *lfy A. thaliana*, экспрессирующих ген риса *RFL*, наблюдается неполное восстановление функций. Следовательно, функции генов *LFY/FLO* и *RFL* совпадают только частично.

Ортолог *FLO/LFY* был выделен в геноме мягкой пшеницы (Shitsukawa et al., 2006). Было установлено, что паттерн экспрессии *WFL* (wheat *FLORICAULA/ LEAFY*) в соцветии сходен с *RFL* риса: ген не экспрессируется в цветковых меристемах. Транскрипты *WFL* обнаружены в тканях развивающегося соцветия и цветковых чешуях. На основании этого предположили, что и функции *RFL* и *WFL* в развитии соцветия сходны (Shisukawa et al., 2006).

Таким образом, наблюдается частичная дивергенция функций генов LFY/FLO двудольных растений, играющих ключевую роль в формировании флоральной меристемы, и их гомологов у злаков, у которых гомологичные гены также участвуют в развитии соцветия и принимают участие в контроле процессов развития и роста вегетативных органов (ген риса *RFL*).

1.7.2. Консервативность сигнального пути CLAVATA-WUSCHEL, координирующего пролиферацию и дифференцировку клеток меристем, у высших растений

Число аксиальных меристем, инициируемых меристемами соцветия кукурузы и риса, зависит от их размера, и находится под контролем генов, гомологичных генам *A. thaliana CLAVATA* (*CLV1, 2, 3*) (Somssich et al., 2016). Сигнальный путь CLAVATA-WUSCHEL координирует пролиферацию и дифференцировку клеток меристем, являясь основным в регуляции гомеостаза меристем высших растений. CLAVATA-WUSCHEL впервые был обнаружен и изучен у *A. thaliana* (Somssich et al., 2016).

Ген WUSHEL (WUS) кодирует гомеодомен-содержащий транскрипционный фактор, который экспрессируется в организующем центре (ОЦ) центральной зоны апикальной меристемы. Функция гена – поддержание пула стволовых клеток (Mayer et al., 1998).

У мутантов *clavata* (*clv1, 2, 3*) *А. thaliana* увеличено число клеток центральной зоны ПАМ, что приводит к увеличению числа органов цветка, плодолистиков, фасциации стебля, формированию плода «матрешка», на основании чего предположили, что гены *CLV* негативно регулируют экспрессию *WUS*, ограничивая область его экспрессии в ПАМ (Лутова и др., 2010; Somssich et al., 2016). Ген *CLV1* кодирует трансмембранную рецепторную киназу, а *CLV2* – рецептор-подобный белок, имеющий значительное сходство с *CLV1*, но без цитоплазматического киназного домена. *CLV3* кодирует небольшой секреторный пептид из 96-и аминокислот,

содержащий CLE-домен (CLAVATA3 (CLV3)/ENDOSPERM SURROUNDING REGION (ESR)). CLV3 представляет собой лиганд, который связывается с рецепторами CLV1, CLV2 (Лутова и др., 2010; Somssich et al., 2016).

Ген THIK TASSEL DWARF1 (TD1)кодирует LRRкукурузы рецепторную киназу и гомологичен гену CLV1. Мутанты td1 имеют выраженную фасциацию оси женского соцветия и существенное увеличение числа рядов в початке (Bommert et al., 2005). У мутанта риса floral organ number1 (fon1) наблюдается увеличение размера флоральной меристемы и числа органов цветка; FON1 кодирует белок с высокой степенью гомологии с TD1 и CLV1 (Suzaki et al., 2004). OsLRK1 риса также является CLV1подобным геном, его сайленсинг в результате РНК-интерференции приводит к увеличению числа органов цветка (Kim et al., 2000). Наряду с fon1 у риса выявлены другие мутанты fon2-1, fon2-2 и fon3 со сходным фенотипом соцветия, связанным с увеличением размера меристемы соцветия и числа органов цветка (Nagasawa et al., 1996; Jiang et al., 2005).

Было обнаружено, что у мягкой пшеницы гомолог гена *CLV1* – Traes_4AS_04E4A0063 экспрессируется на стадиях развития, когда соцветие пшеницы содержит ткани меристем и зачатков органов (Feng et al., 2017), что подразумевает аналогичные функции с ортологими *CLV1* высших растений (Clark et al., 1997; Suzaki et al., 2004; Feng et al., 2017).

Ген кукурузы FASCIATED EAR 2 (FEA2) кодирует белок гомологичный CLV2 (Taguchi-Shiobara et al., 2011). У fea2-мутантов существенно увеличен размер меристемы соцветия, часто увеличен размер аксиальных меристем соцветия и флоральных меристем, что приводит к формированию початка с увеличенным числом рядов и дополнительных органов цветка (Taguchi-Shiobara et al., 2011). Двойные мутанты td1fea2 имеют более выраженный мутантный фенотип по сравнению с фенотипами каждого отдельного мутанта td1 и fea2, что предполагает принадлежность генов к различным генетическим путям регуляции (Bommert et al., 2005). Было показано, что

CLV2 *A. thaliana* также принадлежит независимому сигнальному пути и формирует рецепторный комплекс с белком CRN (другое название гена – *SUPPRESSOR OF LLP2, SOL2*) (Müller et al., 2008).

Недавно был обнаружен еще один ген кукурузы FASCIATED EAR3 (FEA3), кодирующий LRR-рецепторную киназу CLV-типа. Мутации этого гена вызывают сходные с *fea2* и *td1* фенотипические проявления – увеличение размера меристемы соцветия. Двойные мутанты *fea3fea2* имеют более выраженный мутантный фенотип, что предполагает взаимодействие генов и наличие общей мишени (Je et al., 2016). Ген экспрессируется в области меристемы, окружающей ОЦ и отвечает на CLE (пептидные)-сигналы от зачатков органов (Je et al., 2016).

Обнаружено, что ген *FEA2* ко-локализуется на генетической карте с QTL, определяющим число рядов зерен в початке и, таким образом, может иметь большое значение для использования в селекционных программах с целью повышения урожайности (Taguchi-Shiobara et al., 2011). Найдены «слабые» аллели генов *fea2* и *fea3*, которые увеличивают число рядов зерен в початке, не вызывая при этом изменений в морфологии – укорочение или фасциацию соцветия (Bommert et al., 2013; Je et al., 2016).

Ген риса *FLORAL ORGAN NUMBER 2 (FON2)* кодирует небольшой секреторный белок и является предполагаемым ортологом гена *CLV3* (Chu et al., 2006; Suzaki et al., 2004). У мутантов *fon2* наблюдается увеличение размеров ПАМ, меристемы соцветия и флоральных меристем, что приводит к формированию сверхчисленных первичных веточек и органов цветков (Chu et al., 2006; Suzaki et al., 2004). Кроме того, у риса обнаружен еще один гомолог *CLV3 (FON2*-related) – *FON2 SPARE1 (FOS1)*; функции *FON2* и *FOS1* вырождены у некоторых генотипов (Suzaki et al., 2009).

Таким образом, сигнальный путь CLV частично консервативен у однодольных и двудольных растений. У злаков влияние мутаций генов, принадлежащих этому пути, не ограничиваются меристемой соцветия, а распространяются и на меристемы, закладывающиеся позднее в процессе развития (например, первичные и вторичные аксиальные меристемы соцветия), вызывая сходные эффекты, связанные с увеличением размера меристем. Обнаруженные у злаков особенности связаны с паттерном экспрессии гомологичных генов и вырожденностью некоторых функций. Так, например, ген риса *FON2*, в отличие от *CLV3*, не участвует в регуляции вегетативного развития. У риса эту функцию выполняют *FON2-LIKE CLEPROTEIN1* (*FCP1*) и *FCP2*, поддерживающие функционирование ПАМ на вегетативной стадии развития (Suzaki et al., 2008). Кроме того, важным аспектом является наличие количественной изменчивости в проявлении признаков под контролем генов сигнального пути CLV у злаков, что является изменчивость роста и продуктивности растений в селекционных вклад в изменчивость роста и продуктивности растений в селекционных программах.

Роль ортологов гена *WUS* у злаков не вполне ясна. Паттерн экспрессии дуплицированных гомологов кукурузы ZmWUS1 и ZmWUS2 предполагает несколько отличные от *WUS* функции: область экспрессии ZmWUS1 перекрывается с ОЦ меристемы соцветия, а ZmWUS2 экспрессируется на периферии меристемы соцветия. Однако функциональной оценки эти гены не получили, так как мутанты по ним получены не были (Nardmann, Werr, 2006; Je et al., 2016). Известен ортолог гена *WUS* риса – *TILLERS ABSENT1* (*TAB1* или *OsWUS*). Полагают, что *TAB1* играет важную роль в инициации аксиальных меристем, так как их закладка у мутантов *tab1* не происходит (Tanaka et al., 2015).

В целом, следует отметить, что модули сигнального пути CLAVATA-WUSCHEL высших растений регулируют активность меристем во время всех этапов развития и роста растения, включая и вегетативную, и репродуктивную стадию, и являются факторами, определяющими число органов, инициируемых меристемами.

1.7.3. Генетическая регуляция инициации и поддержания активности аксиальных меристем соцветия злаков

У злаков пути развития апикальной и аксиальных меристем соцветия отличаются. У многих злаков филлотаксис меристемы соцветия спиральный, а меристем веточек – двурядный (Bartlett, Thompson, 2014). Мутации генов, которые влияют на меристему соцветия, могут не затрагивать остальные меристемы и vice versa. Например, гены ортологи barrenstalk1 (ba1) кукурузы и LAX PANICLE1 (LAX1) риса необходимы для инициации аксиальных меристем и формирования веточек, но не затрагивают апикальную меристему соцветия (Gallavotti et al., 2004; Komatsu et al., 2003b). Мутации этих генов вызывают существенное уменьшение числа веточек и колосков у риса (Komatsu et al., 2001, 2003b) или отсутствие ветвления метелки кукурузы (Ritter et al., 2002; Gallavotti et al., 2004). Ген кукурузы ba1 участвует в контроле инициации аксиальных меристем всех надземных частей растения, а LAX1 риса – только соцветия. ba1/LAX1 кодируют транскрипционные факторы с главным доменом «спираль петля спираль» (basic-helix-loop-helix, bHLH) (Gallavotti et al., 2004; Komatsu et al., 2003b).

Ген риса *MONOCULM1* (*MOC1*) необходим для инициации аксиальных меристем во время вегетативного и генеративного развития растения. Мутант *moc1* лишен вторичных побегов, метелка содержит несколько веточек и колосков (Li et al., 2003; Oikawa, Kyozuka, 2009).

Zhang с соавт. (2015) показали, что гомолог *MOC1* мягкой пшеницы – *TaMOC1* (обнаружено 82,6% гомологии аминокислотных последовательностей MOC1 и TaMOC1) участвует в контроле развития колоска пшеницы. *MOC1/TaMOC1* кодируют транскрипционные факторы (Li et al., 2003; Oikawa, Kyozuka, 2009; Zhang et al., 2015).

В метелке мутанта *barren inflorescence2* (*bif2*) кукурузы не развиваются веточки или колоски, ген необходим для поддержания активности

аксиальных меристем (McSteen, Hake, 2001). *BIF2* кодирует Ser/Thr протеинкиназу (McSteen et al., 2000).

1.7.4. Генетическая регуляция установления идентичности и детерминированности колосковых меристем

Мутации генов ортологов branched silkless1 (bd1) кукурузы и FRIZZY PANICLE (FZP) риса приводят к формированию очень разветвленного соцветия (Chuck et al., 2002; Komatsu et al., 2001; Komatsu et al., 2003a; Zhu et al., 2003; Yi et al., 2005). Гены кодируют транскрипционные факторы семейства APETALA2 (AP2). У мутантов bd1 и fzp нарушена идентичность колосовых меристем при переходе к установлению идентичности флоральных меристем, в результате чего на месте цветков формируются веточки. Степень выраженности мутантного фенотипа у мужского и женского соцветий кукурузы неодинакова, при этом у женского соцветия формируются эктопические веточки И флоральные меристемы не закладываются. Мутанты fzp и bdl имеют сходный паттерн экспрессии, их транскрипты обнаружены в развивающихся органах соцветий (Chuck et al., 2002; Komatsu et al., 2003а). Следует отметить, что гены ортологи экспрессируются не в меристемах, а в примордиях колосковых чешуй (Chuck et al., 2002; Komatsu et al., 2003a).

Еще один ген риса, контролирующий установление идентичности меристем колоска – *PANCILE PHYTOMER2/OSMADS34* (*PAP2*) (Gao et al., 2010; Kobayashi et al., 2012). *PAP2* кодирует *SEPALLATA*-подобный транскрипционный фактор содержащий MADS-бокс. У двудольных, в частности у *A. thaliana*, гены *SEPALLATA* (*SEP1, 2, 3, 4*) принадлежат к Е-классу генов, необходимых для образования функциональных белковых комплексов с продуктами генов классов A, B и C, их функции частично перекрываются (Pelaz et al., 2000; Theissen, Saedler, 2001; Ditta et al., 2004). У тройных мутантов *sep1sep2sep3* меристема цветка становится

недетерминированной и органы цветка представлены только чашелистиками, а у четверного мутанта *sep1sep2sep3sep4* вместо чашелистиков развиваются листоподобные структуры (Pelaz et al., 2000; Ditta et al., 2004).

У мутанта риса *pap2* наблюдаются нарушения в строении соцветия, связанные с формированием большего числа веточек, в строении колоска – развитие сверхчисленных листоподобных колосковых и цветковых чешуй с эктопическими веточками и нарушение в строении цветков. Усиленное ветвление соцветия и развитие листоподобных структур у мутанта говорит о частичной потере идентичности колосковых меристем. Ген экспрессируется в меристемах колоска, наблюдается повышение уровня его экспрессии при установлении идентичности колосковых меристем.

Таким образом, *SEP* у злаков приобретает новую функциональную роль, которая заключается в установлении идентичности колосковых меристем. Частичный характер потери функции гена *POP2* риса предполагает наличие другого гена (генов) и вырожденность функций этих генетических факторов в установлении идентичности колосковых меристем.

Мутации гена риса *aberrant panicle organization1 (apo1)* вызывают преждевременное установление идентичности колосковых меристем, и, как результат, уменьшение ветвления соцветия (Ikeda et al., 2005). Ген APO1 риса кодирует белок, содержащий F-бокс, и ортологичный UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO) A. thaliana. Функция APO1 заключается в подавлении установления идентичности колосковых меристем (Ikeda et al., 2007). Подобную функцию выполняет ген RFL (APO2) риса. Было показано, что гены АРО1 и АРО2 действуют совместно в контроле развития соцветия и цветка (Ikeda-Kawakatsu et al., 2012). В целом, совместное действие генов *APO1/APO2* соответствует ко-регуляции генов *LFY/UFO A. thaliana* (Лутова и др., 2010), однако следует отметить, что на развитие цветка гены APO2/RFL и *LFY* действуют противоположным образом (Ikeda-Kawakatsu et al., 2012), что отражает эволюционную дивергенцию генетических механизмов, управляющих развитием соцветия риса (однодольные) и *A. thaliana* (двудольные).

Еще один ген риса, действие которого супрессирует установление колосковых меристем _ TAWAWA1 *(TAW1)*. ALOGидентичности транскрипционного фактора (Yoshida et al., 2013). У мутанта tawawa1-D активность меристемы соцветия пролонгируется, а спецификация меристем колоска, напротив, задерживается, В результате чего формируются удлиненные веточки с увеличенным числом колосков.

Было обнаружено, что гены мягкой пшеницы, гомологичные *TAW1* риса (Yoshida et al., 2013), экспрессируются во время инициации колосковых меристем развивающегося соцветия (Feng et al., 2017). В целом, паттерны экспрессии этих генов и гена *TAW1* риса совпадают, на основании чего авторы предположили сходство их функций в развитии соцветий риса и пшеницы (Feng et al., 2017).

Таким образом, в результате скоординированного действия генетических факторов, которые способствуют установлению идентичности колосковых меристем (*FZP* и *POP2*) и их супрессии (*APO1, 2* и *TAW1*), происходит спецификация колосковых меристем и дальнейшее развитие колоска.

После установления идентичности колосковых меристем, следующее событие процессе важное В развития колоска определение У детерминированности. злаков детерминированность колосковой меристемы определяется консервативным механизмом, включающим взаимодействие микроРНК172 и мишени – APETALA2 (AP2) -подобного транскрипционного фактора (Bommert, Whipple, 2017). Полагают, что многоцветковый недетерминированный колосок (пшеница, *B. distachyon*) возник в процессе эволюции раньше, чем детерминированный (рис, кукуруза, ячмень) (Цвелев, 1976; Bommert, Whipple, 2017). Мутация гена кукурузы *indeterminate spikelet1 (ids1)* приводит к формированию сверхчисленных цветков (Chuck et al., 1998). Активность гена IDS1 регулируется Tasselseed4 (*Ts4*) – локусом, кодирующим микроРНК, miR172 (Chuck et al., 2007). Кроме того, был обнаружен паралог гена *IDS1* – *SISTER OF IDS1* (*SID1*), показано, что функции генов *IDS1 и SID1* в регуляции детерминированности колоска кукурузы вырождены (Chuck et al., 2008).

Ортологи генов *IDS1* и *SID1* с вырожденными функциями в контроле детерминированности колоска были обнаружены у риса и ячменя, показан консервативный механизм регуляции детерминированности колоска микроРНК – miR172 (Lee et al., 2007; Lee, An, 2012; Brown, Bregitzer, 2011).

Недавно было установлено, что главный ген доместикации пшеницы – Q, мастер-ген, регулирующий ряд важных для доместикации характеристик колоса, является ортологом *IDS1* кукурузы, и мутации в сайте связывания с miR172 приводят к изменениям детерминированности колоска, вызывая его удлинение и формирование многочисленных цветков на колосковой оси (Simons et al., 2006; Debernardi et al., 2017).

Мутации генов Ramosa (Ra1, 2, 3) вызывают нарушение идентичности парных колосковых меристем соцветия, специфичных только ДЛЯ представителей трибы Andropogoneae. У мутантов кукурузы ramosal (ral), ra2 и ra3 формируются многочисленные удлиненные веточки в метелке и появляются удлиненные «веточки» в початке (Vollbrecht et al., 2005; Bortiri et al., 2006; Satoh-Nagasawa et al., 2006). *Ra1* и *Ra2* кодируют транскрипционные факторы (ТФ) семейства C2H2-цинковые пальцы и ТФ, содержащий LOB (lateral organ boundary)-домен (Vollbrecht et al., 2005; Bortiri et al., 2006), a *Ra3* кодирует трегалозо-6-фосфатную фосфатазу (Satoh-Nagasawa et al., 2006). Все три гена принадлежат одному генетическому пути регуляции (Tanaka et al., 2015).

Ортологи генов *RA1* и *RA3* уникальны для трибы Andropogoneae, близкий паралог *Ra3* с неопределенной на настоящее время функцией обнаружен и у других злаков, например, *HvSRA* ячменя (Satoh-Nagasawa et al., 2006). В отличие от *RA1* и *RA3*, специфичных для Andropogoneae, ортологи гена *Ra2* играют важную роль в развитии соцветия различных представителей злаков. Ортолог *Ra2* был выделен в геноме ячменя, *Vrs4* (*Sixrowed spike4*)/*HvRA2* (Корроlu et al., 2013). Мутации гена приводят к потере детерминированности меристемы колоска и полному развитию латеральных колосков (Корроlu et al., 2013). Полагают, что, несмотря на высокую консервативность структуры и функций гена *Ra2* у различных представителей злаков, гены-мишени у ортологов могут быть различными. Так, ген ячменя *HvRA2*, регулирует рядность колоса опосредованно, через регуляцию гена-мишени – *Vrs1* (*HvHox1*) (Корроlu et al., 2013).

1.8. Заключение к Главе 1

Несмотря на существенные различия в строении соцветий модельного вида растений *A. thaliana* (двудольные растения) и злаков (однодольные растения), наличие некоторых генетических механизмов, регулирующих процессы развития соцветий злаков, подтверждает модели генетической регуляции, открытые ранее у *A. thaliana*. Так, сигнальный путь CLAVATA-WUSCHEL, координирующий пролиферацию и дифференцировку клеток меристем, в целом, консервативен у высших растений. Ключевые регуляторы, например, ген *CLV1*, сохраняют свои функции и у двудольных, и у однодольных растений (Clark et al., 1997; Suzaki et al., 2004; Feng et al., 2017). Вместе с тем, обнаружена функциональная диверсификация генов, принадлежащих этому сигнальному пути, вовлечение новых генов в регуляцию процессов развития соцветия злаков (Somssich et al., 2016).

Показано, что многие гены, управляющие развитием соцветий двудольных и однодольных растений, дивергировавших около 200 млн лет назад (Wolfe et al., 1989), не консервативны. Например, не известен ортолог *A. thaliana* генов кукурузы *ball* и риса *LAX*, регулирующих инициацию аксиальных меристем соцветия (Komatsu et al., 2003b; Gallavotti et al., 2004).

Что касается отдаленных таксонов в пределах одного класса цветковых растений, например, представителей семейства Злаков, то наряду с

консервативными генетическими путями, обнаружены модули, регулирующие развитие специфичных меристем и структур соцветия у отдельных таксонов. Примером могут служить гены *Ra1 и Ra3* кукурузы, контролирующие развитие парных колосковых меристем, характерных только для представителей трибы Andropogoneae, ортологи которых не обнаружены у других злаков (Vollbrecht et al., 2005; Bortiri et al., 2006; Satoh-Nagasawa et al., 2006).

Генетическая регуляция развития соцветия пшеницы, колоса, который по своей структуре отличается от соцветия риса (модельного вида злаков), в целом, изучена недостаточно. Прежде всего это связано с особенностями структурной организации генома пшеницы, сложный состав И аллополиплоидная природа которого долгое время являлись препятствием для проведения его секвенирования, а отсутствие референсного генома усложняло выделение генов и установления их функциональной роли. Вместе с тем, отличительные черты строения соцветия пшеницы (отсутствие веточек, многоцветковость колоска) подразумевают наличие особенностей и в генетических механизмах, регулирующих его развитие.

Ортологи некоторых генов риса и кукурузы, участвующие В генетической регуляции развития соцветия, были обнаружены в геноме мягкой пшеницы. Однако большая часть этих генов не охарактеризована функционально, а консервативность функций генов предполагалась по сходному паттерну экспрессии. Примером могут служить гены пшеницы WFL (Shitsukawa et al., 2006) и TaMOC1 (Zhang et al., 2015 и др.). Использование В исследованиях форм пшеницы с измененными морфологическими характеристиками колоса, в основе которых лежат изменения схемы его развития, необходимо для точного определения функциональной роли генов, управляющих процессами развития.

Идентификация генов, управляющих развитием соцветий различных видов растений (таксономических классов), установление их структурнофункциональной организации являются важными задачами, которые относятся к одной из основных проблем биологии развития растений механизмов, изучению генетических лежащих В основе появления разнообразных форм высших растений. Кроме того, исследования генетических основ формирования фенотипических характеристик соцветий экономически значимых зерновых культур, непосредственно связанных с элементами продуктивности, имеют очевидную практическую значимость. У пшеницы к числу таких важных показателей относится число зерновок в соцветии, которое зависит от строения и озерненности колоска (Reynolds et al., 2012; Sreenivasulu, Schnurbusch, 2012).

На модельных видах растений были разработаны стратегии исследований генетической регуляции процессов развития, но их применение для изучения важных сельскохозяйственных культур со сложными геномами таких, как пшеница, не всегда представляется возможным. Полиплоидная природа генома пшеницы требует специальных подходов к изучению генетических механизмов, управляющих развитием соцветия.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал

2.1.1. Линии пшеницы с нестандартными морфотипами колоса

Объектом исследований послужили линии пшеницы и ржи с нестандартным морфотипом колоса.

MRS-линии. Линии озимой мягкой пшеницы *T. aestivum* L. Rŭc163-1-02 (далее Ruc163), Rŭc167-1-02 (далее Ruc167), V3-79-08, V3-82-08, V3-83-08, V3-84-08, V3-85-08, V3-86-08, V3-87-08, V3-88-08, V3-89-08 и V3-90-08, полученные д-ром П. Мартинеком (Dr. P. Martinek, Agrotest Fyto, Ltd, Кромержиж, Чешская республика), представляют морофотип колоса MRS (multirow spike) с множеством дополнительных колосков на уступах колосового стержня. Донором признака MRS всех перечисленных линий является ветвистоколосая форма мягкой пшеницы Ra1, полученная в результате химического мутагенеза и предоставленная Всероссийским институтом растениеводства имени Н.И. Вавилова (г. Санкт-Петербург, Россия).

Почти-изогенная линия яровой мягкой пшеницы NIL-mrs1 имеет колос морфотипа MRS. Донором признака MRS послужила линия KM240 (донор MRS-признака этой линии – Ra1), рекуррентным родителем – линия сорта мягкой яровой пшеницы Новосибирская 67. Почти-изогенная линия получена и любезно предоставлена проф. Н. Ватанабэ (Prof. N. Watanabe, College of Agriculture, Ibaraki University, Ибараки, Япония). Все линии морфотипа MRS, использованные в наших исследованиях, имеют общее происхождение.

Перечисленные далее линии мягкой пшеницы с дополнительными колосками на уступах – генетически не зависимы, имеют разное происхождение и являются спонтанными или индуцированными мутантами.

Линия озимой мягкой пшеницы *Skle128* характеризуется развитием трех колосков на большей части уступов колосового стержня. Линия
получена на основе Тибетской трехколосковой формы мягкой пшеницы (Tibetan triple-spikelet wheat, TTSW) *Triticum aestivum* L. conv. *tripletum* nom. nud., произрастающей в Тибете (Yang et al., 2005).

Колос линии озимой мягкой пшеницы *So164* характеризуется наличием двух сидячих колосков, расположенных рядом по горизонтали, представляя морфотип HS или *'tetrastichon* sessile spikelets' (синоним). Исходная форма была получена на основе скрещивания ветвистоколосой тетраплоидной пшеницы *T. turgidum* и мягкой пшеницы с простым колосом д-ром С. Корич (Dr. S. Korić, Agriculture University of Zagreb, Zagreb, Croatia). Исходная линия (образец N 7344-85) получена от проф. С. Бороевич (Prof. S. Borojevic, University of Novi Sad, Нови Сад, Сербия).

Ruc204 – линия яровой мягкой пшеницы с разветвленным колосом по типу GB/«turgidum», на уступе колосового стержня развиваются не только дополнительные колоски, но и вторичные колосковые оси («веточки»). Ветвистость проявляется при выращивании в полевых условиях г. Кромержиж (Чешская республика) и Новосибирской области, в условиях гидропонной теплицы (ИЦиГ РО РАН) на уступах развиваются только дополнительные сидячие колоски. Страна происхождения исходной линии '47hh-C' – Китай, однако детали ее происхождения не известны.

Линия *Ruc130* – линия озимой мягкой пшеницы, с разветвленным колосом по типу GB (Genuine Branching)/«*turgidum*», на уступе колосового стержня развиваются дополнительные колоски и вторичные колосковые оси («веточки»). Происхождение не известно.

Яровая линия мягкой пшеницы *MC1611* характеризуется развитием дополнительных колосков на уступах колосового стержня, в условиях теплицы (ИЦиГ СО РАН) единичные дополнительные колоски развиваются только на нижних уступах. Линия является индуцированным мутантом, получена В.М. Мельником (Алтайский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, г. Барнаул) при обработке семян мягкой яровой пшеницы сорта Саратовская 29 (С29) химическим мутагеном нитрозометилмочевиной. Линия любезно предоставлена к.б.н. Л.И. Лайковой (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск).

Линии озимой мягкой пшеницы **Rúc 57-11** и **Rúc 62-11** (далее Ruc57 и Ruc62, соответственно) представляют морфотип колоса VSS (vertical sessile spikelets) – парные или вертикальные колоски развиваются один над другим. VSS-признак перенесен в линии Ruc57 и Ruc62 из разных источников – форм Z GK 331-88 и Z GK 3-82, соответственно.

Все линии морфотипа MRS, за исключением NIL-*mrs1*, а также линии с дополнительными колосками Ruc30, Ruc204, Skle128, So164, Ruc57, Ruc62 были получены и любезно предоставлены д-ром П. Мартинеком. Линии получены при самоопылении исходных форм с последующим отбором.

Озимые линии мягкой пшеницы Ruc 30-11 и Ruc 34-11 со спиральным расположением колосков на уступах колосового стержня (морфотип SCR, screwed spike rachis) также получены д-ром П. Мартинеком. Донором SCR-признака изучаемых линий являлась форма пшеницы ZGK 242-82 (Югославия).

Линия **КТ 3–24** является индуцированным мутантом диплоидной пшеницы вида *Т. monococcum* L. (A^mA^m) с ветвистым колосом, полученным д-ром K. Yamashita (Amagai et al., 2014b).

Линия яровой тетраплоидной пшеницы Т. durum Desf. var. ramosoobscurum Jakubz. «Vetvistokoloskaya» **R-107** характеризуется ветвистостью колоса И представляет собой спонтанный мутант, обнаруженный в Дагестане (Amagai et al. 2014b).

Образец тетраплоидной пшеницы *T. turgidum* var. *plinianum* Koern. **К-40750** (страна происхождения – Болгария) представляет мотрфотип GB и имеет ветвистый колос тургидного типа. Образец получен из Всероссийского института растениеводства имени Н.И. Вавилова (г. Санкт-Петербург, Россия).

Линия тетраплоидной яровой пшеницы *T. turgidum* L. **PI 67339** представляет морфотип колоса «ложно-истинное» ветвление f-tR (false-true

ramification). Чистая линия на основе образца PI 67339 Национальной коллекции злаков США (NSGC USDA-ARS, National Small Grain Collection, United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service) получена проф. Н. Ватанабэ (Prof. N. Watanabe). Линии КТ 3–24, R-107, PI 67339 любезно предоставлены проф. Н. Ватанабэ.

Информация об использованных линиях с нестандартными морфотипами колоса приведена в Таблице 1 Приложения. Краткое описание всех изученных морфотипов приведено в Таблице 2 Приложения.

Наряду с линиями с нестандартными морфотипами в исследованиях использовались линии и сорта пшеницы со стандартным фенотипом колоса: линии яровых сортов мягкой пшеницы Новосибирская 67 (Н67), Саратовская 29 (С29), Скала; озимая линия мягкой пшеницы So 149-1-02 (So149), полученная от скрещивания коммерческих сортов пшеницы Sparta и ZG К 171-1-82 и предоставленная д-ром П. Мартинеком (Dr. P. Martinek); яровая линия тетраплоидной пшеницы вида *T. durum* Langdon 222 (LD222), образец РІ 418587 диплоидного вида *T. sinskajae* A. Filat. et Kurk. (A^mA^m), любезно предоставленные проф. Ватанабе. Линии сортов Н67, С29 и Скала любезно предоставлены к.б.н. Л.И. Лайковой (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск).

В работе использован сорт мягкой пшеницы Чайниз Спринг, нуллитетрасомные линии N2AT2B, N2BT2D и N2DT2B и серия делеционных линий, полученных на основе сорта Чайниз Спринг и несущих терминальные делеции хромосом 2-й гомеологичной группы: 2DS-4, 2DS-5, 2DL-6, 2DL-7, 2DL-8, 2DL-9, 2AL-1, 2AL-2, 2AL-3, 2BS-1, 2BS-2, 2BS-3, 2BS-6, 2BS-7, 2BS-9, 2BS-11, 2BS-14, 2BL-1, 2BL-3, 2BL-5, 2BL-6, 2BL-7 (Sears, 1954). Использованные нами линии содержат единичные делеции И поддерживаются в гомозиготном состоянии. Линии любезно предоставлены д-ром А. Бёрнером (Dr. A. Börner, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Гатерслебен, Германия).

75

2.1.2. Популяции гибридов

Для изучения особенностей наследования изучаемых признаков, проведения тестов на аллелизм и молекулярно-генетического картирования были использованы популяции гибридов пшеницы, полученные в ходе выполнения диссертационной работы.

2.1.2.1. Мягкая пшеница T. aestivum L.

Популяции F₂ от скрещиваний Ruc163 x So149 (106 растений) и Ruc167 x So149 (100 растений) использовались для изучения особенностей наследования признака MRS и молекулярно-генетического картирования гена *mrs1*.

Популяции F₂ от скрещиваний Ruc204 x C29 (149 растений) и Skle128 x C29 (134 растения) использовались для оценки вклада делеций хромосомы 2DS в определение признака многоколосковость у линий Ruc204 и Skle128.

Популяция F₂ от скрещивания MC1611 х Скала (158 растений) использовалась для картирования QTL, определяющих многоколосковость линии MC1611; популяция BC₁ MC1611/S29//MC1611 (140 растений) и MC1611/C29//C29 (155 растений) – для изучения особенностей наследования признака и определения аллельных вариантов гена *WFZP-D* у рекомбинантов со стандартным колосом и признаком «многоколосковость».

Популяции F₂ от скрещивания почти-изогенной линии NIL-*mrs1* и многоколосковых-линий Ruc204 (140 растений), Skle 128 (140 растений) и MC1611 (142 растения) использовались для выполнения теста на аллелизм.

Популяции F₁ и F₂ (152 растения) от скрещивания Ruc 30- 11 х H67 были получены для изучения типа наследования признака SCR.

Популяции F₂ от скрещиваний PI 67339/R-107 (143 растения) и PI 67339/K-40750 (162 растения) были получены для изучения возможного взаимодействия между генами *WFZP* и *SHR2*.

Популяция F₂ от скрещивания образцов тетраплодиных видов пшеницы R107/K-40750 (104 растения) была получена для выполнения теста на аллелизм.

2.1.2.2. Рожь посевная S. cereale L.

Особенности наследования и локализацию на молекулярногенетической карте хромосомы признака *monstrosum* ржи изучали с использованием популяции F₂ (75 растений), полученной от скрещивания инбредной линии ржи S11 со стандартным колосом и самонесовместимой формы ржи D40 с монстрозным колосом из Петергофской генетической коллекции ржи. Растения популяции F₂ были получены на основе самоопыления одного растения F₁. Семена родительских форм и гибридов F₁ были любезно предоставлены д.б.н. А.В. Войлоковым (Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Санкт-Петербург).

2.2. Оценка фенотипов растений

Растения выращивали в условиях тепличного комплекса ИЦиГ СО РАН и в полевых условиях на базе селекционно-генетического комплекса (СГК) ИЦиГ СО РАН г. Новосибирск. Оценку фенотипов колоса изучаемых линий проводили после полного созревания. Фенотипы многоколосковых линий описывали двумя способами: как наличие/отсутствие дополнительных колосков на уступах колосового стержня или разделяя популяции гибридов на фенотипические классы в зависимости от степени проявления признака. Фенотипы линий со спиральным расположением колосков на колосовом стержне полученных гибридов И на ИХ основе оценивали ПО наличию/отсутствию спирального скручивания колосового стержня.

Соответствие фактического расщепления теоретически ожидаемому в популяциях гибридов оценивали по критерию χ2 (Рокицкий, 1973).

2.3. Световая и электронная микроскопия

Развивающиеся соцветия вычленяли с использованием бинокулярного микроскопа Альтами ПС0745 («Альтами», Санкт-Петербург, Россия) из вторичных побегов растений на стадии 2-3-х полностью развернувшихся листьев. Растения выращивали в условиях гидропонных теплиц ИЦиГ СО PAH. Особенности развития соцветия изучали при помощи стереомикроскопа Carl Zeiss SteREO Discovery V12 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) и сканирующего электронного микроскопа Hitachi TM-1000 (Hitachi Ltd, Япония) при постоянном ускоряющем напряжении 15 кВ и степени разряжения в камере для образца 30–50 Па. Растительный материал для сканирующей электронной микроскопии не подвергали предварительной обработке. Для получения и обработки изображений использовали цифровую камеру высокого разрешения AxioCam MRc-5 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) и программное обеспечение AxioVision 4.8, а также оригинальное программное обеспечение для Hitachi TM-1000. Каждая стадия развития соцветия была изучена не менее, чем на 5–7 образцах каждой линии.

2.4. Выделение ДНК растений

ДНК выделяли из проростков или листьев растений согласно модифицированному методу Plaschke с соавт. (1995). В пробирке объемом 1.5 мл к измельченным тканям листа весом 50–100 мг добавляли 700 мкл буфера для экстракции [100мМ Трис-HCl, pH 7.5; 500 мМ NaCl; 50 мМ ЭДТА; 1.25% SDS; 3.8% Na2S2O5], измельчали с помощью гомогенизатора и инкубировали на водяной бане при 60°С в течение 1 часа. Затем добавляли 700 мкл смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24:1), перемешивали и

центрифугировали в течение 15 минут при 12000 об/мин. Для осаждения ДНК отбирали водную фазу в отдельную пробирку и добавляли 1.4 мл 96%-го этанола, охлажденного при -20°С, затем центрифугировали в течение 10 минут при 12000 об/мин. Осадок промывали небольшим количеством 70%-го этанола, затем высушивали на воздухе и растворяли в 50–100 мкл буфера ТЕ [10мМ Трис-HCl, pH 8.0; 1мМ ЭДТА]. Концентрацию ДНК определяли с помощью прибора NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

Образцы ДНК *Т. dicoccoides* ERGE33769 и ERGE33780, *T. durum* ERGE33795 и *T. turgidum* ERGE33819, а также сортов *T. aestivum* (Таблица 10 Приложения, №№ 1-22) любезно предоставлены д-ром П. Сурдий (Dr. P. Sourdille, UMR INRA-UBP, Клермон-Ферран, Франция). Образцы ДНК *T. militinae* Zhuk. et. Migusch. TRI 17488 и *T. timopheevii* Zhuk. K-38555, а также сортов *T. aestivum* (Таблица 10 Приложения, №№ 29-48) любезно предоставлены д.б.н. И.Н. Леоновой (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск).

2.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Полимеразную цепную реакцию проводили в реакционной смеси объемом 15 мкл, содержащей 50–100 нг ДНК-матрицы, 67мМ трис-HCl (pH 8.8), 1.8мМ MgCl₂, 0.01% Tween 20, 18мМ (NH₄)₂SO₄, по 0.2 мМ каждого дНТФ, по 0.25 мкМ прямого и обратного специфических праймеров, 1 ед. ДНК-полимеразы *Taq*, в следующих условиях: Преденатурация – 5 минут при 94°C; денатурация – 30 секунд при 94°C; отжиг матрицы с праймерами – 30 секунд при 50–60°C (в зависимости от структуры праймеров); элонгация – от 30 секунд до 2 минут (в зависимости от ожидаемого молекулярного веса продукта амплификации) при 72°C; число циклов – 35; достраивание ПЦР-фрагментов – 10 минут при 72°C.

Данный ПЦР-протокол использовался для получения продуктов для последующего секвенирования и для скрининга ВАС-библиотеки пшеницы. При скрининге ВАС-библиотеки реакцию проводили в объеме 10 мкл.

2.6. Микросателлитный анализ

В работе были использованы микросателлитные маркеры пшеницы Xgwm (Röder et al., 1998; Ganal, Röder, 2007), Xgdm (Pestsova et al., 2000), Xgpw (Sourdille et al., 2004), Xwmc (Gupta et al., 2002), Xbarc (Song et al., 2002, 2005), Xcfd (Guyomarc'h et al., 2002), Xcfe (Zhang et al., 2005; Zhang, 2006) и ржи Xrms и Xscm (Korzun et al., 2001), а также маркеры, разработанные нами к локусам WFZP-A, -B, -D (Добровольская и др., 2015). Информация о маркерах, включая первичную структуру ДНК и температуру отжига ожидаемого праймеров, молекулярный вес продукта амплификации, доступна перечисленных статей Интернет-ресурса ИЗ И http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml. Информация о праймерах к SSRлокусам, разработанных В ходе выполнения представленных В диссертационной работе исследований, приведена в Таблице 9 Приложения. Праймеры GWM с номерами больше 600 были любезно предоставлены д-ром M.C. Родер (Dr. Röder M.S., Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Гатерслебен, Германия) и д-ром М. Ганалом (Ganal M., TraitGenetics GMbH, Гатерслебен, Германия).

При амплификации разделении продуктов использованием С автоматических лазерных флуоресцентных секвенаторов ALF (Pharmacia) и ALFexpress (Amersham Biosciences) полимеразную цепную реакцию проводили по протоколу Röder et al. (1998) в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 50–100 нг ДНК-матрицы, 0.2 мМ каждого дНТФ, по 0.25 мкМ прямого и обратного праймера, 1.5 мМ MgCl2, 1 ед. *Таq*-полимеразы. Условия ПЦР: (1) преденатурация – 3 минут при 94°C; (2) денатурация – 1 минута при 94°C, отжиг матрицы с праймерами 1 минута при 50/55/60°C в зависимости от структуры праймеров, полимеризация 2 минуты при 72^oC, число циклов – 45; (3) достраивание фрагментов ПЦР 10 минут при 72^oC. Далее фрагментный анализ проводили на автоматических капиллярных секвенаторах ALF (Pharmacia) и ALFexpress (Amersham Biosciences) по протоколу Röder et al. (1998) в 6%-ом полиакриламидном геле с использованием SequaGel XR (Biozym) для секвенатора ALF и ReproGelTM High Resolution (Amersham Biosciences) для секвенатора ALF и ReproGelTM нир Resolution (Amersham Biosciences) для секвенатора ALFexpress. Для разделения фрагментов ПЦР в геле использовали буфер 1 х TБЕ [0.09 M трис-борат, 2 mM ЭДТА, pH 8.3]. Размер фрагментов ДНК определяли с помощью компьютерной программы Fragment Manager Version 1.2 (Pharmacia) относительно стандартных образцов ДНК известной длины.

При выполнении фрагментного анализа на капиллярном секвенаторе ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ПЦР проводили по протоколу Nicot et al. (2004) c использованием трех праймеров: пролонгированного с 5'-конца прямого праймера к SSR-локусу, обратного праймера к SSR-локусу и универсального флуоресцентно меченного по 5'концу праймера М13 (5'-САССАССТТСТААААССАС-3'). Использовали праймеры M13, меченные флуоресцентными красителями 6-FAM, VIC, NED и PET (Applied Biosystems). Из полученных продуктов ПЦР, меченных четырьмя различными флуоресцентными красителями (6-FAM, VIC, NED и РЕТ), формировали мультиплексные смеси. Смеси разводили в 60 раз бидистиллированной водой, отбирали 3 мкл, выпаривали при 60°C и передавали для дальнейшего фрагментного анализа в Центр коллективного пользования СО РАН (Межинститутский центр секвенирования). Программы ABI GeneScan версия 2.1, и Genotyper версия 2 (Applied Biosystems) использовали для определения длины фрагментов амплификации.

2.7. SSCP-анализ

SSCP-анализ проводился по протоколу Quraishi et al. (2009). Структура праймеров опубликована (Quraishi et al., 2009) и приведена в Таблице 4 Приложения. Для ПЦР-амплификации использовались праймеры, пролонгированные С 5'-концов последовательностями CACGACGTTGTAAAACGAC (прямой) CAGGAAACAGCTAGACC И (обратный). Продукты ПРЦ-амплификации получали в два этапа: на первом этапе геномная ДНК (30 нг на реакцию) амплифицировалась в реакционной смеси, содержащей 15 мкл 1mM Трис-NCl, 3.1 mM KCl, 5% глицерина, 400 мкМ дНТФ, по 0.4 мМ прямого и обратного праймера и 0.2 ед. Тадполимеразы (Qiagen) в общем объеме 15 мкл. Продукты ПЦР разводили в 10 раз и ре-амплифицировали в реакционной смеси такого же состава с добавлением по 0.2 мМ каждого флуоресцентно меченного праймера (6-FAM и NED) в объеме 15 мкл. Затем по 2 мкл продуктов амплификации, разведенных в 10 раз, смешивались со стандартом длины (900 bp MegaBase ET900-R Size Standard (GE Healthcare)), 0.2 мкл 0.3N NaOH и 9мкл HI-Di формамида (Applied Biosystems). Фрагменты разделяли капиллярным электрофорезом на секвенаторе ABI 3100 (Applied Biosystems) в течение 50 минут в капилляре длиной 36 см. Образцы денатурировали в течение 2 минут при 95°C, затем помещали на лед. После денатурации образцы наносили при 18/25/35°C и напряжении 15 kV. Результаты анализировали с помощью компьютерной программы Gene Mapper 3.7 (Applied Biosystems).

2.8. Электрофорез ДНК в агарозном геле. Подготовка продуктов ПЦР для секвенирования

Электрофоретический анализ геномной ДНК и продуктов ПЦР проводили по протоколу Maniatis et al. (1982) с модификациями. Разделение фрагментов ДНК проводили в 1-2%-ом агарозном геле, приготовленном на

ТАЕ-буфере [40мМ Трис-HCl pH 8.0, 20 мМ ацетат натрия, 1 мМ ЭДТА] с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0.01 мкг/мл. Электрофорез проводили при напряжении 3–7 вольт/см в течение 1-2 часов, затем фотографировали в УФ-свете с использованием системы для фотографирования гелей «Biodoc» (Германия). В качестве маркера длины фрагментов ДНК использовали маркеры «100bp» или «1 kb» (ООО Лаборатория МЕДИГЕН).

При получении продукта ПЦР ожидаемого молекулярного веса проводили очистку осаждением с использованием смеси «этанол–ацетат аммония». Полученные продукты ПЦР осаждали добавлением ацетата аммония до концентрации 2.5М и 2.5 объема 96%-го этанола, смесь оставляли в течение 20 минут при комнатной температуре, далее проводили центрифугирование в течение 20 минут при 12000-16000 об/мин, полученный осадок дважды промывали 250 мкл свежеприготовленного 80%-го этанола, сушили на воздухе при комнатной температуре. Осадок растворяли в 10 мкл бидистиллированной воды и концентрацию ДНК измеряли при помощи прибора NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

При наличии дополнительных продуктов амплификации, проводили выделение ДНК из геля. После проведения электрофореза в 1%-ом агарозном геле, с помощью скальпеля выделяли участки, содержащие фрагменты ДНК ожидаемого молекулярного веса, и помещали их в заранее взвешенную пробирку. Выделение производили с помощью набора для элюции ДНК из агарозного геля (Компания Биосилика) в соответствии с инструкцией производителя.

2.9. Анализ первичной структуры ДНК

Продукты ПЦР анализировали с помощью набора для секвенирования «ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing ready reaction kit» (Perkin Elmer) с использованием прямого и обратного специфических праймеров.

Каждый ПЦР-фрагмент ДНК секвенировали в обоих направлениях. Реакцию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 10-40 нг ДНК-матрицы, 1мкМ прямого или обратного праймера, 1.5 мкл Big Dye v.3.1 (Perkin Elmer) в следующих условиях: денатурация 40 секунд при 96°С; отжиг матрицы с праймерами 30 секунд при 55°С; полимеризация 4 минуты при 60°С; 25 циклов. Полученные продукты осаждали добавлением смеси 'ацетат аммония-этиловый спирт", как описано выше для осаждения продуктов ПЦР. Высушенный осадок передавали для анализа в центр коллективного пользования СО РАН (Межинститутский центр секвенирования). Анализ проводился на приборе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Полученные в результате секвенирования хроматограммы, анализировали с помощью программы CHROMAS (Technelysium Pty Ltd).

Поиск гомологии нуклеотидных аминокислотных И последовательностей проводили с использованием алгоритмов FASTA и BLAST (Altschul et al., 1990) В базах NCBI данных (www.ncbi.nlm.nih.gov/Database/), GrainGenes (http://wheat.pw.usda.gov/), TREP REPBASE (www.girinst.org). (http://wheat.pw.usda.gov/) И Множественное выравнивание последовательностей и их кластерный анализ выполнялись с помощью программы Clustal W (version 1.7; Thompson et al., 1994). Трансляцию нуклеотидных последовательностей в аминокислотные **Utilities**» проводили программы «Sequence с помощью (http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_12.html).

2.10. Выделение РНК растений. Обратная транскрипция

Суммарную РНК выделяли из развивающихся соцветий, а также из вегетативных органов растений пшеницы сорта Чайниз Спринг, выращенных в условиях гидропонной теплицы.

Соцветия выделяли на следующих стадиях развития:

84

1) Дифференцировка колоска (на периферии колосковых меристем становятся различимыми зачатки колосковых чешуй);

2) Ранняя стадия дифференцировки цветка 1 (происходит закладка цветковых меристем 1-го и 2-го цветков базальной части колоска);

3) Ранняя стадия дифференцировки цветка 2 (формируются цветковые меристемы базальной части колоска, закладываются органы цветка);

4) Поздняя стадия дифференцировки цветка (органы цветка полностью дифференцированы (обычно, в 5-и цветках базальной части колоска), апикальная меристема соцветия инициировала терминальный колосок).

Развивающиеся соцветия вычленяли с помощью скальпеля под бинокулярным микроскопом Альтами ПС0745 («Альтами», Санкт-Петербург, Россия) и замораживали в жидком азоте. Каждый образец включал от 5-и до 8-и соцветий. Кроме того, РНК выделяли из листьев и корней растений, соцветия которых находилась на стадии дифференцировки цветка. Образцы РНК выделяли в трех повторностях с помощью набора реактивов ZR Plant RNA MiniPrepTM (Zymo Research Corp.) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Очистку PHK от примесей ДНК проводили при помощи набора реактивов QIAGEN DNase Kit (Qiagen) с использованием колонок и набора реактивов QIAGEN RNeasy^R MinElute^R Cleanup Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендациями производителя. кДНК синтезировали из 0.5 мкг суммарной PHK с помощью обратной транскрипции, используя набор реактивов «Transcriptor first strand cDNA synthesis kit» (Roche), в реакции объемом 20 мкл в соответствии с инструкциями производителей.

2.11. Количественная ОТ-ПЦР

Продукты реакций обратной транскрипции разводили до объема 200 мкл и по 4 мкл синтезированной кДНК использовали в качестве матрицы для количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Реакции проводили в 10 мкл

1х реакционной смеси «LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master» (Roche Diagnostics) с использованием системы LightCycler® 480 (Roche Diagnostics) в следующих условиях: преденатурация – 15 минут при 94°C; денатурация – 10 секунд при 94°C; отжиг матрицы с праймерами – 20 секунд при 60°C; полимеризация – 20 секунд при 72°C; число циклов – 55; затем снимались показания для построения кривых плавления продуктов ПЦР в условиях: 15 секунд при 95°C; 15 секунд при 60°C; 15 секунд при 95°C. Амплификацию трех гомеологичных копий гена *WFZP* проводили с использованием специфических праймеров (Таблица 6 Приложения). Все образцы были приготовлены в трех технических повторностях. В качестве отрицательного контроля проводилась ПЦР с добавлением бидистиллированной воды вместо матрицы.

результатов Анализ проводили применением программного С обеспечения LightCycler®480 версии 1.5.0 (Roche Diagnostics) с помощью порогового метода сравнения графиков накопления ДНК. Эффективность ПЦР для каждого гена определялась по последовательным разбавлениям образца (8 десятикратных разведений). Для стандартизации количества кДНК количественная ОТ-ПЦР праймерами матрицы проводилась с к референсному гену *Ta.304.3* (структура праймеров: ССТСТGAGAGCCTCCACGTС (прямой), ТGGTAAGCAGGACACCCAAAC (обратный)).

2.12. Построение молекулярно-генетических карт хромосом, картирование генов

Построение молекулярно-генетических карт проводилось на основе данных по генотипированию и фенотипированию индивидуальных растений картирующих популяций, полученных в ходе выполнения исследований в рамках диссертационной работы. Образцы ДНК растений картирующей популяции F₂ K 3-24 х PI 418587 были любезно предоставлены проф.

Н. Ватанабэ (Prof. N. Watanabe). Образцы ДНК картирующей популяции F_2 Чайниз Спринг х Ренан были любезно предоставлены д-ром П. Сурдий (Dr. P. Sourdille). Картирование гена *FZP Ae. speltoides* проводилось с использованием картирующей популяции F_2 8 x 37 (Dobrovolskaya et al., 2011).

Для построения молекулярно-генетических карт хромосом И картирования генов использовали компьютерную программу MAPMAKER/Exp version 3.0b (Lander et al., 1987). Генетические расстояния между маркерами определяли с помощью функции Косамби (Kosambi, 1944) при величине показателя LOD ≥ 3.0. Порядок взаимного расположения маркеров и генетические расстояния на картах хромосом сопоставляли с опубликованными panee данными (Somers et al., 2004; Sourdille et al., 2004; Ganal, Röder, 2007; Khlestkina et al., 2004, Quraishi et al., 2009). Соответствие наблюдаемого в популяциях расщепления по маркерам и признакам теоретически ожидаемому определяли с помощью критерия χ² (Рокицкий, 1973).

молекулярно-генетические Консенсусные карты хромосом конструировались с помощью программы BioMercator версии 2.1 (Arcade et al., 2004). Вычисления проводились на основе данных о положении ДНКмаркеров на опубликованных ранее картах – Ganal, Röder (2007), ITMI (International Triticeae Mapping Initiative) (http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSRclub/GeneticPhysical), а также картах сконструированных хромосомы 2DS, В ходе выполнения наших исследований (Dobrovolskaya et al., 2009). Автоматическая компиляция карт, содержащих RFLP, SSR локусы и локус гена Mrs1, была проведена по описанному ранее методу (Arcade et al., 2004), исходной картой была выбрана карта ІТМІ.

2.13. Картирование локусов количественных признаков (QTL)

Картирование локусов количественных признаков (QTL) проводили с помощью программы MapQTL 5 (van Ooijen, 2004). Использовали алгоритм интервального картирования.

2.14. Разработка и картирование новых микросателлитных (SSR) маркеров

Для идентификации SSR-повторов использовали программу «SSR locator» (Maia et al., 2008) при следующих параметрах поиска: минимум 6 5 повторов ДЛЯ динуклеотидных микросателлитов, повторов ЛЛЯ 4 тринуклеотидных микросателлитов И повтора тетра-/пента-ДЛЯ /гексануклеотидных микросателлитов для совершенных повторов; максимум 3 неповторяющихся основания, разделяющих микросателлиты, для максимум несовершенных повторов; 100 блоками п.н. между микросателлитов для компаундов. Праймеры к микросателлитным локусам разрабатывали при помощи программы Primer3 (Untergasser et al., 2012). Структура разработанных праймеров приведена в Таблице 9 Приложения. ПЦР проводили на образцах суммарной ДНК, выделенных из растений линий и сортов мягкой пшеницы, перечисленных в Таблице 9 Приложения, а также из индивидуальных растений картирующей популяции F₂, полученной от скрещивания сортов мягкой пшеницы Чайниз Спринг и Ренан, согласно протоколу Nicot et al. (2004). Разделение фрагментов ПЦР выполняли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Размер фрагментов рассчитывали с помощью компьютерной программы ABI GeneScan, version 2.1, разработанной компанией Applied Biosystems. Новые микросателлитные маркеры интегрировали в ранее сконструированные генетические карты хромосом 2A, 2B и 2D мягкой пшеницы (Dobrovoskaya et al., 2015) с помощью компьютерной программы МАРМАКЕR/EXP ver. 3.0b (Lander et al., 1987), используя картирующую функцию Косамби (Kosambi, 1944) при LOD \geq 3.00.

2.15. Скрининг ВАС-библиотеки пшеницы сорта Чайниз Спринг и установление первичной структуры ДНК ВАС-клонов

Исследования выполнялись с использованием BAC (bacterial artificial chromosome) библиотеки «Tae-B-Chinese Spring», полученной на основе сорта Чайниз Спринг мягкой пшеницы *T. aestivum* в INRA – CNRGV г. Тулуза, Франция (http://cnrgv.toulouse.inra.fr/), по опубликованному протоколу Dibari et al. (2012). Библиотека имеет девятикратное покрытие генома и состоит из 1147776 клонов, организованных в 2988384-луночных планшетах (http://cnrgv.toulouse.inra.fr/fr/library/genomic_resource/Tae-B-Chinese%20spring).

На первом этапе проводился скрининг ДНК 2D (двухмерных) ВАСсуперпулов, организованных в одном 384-луночном планшете. Принцип создания 2D-BAC-суперпулов и порядок расположения ДНК ВАСсуперпулов в 384-луночном планшете приведены на Рисунках 3 и 4 Приложения. Скрининг проводился С использованием праймеров, разработанных к консервативным районам ортологов гена FZP (Таблица 6 Приложения). ПЦР проводилась по протоколу, приведенному в Разделе 2.4. Номера «позитивных планшетов», то есть планшетов, содержащих ВАСклоны с целевыми последовательностями ДНК, определяли по координатам, которые представляли собой пересечение «позитивных» строк и столбцов, как показано на Рисунке 6 Приложения. «Позитивные» строки и столбцы определяли по результатам амплификации ДНК 2D (двухмерных) ВАСсуперпулов, как показано на Рисунке 5 Приложения. На втором этапе определяли «позитивные» ВАС-клоны, содержащие целевые последовательности пшеницы, гомологичные гену FZP риса. Скрининг «позитивных» 384-луночных планшетов с целью поиска «позитивных» ВАС-

клонов проводили по вышеописанному протоколу, примененному для скрининга 2D (двухмерных) ВАС-суперпулов.

Секвенирование ВАС-клонов проводили на пиросеквенаторе GS Junior (Roche), используя технологию 454-секвенировния в соответствии с протоколом производителя, на платформе GENTYANE (UMR-1095 GDEC, Клермон-Ферран, Франция).

2.16. С-дифференциальное окрашивание

С-дифференциальное окрашивание проводили по раннее опубликованной методике (Badaeva et al., 1994). Препараты анализировали при помощи микроскопа Leitz Wetzlar. Для получения изображений использовали цифровую камеру CCD Leica DFC 280. Хромосомы классифицировали в соответствии со стандартной номенклатурой (Gill et al., 1991). С-дифференциальное окрашивание проводилось д.б.н. Е.Д. Бадаевой (Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва).

2.17 Флуоресцентная *in situ* гибридизация

Флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с зондами на основе клонированных повторенных последовательностей ДНК (pSc119.2 и pAs1) проводили в соответствии с ранее опубликованной методикой (Salina et al., 2006). Зонды метили биотином или дигоксигенином с помощью ПЦР со специфическими праймерами или с помощью реакции ник-трансляции. Детекция биотинилированных зондов проводилась с помощью флуоресцеин авидина (Fluorescein Avidin D, Vector Laboratories). Сигнал гибридизации усиливался с применением флуоресцеин анти-авидина (Fluorescein Anti-Avidin D, Vector Laboratories). Дигоксигенин-меченые зонды выявляли с помощью антител к дигоксигенину, связанных с родамином (Anti-digoxigenin-rhodamine Fab fragments, Roche Applied Science). Препараты

заключали в среду, замедляющую выцветание флуоресценции (Vectashield mounting medium, Vector Laboratories), содержащую 0.5 мкг/мл DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol, Sigma) для окрашивания хромосом, и анализировали с помощью микроскопа «Axioskop» 2 Plus (Zeiss). Изображение регистрировалось CCD-камерой VC-44 (PCO). Флуоресцентная *in situ* гибридизация проводилась к.б.н. И.Г. Адониной (ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск).

Глава З. ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РАЗВИТИЯ СОЦВЕТИЯ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ С НЕСТАНДАРТНЫМИ МОРФОТИПАМИ КОЛОСА

Для изучения морфогенеза соцветия пшеницы была создана коллекция линий пшеницы, состоящая из групп с однотипными изменениями морфогенеза. Формирование этой коллекции проводилось на основе признаковых или фенотипических коллекций линий и форм пшеницы с морфологическими Фенотипические нестандартными типами колоса. собранные коллекции, на начальном этапе работы, (1)включали многоколосковые формы диплоидной (*T. monococcum*), тетраплоидных (*T. durum*, *T. turgidum*) и гексаплоидной (*T. aestivum*) видов пшеницы и (2) формы мягкой пшеницы *T. aestivum* со спиральным расположением колосков на колосовом стержне. При самоопылении в ряде поколений с последующим отбором по фенотипу колоса на основе форм пшеницы с измененной морфологией колоса были получены чистые линии. Линии, которые стабильно проявляли изучаемые признаки в условиях тепличного комплекса и в полевых условиях, были использованы в дальнейших исследованиях. линиях, включая особенности Информация о фенотипов колоса И происхождение линий, представлена в Таблице 1 Приложения.

3.1. Особенности строения колоса многоколосковых линий пшеницы 3.1.1. Многоколосковые линии мягкой пшеницы *T. aestivum*

Визуальная оценка фенотипа колоса многоколосковых линий показала, что они представляют собой гетерогенную группу, отличаясь характерными для каждого морфотипа чертами.

Колосья линий Ruc163, Ruc167, NIL-*mrs1*, V3-79-08, V3-82-08, V3-83-08, V3-84-08, V3-85-08, V3-86-08, V3-87-08, V3-88-08, V3-89-08 и V3-90-08 морфотипа MRS (multirow spike) характеризуются наличием дополнительных

колосков на уступах колосового стержня (Рисунок 3.1). Признак MRS-линий стабильно наследовался и проявлялся как в полевых условиях, так и в условиях тепличного комплекса ИЦиГ СО РАН. Особенностью этого морфотипа является формирование кластеров, состоящих из множественных сидячих колосков, на уступах колосового стержня. Число колосков в кластере может достигать десяти. Признак наиболее выражен в нижней трети колоса, при этом некоторые дополнительные/сверхчисленные колоски могут не развиваться полностью. В центральной части и в верхней трети колоса развивается по два-три колоска на уступе, что напоминает строение колоса шестирядного ячменя. Колоски этой части колоса, как правило, содержат по три фертильных цветка. В верхушечной части строение колоса стандартное: развивается по одному колоску на каждом уступе. Различия в проявлении признака между MRS-линиями связаны с разным числом уступов колоса, содержащих дополнительные колоски, и числом дополнительных колосков на одном уступе. Удлинённые колосковые оси на уступах линий морфотипа MRS, как правило, не формируются.



Рисунок 3.1 – Колосья (а) стандартного типа сорта Чайниз Спринг и (б) линии V3-79-08 морфотипа MRS с кластерами сидячих колосков на уступах колосового стержня (Разработан автором)

Колос линии Skle128, полученной на основе Тибетской трехколосковой формы пшеницы TTSW (Tibetan triple-spikelet wheat), напоминает колос линий морфотипа MRS – на одном уступе формируется несколько (чаще всего три) сидячих колосков, «веточки» на уступах не формируются (Рисунок 3.2). Признак стабильно наследовался и проявлялся сходным образом в разных условиях выращивания.



Рисунок 3.2 – Колос линии Skle128 (Разработан автором)

Строение колоса линии Ruc204 при выращивании в условиях тепличного комплекса напоминало строение колоса линий морфотипа MRS: на уступе колосового стержня развивались дополнительные (сверхчисленные) сидячие колоски (Рисунок 3.3). При выращивании в полевых условиях, наряду с дополнительными сидячими колосками, на уступах развивались удлиненные оси колоска, и колос становился ветвистым (Рисунок 3.3б), представляя морфотип GB (Genuine Branching).

Колос линии Ruc130 при выращивании и в полевых условиях, и в условиях тепличного комплекса ИЦиГ СО РАН был ветвистым (Рисунок 3.4).



Рисунок 3.3 – Колосья растений линии Ruc204, выращенных в условиях теплицы (а) и в полевых условиях (б) (Разработан автором)



Рисунок 3.4 – Колосья растений линии Ruc130, выращенных (а) в полевых условиях и (б) условиях теплицы (справа – колосовой стержень с удаленными колосками; стрелками обозначены удлиненные вторичные оси колоса/«веточки») (Разработан автором)

Степень проявления признака у многоколосковой линии MC1611 варьировала в зависимости от условий выращивания. Так, в полевых условиях колос линии имел множество дополнительных колосков, а при выращивании в теплице только единичные дополнительные колоски развивались на нескольких уступах колосового стержня (Рисунок 3.5). По степени проявления признака (числу уступов колоса, содержащих сверхчисленные колоски, и числу сверхчисленных колосков на уступах) линия MC1611 уступала остальным многоколосковым линиям. Колос линии представляет морфотип HS (horizontal spikelets).



Рисунок 3.5 – Колосья растений линии MC1611, выращенных (а) в условиях теплицы и (б) в полевых условиях. Стрелками обозначены уступы с дополнительными колосками (Разработан автором)

На уступах колоса линии So164 формировалась пара дополнительных колосков, расположенных в горизонтальной плоскости, что характерно для морфотипа HS/"tetrastichon" (Рисунок 3.6). Фенотип линии наблюдали в условиях тепличного комплекса. Линия стабильно проявляла признак в

полевых условиях г. Кромержиж Чешской республики (личное сообщение дра П. Мартинека (Dr. P. Martinek)).



Рисунок 3.6 – Колос линии So164. Уступы с дополнительными колосками обозначены стрелками (Разработан автором)

Линии Ruc57 и Ruc62 представляли морфотип VSS (vertical sessile spikelets). У этих линий формировались парные колоски, расположенные один над другим по вертикали. Фотографическое изображение колоса с дополнительными вертикальными колосками представлено на Рисунке 3.7. В некоторых случаях на уступах колоса ниже колосков наблюдали развитие структур, напоминающих видоизмененные колосковые чешуи (Рисунок 3.7).

Все изучаемые многоколосковые линии мягкой пшеницы были фертильными и цветки эктопических колосков, как и цветки первичных колосков, формировали зерновки.

Таким образом, детальная визуальная оценка фенотипов показала, что изучаемые многоколосковые линии мягкой пшеницы можно разделить на группы.

(1) Линии, колосья которых имеют дополнительные сидячие колоски (морфотипы MRS, HS, TTSW), (2) ветвистоколосые линии (GB) и (3) линии, у которых в зависимости от условий выращивания развивался либо колос с сидячими колосками, либо ветвистый колос (HS-GB). Линии различались степенью проявления признака (числом уступов с дополнительными колосками и числом колосков на уступе), на выраженность признака оказывали влияние условия выращивания.



Рисунок 3.7 – Колос линии Ruc62 морфотипа VSS (vertical sessile spikelets) с дополнительными вертикальными колосками (отмечены стрелками) (а) и фрагмент колоса с чешуевидной структурой (обозначено звездочкой) на уступе колоса (б) (Разработан автором)

У всех линий, за исключением морфотипа VSS, сидячие дополнительные колоски располагались на уступах под углом к первичному колоску. Обобщенные результаты визуальной оценки многоколосковых линий мягкой пшеницы представлены на Рисунке 3.8. Полученные нами данные о влиянии условий окружающей среды на проявление признака многоколосковости согласуются с результатами, полученными ранее другими авторами (Percival, 1921; Sharman, 1944; Pennell, Halloran, 1983).



Рисунок 3.8 – Фенотипы колоса стандартного типа (А) линии сорта Новосибирская 67 (Н67) и морфотипов, (В) MRS, (С) HS-GB, (D) HS (TTSW), (E, F) HS. Под каждой фотографией колоса размещено схематическое изображение его строения. B-D, F – показаны фенотипы колоса линий в разных условиях выращивания (справа – в полевых условиях, слева – в условиях тепличного комплекса). HS (horizontal spikelets) – горизонтальные колоски; MRS (multirow spike) – многорядный колос; GB (genuine branching) – ветвистый колос; SS (supernumerary spikelets) – сверхчисленные колоски; TTSW (Tibetan triple-spikelet wheat) – Тибетская трехколосоковая пшеница, WT – дикий тип (Dobrovolskaya et al., 2015)

3.1.2. Особенности строения колоса многоколосковых линий тетраплоидных и диплоидных видов пшеницы

Образец тетраплоидной пшеницы *T. turgidum* К-40750 имеет ветвистый колос тургидного типа: на уступах нижней трети/половине колосового стержня наряду с сидячими дополнительными/сверхчисленными колосками

развиваются длинные колосковые оси, на которых, в свою очередь, формируются дополнительные колоски (Рисунок 3.9). Признак стабильно наследовался и проявлялся в разных условиях выращивания растений. Фенотип колоса полностью соответствовал детально описанному ранее фенотипу ветвистоколосых образцов вида *T. turgidum* (Percival, 1921).



Рисунок 3.9 – Колосья (а) стандартного типа линии LD222 *Т. durum*, (б) морфотипа HS-GB линии R-107 *Т. durum* и (в) морфотипа GB (тургидный тип колоса) образца К-40750 *Т. turgidum* (Dobrovolskaya et al., 2017)

Колосья линии R-107 *T. durum* за все время наблюдений (2013–2017 гг.) демонстрировали другой фенотип – FRS (four rowed spike), когда на уступах колосового стержня формировались преимущественно парные колоски, расположенные по горизонтали, развитие колосковых осей на уступах практически не наблюдалось. Крайне редко наблюдали формирование укороченных «веточек».

Мутант КТ 3–24 (Рисунок 3.10) диплоидной пшеницы вида *Т. топососсит* характеризовался ветвистым колосом и/или наличием дополнительных колосков на уступах, при этом колосковые оси были укорочены по сравнению с осями колоса типичного тургидного типа вида *T. turgidum* (Рисунок 3.9).



Рисунок 3.10 – Ветвистый колос линии КТ 3–24 *Т. топососсит* (в центре) с обозначением стрелками дополнительных колосков на удлиненной оси колоска, отделенного от оси колоса (справа), и неветвистый колос образца PI 418587 *T. sinskajae* (слева) (Dobrovolskaya et al., 2017)

По сравнению с вышеописанными многоколосковыми линиями, линия РІ 67339 тетраплоидной пшеницы *T. turgidum* существенно отличалась строением колоска, на удлиненной оси которого в базальной части формировались нормальные зерновки, а в дистальной – дополнительные колоски (Рисунок 3.11).

Детальный анализ строения колоса показал, что удлиненная колосковая ось заканчивается терминальным (верхушечным) колоском (Рисунок 3.11 С), что, в целом, не характерно для видов пшеницы разного уровня плоидности (Shitsukawa et al., 2009). Эта особенность для растений морфотипа «ложноистинная ветвистость» колоса ранее не была описана. Что касается формирования дополнительных колосков на удлинённой оси колоска и двух зерновок в базальной части колоска, наши результаты подтверждают полученные ранее (Amagai et al., 2017).



Рисунок 3.11 – Строение колоса морфотипа «ложно-истинное ветвление» линии PI 67339 *Т. turgidum* (A) с удлиненными видоизмененными колосками (B), содержащими пару зерновок в базальной части колоска (D) и эктопические колоски в дистальной части колоска (C). (E) Схематическое изображение колоска линии PI 67339. Обозначения: f (floret) – цветок, gl (glume) – колосковая чешуя, gr (grain) – зерновка, еs (ectopic spikelet) – эктопический колосок, ets (ectopic terminal spikelet) – эктопический терминальный колосок, im (inflorescence meristem), 1 (lemma) – нижняя цветковая чешуя, lo (lodicules) – лодикулы, pa (palea) – верхняя цветковая чешуя, у ешуя, pi (pistil) – пестик, st (stamen) – тычинка (Dobrovolskaya et al., 2017)

Следует отметить, что ориентация дополнительных колосков по отношению к оси колоска и первичному колоску (90⁰) линии PI 67339 совпадает с ориентацией дополнительных колосков на «веточках» колосьев GB-морфотипа (тургидного типа колоса) линий R204, Ruc130 и K-40750.

В соответствии с наблюдаемыми особенностями строения колоса все многоколосковые линии пшеницы были отнесены к следующим морфотипам:

1) MRS – формирование кластера множественных колосков на уступах: линии Ruc163, Ruc167, V3-79-08, V3-82-08, V3-83-08, V3-84-

08, V3-85-08, V3-86-08, V3-87-08, V3-88-08, V3-89-08, V3-90-08, NIL*mrs1*;

2) HS/FRS/TTSW – несколько, пара или тройка, колосков на уступе, расположенных в горизонтальной плоскости: линии MC1611, R-107, Ruc128, So164;

3) VSS – пара вертикальных колосков на уступе: линии Ruc57 и Ruc62;

 4) GB/тургидный тип колоса – ветвистый колос: линии Ruc204, Ruc130, K-40750, KT 3–24;

5) f-tR – ложно-истинное ветвление колоса: линия PI 67339.

Таким образом, визуальная оценка колоса многоколосковых линий диплоидных, тетраплоидных и гексаплоидных видов пшеницы выявила группы, обозначенные в соответствии с предложенной д-ром П. Мартинеком номенклатурой для тетраплоидных и гексаплоидных видов пшеницы (Martinek, 1998). Основные отличительные особенности групп касались числа дополнительных колосков на уступах и их ориентации относительно оси колоса, а также наличия/отсутствия удлиненных вторичных осей соцветия («веточек»), которые у линий различались по длине.

3.2. Изучение особенностей развития соцветий многоколосковых линий мягкой пшеницы с применением методов микроскопии

Детальный анализ особенностей развития соцветий многоколосковых линий мягкой пшеницы (MRS) с использованием световой и сканирующей электронной микроскопии проводился на материале (1) почти-изогенной линии NIL-*mrs1*, несущей маркерный ген *mrs1*, в сравнении с рекуррентным родителем — линией сорта Новосибирская 67 (H67), (2) мутантной многоколосковой линии MC1611 и линии исходного сорта Саратовская 29

(C29). Кроме того, изучали особенности развития многоколосковых линий Skle128, Ruc204, Ruc57 и Ruc62.

3.2.1. Развитие соцветия морфотипа MRS (линия NIL-mrs1)

В норме соцветие пшеницы детерминировано. Апикальная меристема соцветия последовательно дает начало латеральным меристемам, которые развиваются в латеральные колоски пока не сформируется терминальный колосок. Каждая первичная аксиальная (колосковая) меристема развивается в единственный латеральный колосок, состоящий из множества цветков (Bonnet, 1936).

В наших исследованиях на ранних этапах развития соцветия при формировании колосковых меристем и закладке зачатков (примордиев) первых органов колоска (колосковых чешуй) различий в развитии между линиями NIL-mrs1 и H67 выявлено не было (Рисунок 3.12 J, K). Первые различия появлялись на ранней стадии дифференцировки вторичных аксиальных меристем, при этом у мутантных соцветий вместо примордиев органов цветка, расположенных в базальной части колоска, наблюдали появление примордиев органов колоска – колосковых чешуй (Рисунок 3.12 P). В соцветии дикого типа линии H67 (Рисунок 3.12 L, O, R) колосковая меристема инициировала органы колоска и флоральную меристему, которые в следующей последовательности: появлялись первыми становились различимыми примордии двух колосковых чешуй, затем инициировались флоральные меристемы, и на их периферии формировались примордии двух цветковых чешуй, дальше происходила дифференцировка органов цветка (двух лодикул, пестика и трех тычинок). Колосок дикого типа H67 не детерминирован и состоит из нескольких цветков, которые развиваются акропетально.



Рисунок 3.12 – Многоколосковый фенотип пшеницы. (А) Колос (слева) и колосок (справа) стандартного типа (Новосибирская 67, Н67) и схематическое изображение строения колоска дикого типа (в верхней части). (В) Схематическое изображение различных морфотипов пшеницы: MRS (multirow spike) – кластер колосков на уступе; HS (horizontal spikelets) – два или три колоска в горизонтальной плоскости

на уступе, RS (ramified spike) – «веточка» с дополнительными колосками на уступе. WT (wild type) – дикий тип (spikelet – колосок; rachis – ось колоса). (С) Колос линии NIL-mrs1 (слева) с кластером колосков на уступе колоса (справа), где дополнительные колоски отмечены красными стрелками, и схематическое изображение строения колоска морфотипа MRS линии NIL-mrs1. (D-G) Анализ соцветия линии NIL-mrs1 на различных стадиях развития при помощи световой микроскопии. (D) Стадия дифференцировки колоска (стрелками обозначены примордии колосковых чешуй). (Е и F) Ранняя стадия дифференцировки цветка (вторичные аксиальные меристемы, которые на следующем этапе развития дают начало эктопическим колоскам (es, ectopic spikelet) обозначены звездочками). (G) Поздняя стадия дифференцировки органов цветка с обозначением колосков, развивающихся по стандартной схеме (ws, wild-type spikelet) и эктопических колосков (es). (H) Ветвеподобная структура, отделенная от колосового стержня соцветия NIL-mrs1 с обозначением эктопических колосков (es). (I) Расположение эктопических колосков на уступе колоса NIL-mrs1. Масштаб изображения: 0.25 мм. (J-S) SEM анализ соцветий H67 (WT) и NIL-mrs1 (mrs1) на различных стадиях развития. (J и K) Стадия дифференцировки колоска (J) соцветия дикого типа H67 и (K) MRS-типа. (L) Ранняя стадия дифференцировки цветка, закладка цветковых меристем у соцветия H67. (М и N) Дифференцировка вторичных аксиальных меристем (AxM), обозначенных звездочками, у линии NIL-mrs1. (О) Ранняя стадия развития цветка, появление верхней колосковой чешуи у H67 (WT). (Р и Q) чешуй (gl* Развитие эктопических колосковых и обозначено стрелками), цветковых чешуй вторичными аксиальными меристемами (обозначены звездочками) у NIL-mrs1. (R) Стадия дифференцировки цветка, дифференцировка органов в базальных цветках у соцветия дикого типа. (S) развитие эктопических колосков в колоске у NIL-mrs1. Мастаб: 100 мкм. Обозначения: es2nd – вторичный эктопический колосок (развивается на месте цветка первичного эктопического колоска), f (floret) – цветок, fm (floral meristem) – флоральная (цветковая) меристема, gl (glume) – колосковая чешуя, im (inflorescence meristem) – меристема соцветия, l (lemma) – нижняя цветковая чешуя, lo (lodicules) – лодикулы, pa (palea) верхняя цветковая чешуя, pi (pistil) – пестик, ts (terminal spikelet) – терминальный колосок, sm (spikelet meristem) – меристема колоска, st (stamen) – тычинка. Все колоска отмечены обозначения органов эктопического звездочкой (*) в обозначении (Dobrovolskaya et al., 2015)

У соцветий дикого типа после закладки двух колосковых чешуй колосковая меристема последовательно дает начало флоральным меристемам и, в то время как в расположенных в базальной части колоска меристемах уже

происходит дифференцировка органов цветка, верхние еще не дифференцированы (Рисунок 3.12 R).

В соцветиях мутантной линии мы наблюдали развитие эктопических аксиальных меристем на месте флоральных меристем, которые дальше развивались как колосковые меристемы, формируя при дифференцировке органы колоска – колосковые чешуи и флоральные меристемы (Рисунок 3.12 M, N, P). На этой стадии развития колосковые чешуи первичного колоска останавливались в росте и оставались редуцированными, различить их можно было только на ранних стадиях развития соцветия мутантных линий (Рисунок 3.12 N, P, Q). Закладка органов эктопических колосков проходила под углом 90° к органам первичного колоска (Рисунок 3.12 P, Q, S). В одном первичном колоске могло формироваться множество эктопических вторичных колосков, которые, в свою очередь, давали начало эктопическим колоскам следующего порядка, развивающимся под углом 90° к колоскам предыдущего порядка. В результате этих событий наряду с осью колоска формировались оси следующего/следующих порядков (Рисунок 3.12 H, I, S). Не все эктопические колоски развивались полностью, расположенные в дистальной части колоска оставались редуцированными. В целом, число дополнительных колосков на уступе колоса могло достигать десяти. Существенного удлинения оси первичного колоска не происходило и сформированные эктопические колоски в зрелом колосе выглядели как кластер сверхчисленных сидячих колосков. Только при детальном анализе морфологии колоска линии NIL-mrs1, удаляя сверхчисленные колоски, можно обнаружить, что расположены они на оси первичного колоска (Рисунок 3.12 С, Н). Наряду с формированием ветвеподобной (branch-like) структуры в результате развития множества эктопических колосков мы также наблюдали несколько иной характер изменений в развитии – замещение нескольких флоральных меристем колосковыми в базальной части колоска и дифференцировки закладку органов цветка В результате меристем дистальной части колоска. В результате таких изменений формировались

колоски с измененной морфологией, содержащие эктопические колоски в базальной и цветки в проксимальной части.

Таким образом, изменения в развитии соцветия линии NIL-*mrs1* морфотипа MRS связаны с нарушениями идентичности меристем колоска при переходе к установлению идентичности флоральных меристем, которые сопровождаются сменой филлотаксиса, в результате чего наблюдается закладка эктопических меристем колоска на месте флоральных меристем под углом 90⁰ по отношению к колосковым меристемам первичного колоска. Изменения затрагивают вторичные аксиальные меристемы либо всего колоска, либо только его базальной части.

3.2.2. Развитие соцветий морфотипов HS (линии MC1611, Skle128) и GB (линия Ruc204)

Сравнивая развитие соцветия многоколосковой линии мягкой пшеницы MC 1611 и исходного сорта C29, мы обнаружили изменения развития, сходные с описанными выше (Рисунки 3.12 и 3.13). Первые различия также появлялись на ранней стадии дифференцировки вторичных аксиальных меристем (у дикого типа это флоральные меристемы) мутантных соцветий – вместо примордиев органов цветка, расположенных в базальной части колоска, наблюдалось появление примордиев первых органов колоска – колосковых чешуй, затем в дистальной части колоска проходила закладка органов цветка (Рисунок 3.13 Е-3). Колосковые чешуи первичного колоска и цветковые чешуи) также закладывались под углом 90⁰ к органам первичного колоска, как описано выше для линии NIL-*mrs1*.

Отличительной особенностью развития соцветия линии MC1611 по сравнению с NIL-*mrs1* являлось формирование единичных эктопических колосков в базальной части колоска.


Рисунок 3.13 – Особенности строения соцветия мутантной линии пшеницы MC1611. (А) Колос стандартного типа мягкой пшеницы сорта Саратовская 29 (С29), и (Б) колос с дополнительными колосками на уступах колосового стержня мутанта MC1611. Расположение дополнительных колосков на уступе колосового стержня, вид с (В) адаксиальной (внутренней) и (Г) абаксиальной (внешней) сторон; дополнительные колоски обозначены стрелками. Микрофотографии развивающихся соцветий (Д) С29 и (Е, З) мутанта MC1611. (Ж) Строение дополнительного колоска (сканирующая электронная микроскопия). МС – меристема соцветия, КС – колосковая меристема, ФМ – флоральная меристема,

ПОЦв – примордии органов цветка, ДК – дополнительные колоски (для наглядности один из дополнительных колосков выделен серым контуром), ЛМ – латеральная (аксиальная) меристема, ПКЧ – примордии колосковых чешуй, КЧ – колосковая чешуя, ЦЧ – цветковая чешуя (Добровольская и др., 2014б)

Как правило, только один-два первых цветка замещались эктопическими колосками, в то время как остальные развивались по стандартной для пшеницы схеме и давали начало цветкам (Рисунок 3.13 Ж). В результате на уступе колосового стержня формировался один (реже два) дополнительный колосок (Рисунок 3.13 А). Отличий в развитии и строении дополнительных колосков от нормальных колосков обнаружено не было (Рисунок 3.13 Ж).

Цветки линий NIL-*mrs1* и MC1611 развивались в соответствии со стандартной схемой, следовательно, идентичность цветковых меристем при формировании органов цветка нарушена не была. Таким образом, наблюдаемые изменения касались только определенных этапов развития соцветия, были связаны с нарушением идентичности колосковых меристем при установлении идентичности цветковых меристем.

Особенности развития соцветий линий Ruc204 и Skle128 (изучали с помощью светового микроскопа Альтами ПС0745) были сходными с описанными выше особенностями развития NIL-*mrs1* и также были связаны с нарушениями установления идентичности вторичных аксиальных меристем соцветия, в результате чего развивались эктопические колоски на месте цветков (Рисунок 3.14). Эктопические колоски развались под углом 90⁰ к колоскам предыдущего порядка.

Следует отметить, что нарушения в развитии соцветий морфотипов MRS, HS, GB и TTSW мягкой пшеницы были сходными. Наблюдаемые изменения происходили на одинаковых этапах развития соцветий и были связаны с нарушением идентичности колосковой меристемы при переходе к установлению идентичности вторичных аксиальных меристем либо всего колоска, либо его базальной части. Нарушение идентичности меристем

сопровождалось изменениями филлотаксиса. Последствием этих изменений было формирование колоса с дополнительными колосками, ось колоска могла быть удлиненной как у линии Ruc204 (морфотип GB), либо неудлиненной как у линий NIL-*mrs1* (морфотип MRS), MC1611 (морфотип HS), Skle128 (TTSW).



Рисунок 3.14 – Развивающиеся соцветия линий (а) Ruc204 и (б) Skle 128 на стадии дифференцировки колоска. Звездочками отмечены колосковые меристемы дополнительных колосков (Разработан автором)

В случае формирования укороченной колосковой оси в зрелом колосе сверхчисленные колоски выглядели сидячими. Число дополнительных колосков зависело от числа флоральных меристем, замещенных на эктопические колоски, и общего числа полностью развитых эктопических колосков, и варьировало от единичных дополнительных колосков на уступе (MC1611) до кластера, состоящего из 10 колосков (NIL-*mrs1*), на уступе или на оси удлиненного колоска (Ruc204).

3.2.3. Развитие соцветий морфотипа VSS (линии Ruc57 и Ruc62)

Наблюдая за развитием колоса с двойными колосками морфотипа VSS у линий Ruc57 и Ruc62, обнаружили, что изменения в его развитии связаны с закладкой и развитием дополнительных колосков, расположенных под первичными колосками (Рисунок 3.15). Ориентация органов дополнительных колосков и первичных колосков относительно оси колоса не отличалась.

Таким образом, изменения в развитии дополнительных колосков линий морфотипа VSS принципиально отличаются от описанных выше и не затрагивают развитие первичного колоска, при котором дополнительные колоски развиваются в составе (как часть) первичного колоска, в случае морфотипа VSS дополнительные колоски развиваются отдельно. Наряду с развитием дополнительных колосков, наблюдали развитие структур, напоминающих колосковые чешуи. Однако, по сравнению с нормальными колосковыми чешуями, они выглядели более утолщенными и узкими (Рисунок 3.15 В).



Рисунок 3.15 – SEM-анализ развивающегося соцветия линии Ruc62 морфотипа VSS (vertical sessile spikelets) на (А) ранней и (Б, В) поздней стадиях дифференцировки цветковых меристем. Развивающиеся дополнительные колоски (А, Б) отмечены красным цветом, дополнительная чешуевидная структура (В) выделена зеленым цветом. Обозначения как на Рисунке 3.12. Масштаб: 100 мкм

3.3. Анализ особенностей развития соцветия мутантной линии КТ 3–24 *T. monococcum* с ветвистым колосом

Проводили сравнительный анализ развития соцветий ветвистоколосой линии КТ 3-24 Т. monococcum и неветвистоколосого образца PI 418587 диплоидного вида пшеницы *T. sinskajae*. На ранних этапах развития соцветий линий КТ 3-24 и PI 418587 различий обнаружено не было: меристема соцветия давала начало колосковым меристемам, затем начиналась дифференцировка колосковых меристем (Рисунок 3.16 А, В), на периферии которых становились различимыми зачатки колосковых чешуй. На следующем этапе развития у линии PI 418587 происходила дифференцировка органов цветка – сначала цветковых чешуй, которые располагались параллельно колосковым, и затем закладывались остальные органы цветка – пестик, тычинки (Рисунок 3.16 С, F). У линии КТ 3-24 на аналогичном этапе развития колоска наблюдали развитие зачатков чешуй, но не параллельно колосковым чешуям, как у линии PI 418587, а под углом 90° (Рисунок 3.16 Е). Далее последовательно развивались органы цветка – цветковые чешуи и остальные органы.



Рисунок 3.16 – SEM-анализ развивающихся соцветий образца PI 418587 *T. sinskajae* (A, C, F) и линии КТ 3-24 *T. monococcum* (B, D, E, G) на стадии дифференцировки колосковых меристем (A, B), ранней (С–Е) и поздней (F, G) стадиях дифференцировки цветковых меристем. Обозначения как на Рисунке 3.12. Масштаб: 100 мкм (Dobrovolskaya et al., 2017)

Таким образом, вторичные аксиальные меристемы, которые у пшеницы в норме развиваются как цветковые, у мутанта развивались как колосковые, в результате чего формировался эктопический колосок на месте цветка. Зачатки колосковых чешуй первичного колоска были различимы только на начальных стадиях развития колоска (Рисунок 3.16 E, G).

Первичный колосок, содержащий эктопические цветки, представлял собой ветвеподобную структуру. Все зафиксированные нами изменения развития линии КТ 3-24 были идентичны изменениям, обнаруженным у многоколосковых линий мягкой пшеницы NIL-*mrs1*, Ruc204, Skle128 и сходны с изменениями MC1611.

3.4. Изучение особенностей развития соцветия многоколосковых линий тетраплоидных видов пшеницы

Развивающееся соцветие линии R-107 тетраплоидной пшеницы *T. durum* анализировали в сравнении с соцветием линии LD222 *T. durum* со стандартной морфологией колоса (Рисунок 3.17).

Все обнаруженные нами изменения были сходны с изменениями развития многоколосковых линий мягкой пшеницы (за исключением VSS-морфотипа) и мутанта КТ 3-24 диплоидной пшеницы вида *Т. monococcum*: развитие эктопических колосковых меристем на месте цветковых либо только в базальной части колоска (Рисунок 3.17 D, F), либо и в базальной, и в дистальной части колоска (Рисунок 3.17 H, I). Эктопические колоски также развивались под углом 90⁰ к колоскам предыдущего порядка. Колосковые чешуи первичного колоска были различимы только на начальных этапах развития колоска (Рисунок 3.17).



Рисунок 3.17 – SEM-анализ развивающихся соцветий линии LD222 *T. durum* со стандартным колосом (A, C, E), многоколосковой линии R-107 *T. durum* (B, D, F, H) и ветвистоколосого образца K-40750 *T. turgidum* (G, I) на стадии дифференцировки колосковых меристем (A, B), ранней (C–G) и поздней (H, I) стадиях дифференцировки цветковых меристем. Обведена ветвеподобная структура (b) на уступе колоска. Обозначения как на Рисунке 3.12. Масштаб: 100 мкм (Dobrovolskaya et al., 2017)

При изучении особенностей развития соцветия у ветвистоколосой линии К-40750 *T. turgidum* были зафиксированы аналогичные изменения (Рисунок 3.17). Наблюдали развитие множества эктопических колосков и формирование эктопических ветвеподобных структур. Обнаруженные изменения являются следствием нарушений идентичности колосковых меристем при установлении идентичности цветковых меристем, которые сопровождаются изменениями филлотаксиса.

3.5. Изучение особенностей развития соцветия многоколосковой линии морфотипа f-tR (ложно-истинное ветвление)

На ранних этапах развития соцветия лини РІ 67339 меристема соцветия давала начало колосковым меристемам, затем наблюдалась закладка органов колоска (колосковых чешуй) и закладка аксиальных меристем (AxM) второго порядка (Рисунок 3.18 С). На следующем этапе развития на периферии двух AxM второго порядка, расположенных в базальной части колоска, закладывались цветковые чешуи и органы цветка (Рисунок 3.18 D, E), то есть они функционировали как цветковые меристемы. Последующие AxM второго порядка развивались уже как колосковые и давали начало не цветкам, как это происходит в норме, а эктопическим колоскам, которые развивались на месте цветков в плоскости, расположенной под углом 90° к 3.18 После колоску (Рисунок **F**). закладки 3-го-5-го первичному эктопических колосков колосковая меристема давала начало органам терминального колоска (Рисунок 3.18 F, G). Терминальный эктопический колосок располагался под углом 90⁰ к остальным эктопическим колоскам.

Таким образом, первые две аксиальные меристемы второго порядка развивались в соответствии со стандартной схемой развития соцветия пшеницы и давали начало цветкам. Нарушения в развитии колоса линии PI 67339 начинались на стадии дифференцировки третьей и последующих вторичных аксиальных меристем колоска, в результате чего формировались не цветки, а эктопические колоски (Рисунок 3.18 А, В). Формирование эктопических колосков на месте 3го–5го цветков происходило по схеме, сходной с описанной выше для линий NIL-*mrs1*, когда вместо органов цветка на периферии вторичных аксиальных меристем формировались органы колоска – колосковые чешуи под углом 90⁰, и далее развивались остальные органы колоска. Колосок пшеницы в норме не детерминирован и формирование полностью развитого терминального эктопического колоска – особенность, которая отличает развитие линии PI 67339 и от линий пшеницы со стандартным строением колоса, и от описанных выше многоколосковых линий пшеницы.



Рисунок 3.18 – SEM-анализ развивающегося соцветия линии PI 67339. (А) Развивающийся колосок, отделенный от колосового стержня. Зеленым цветом отмечена часть колоска, развивающаяся по стандартной схеме (колосковые чешуи (gl) и нижние цветковые чешуи (l)), серым цветом выделены латеральные эктопические колоски, красным цветом – терминальный эктопический колосок. (В) Схематическое изображение колоска линии PI 67339. (С–G) Развивающееся соцветие PI 67339 (С, D) на ранней стадии дифференцировки цветковых меристем, (E–G) на поздней стадии дифференцировки цветковых меристем, еттіпаl spikelet) – эктопический терминальный колосок, tsm (terminal spikelet meristem) – меристема терминального колоска, остальные обозначения как на Рисунке 3.12. Обозначения органов терминального эктопического колоска отмечены "t" в верхнем индексе. Масштаб: 200 мкм (Dobrovolskaya et al., 2017)

На основании выявленных особенностей развития линии PI 67339 можно заключить, что изменения затрагивают установление идентичности вторичных аксиальных меристем, но не на начальной стадии развития колоска, как это происходило у линий морфотипов MRS/HS/GB, а на более поздних этапах его развития, когда закладываются и дифференцируются 3-я и последующие аксиальные меристемы второго порядка. Кроме того, происходит изменение характера развития колосковой меристемы, она становится детерминированной.

Таким образом, по результатам анализа развивающихся соцветий с использованием световой и сканирующей электронной микроскопии многоколосковые линии пшеницы можно разделить на три группы, в соответствии с наблюдаемыми изменениями в развитии соцветия:

Первая группа (I) включает в себя линии пшеницы следующих морфотипов:

1) MRS *T. aestivum* (детальный анализ с использованием методов микроскопии был проведен на одном представителе этих линий – NIL*mrs1*, но, учитывая общее происхождение (донор признака – форма Ra1) и общие морфологические характеристики колоса, можно обобщить полученные результаты и на остальных представителей группы);

- 2) HS/FRS (линия MC1611 T. aestivum и R-107 T. durum);
- 3) TTSW (Skle128 T. aestivum);
- 4) GB (Ruc124 *T. aestivum*, KT 3–24 *T. monococcum* и К-40750 *T. turgidum*).

Особенности развития соцветий представителей первой группы заключаются изменениях схемы развития колоска, связанных В С нарушением меристем при идентичности колосковых переходе к установлению идентичности флоральных меристем либо базальной части, либо всего колоска в целом, которые сопровождаются сменой филлотаксиса. Группа включает представителей видов пшеницы разного уровня плоидности – *T. monococcum* (AA), *T. turgidum* (BBAA), *T. durum* (BBAA) и *T. aestivum* (BBAADD).

Вторая группа (II)представлена морфотипом ложно-истинное ветвление (PI 67339 T. turgidum). В развитии колоса этого морфотипа также наблюдаются изменения, связаны с нарушением ОНИ установления дистальной идентичности цветковых меристем части колоска, сопровождающимися сменой филлотаксиса И изменением детерминированности колосковой меристемы.

У представителей третьей группы (III) – линий морфотипа VSS (линии Ruc57 и Ruc62) колосок развивается в соответствии со стандартной схемой развития, никаких изменений в его строении обнаружено не было. Дополнительные колоски формируются позднее первичных, расположены они на уступе ниже первичных колосков. Ориентация органов дополнительных колосков не отличается от ориентации органов первичных колосков.

3.6. Изучение ранних этапов развития колоса со спиральным расположением колосков линий мягкой пшеницы нестандартного морфотипа SCR

В норме у пшеницы колоски располагаются двумя параллельными рядами вдоль оси колоса, формируя двурядный колос. Линии нестандартного морфотипа SCR (screwed spike rachis) мягкой пшеницы характеризуются спиральным расположением колосков вдоль оси колосового стержня. Колосья растений линий Ruc 30-11 и Ruc 34-11, выращенных в условиях гидропонной теплицы, представляли SCR-морфотип, колоски располагались на колосовом стержне по спирали. Степень выраженности SCR-признака (скрученность колоса) у линий была не одинакова, у Ruc 34-11 – более

выражена. Колосья растений контрольной линии сорта Новосибирская 67 (Н67) имели стандартный для пшеницы морфотип (Рисунок 3.19).



Рисунок 3.19 – Колосья морфотипа SCR линий Ruc 34-11 (а), Ruc 30-11 (б) и стандартного типа линии сорта Новосибирская 67 (в) (Добровольская и др., 2017а)

Особенности развития соцветия линий мягкой пшеницы SCR были использованием сканирующей электронной изучены С И световой микроскопии. Анализ развивающегося соцветия SCR-линий показал, что на ранних этапах развития при закладке самых первичных аксиальных/колосковых меристем (КМ), они располагались поочерёдно каждая под углом 180⁰ по отношению к предыдущей и формировали два параллельных ряда (Рисунок 3.20).

Такой порядок развития латеральных меристем характерен для *T. aestivum*, видов пшеницы разного уровня плоидности и для представителей Pooidea, в целом (Shitsukawa et al., 2009; Kellogg et al., 2013). В отличие от пшеницы у видов со спиральным филлотаксисом соцветия, например, у риса каждая последующая латеральная меристема соцветия развивается под углом меньшим, чем 180° по отношению к предыдущей, в результате чего латеральные органы располагаются по спирали (Kellogg et al., 2013).



Рисунок 3.20 – Строение развивающего соцветия SCR-морфотипа линии Ruc 30-11 (сканирующая электронная микроскопия) на начальной стадии дифференцировки цветковых меристем (*a*), стадии дифференцировки терминального колоска (*б*, *в*). МС – меристема соцветия; КМ – колосковая меристема; ФМ – флоральная меристема; ПОЦв – примордии органов цветка; КЧ – колосковая чешуя; ЦЧ – цветковая чешуя; ТК – дифференцирующий терминальный колосок (Добровольская и др., 2017а)

У пшеницы на следующем этапе развития соцветия происходит дифференцировка КМ, на периферии КМ появляются зачатки органов колоска, колосковые чешуи (КЧ), далее закладываются цветковые меристемы (ЦМ). На следующем этапе развития начинается дифференцировка ЦМ. Колосок пшеницы развивается акропетально. После закладки колосковых меристем развитие соцветия SCR-линий проходило по стандартной схеме и не развития соцветий отличалось OT линии пшеницы сорта Новосибирская 67. Все этапы развития соцветия SCR-линий пшеницы, связанные с закладкой и последующей дифференцировкой меристемы соцветия, колосковых и цветковых меристем не несли изменений. Взаимное расположение колосков у SCR-линий на всех этапах морфогенеза соцветия,

начиная с закладки колосковых меристем и заканчивая превращением меристемы соцветия в меристему терминального колоска, не изменялось и соответствовало нормальному типу колоса у Новосибирской 67. Ранее было показано, что у растений со спиральным филлотаксисом соцветия, к которым относится большинство видов злаков, включая рис, сорго и др., спиральное расположение латеральных меристем соцветия становится заметным на ранних этапах развития соцветия, начиная с формирования самых нескольких первых латеральных меристем (Kellogg et al., 2013; Bartlett, Thompson, 2014). Известно, что идентичность меристем и филлотаксис тесно связаны между собой и часто смена идентичности меристем сопровождается изменением филлотаксиса (Bartlett, Thompson, 2014). Более того, показано, что у мутантов как однодольных, так и двудольных растений существенные нарушения развития меристем (и идентичности, и детерминированности) вызывают смену филлотаксиса. Примером могут служить мутанты lfy арабидопсис, у которых конверсия базальных цветков во вторичные генеративные побеги сопровождается сменой филлотаксиса (Weigel et al., 1992). У двойных мутантов кукурузы bde zag1 и ifa1 ids происходит превращение детерминированных цветковых или колосковых меристем в меристемы вторичных осей соцветия, что также сопровождается сменой филлотаксиса (Laudencia-Chingcuanco, Hake, 2002; Thompson et al., 2009). В нашем исследовании мы не обнаружили изменений идентичности и/или детерминированности меристем развивающихся соцветий SCR-линий.

Таким образом, морфологические особенности изучаемых SCR-линий не являются следствием изменений морфогенеза соцветия (нарушений идентичности, детерминированности меристем, изменения филлотаксиса), а связаны с особенностями роста клеток колосового стержня на более поздних этапах роста колоса. Данные изменения детерминированы генетически, как было показано ранее (Smoček, 1991) и подтверждено результатами настоящего исследования. Гибриды поколения F₁, полученные при скрещивании линии Ruc 34-11 (SCR) и H67, имели колос морфотипа SCR, а в поколении F₂ наблюдали расщепление: 110 растений со спиральным колосом к 42 растениям с колосом стандартного типа, что соответствовало расщеплению 3:1 ($\chi^2 = 0.010$, P > 0.9). Следовательно, SCR наследуется, как доминантный моногенный признак. На степень проявления SCR-фенотипа влияют факторы окружающей среды (Smoček, 1991) и генотипическая среда, как было обнаружено в настоящем исследовании. Так, линии пшеницы Ruc 30-11 и Ruc 34-11, у которых ген *Scr1*, полученный от одного и того же донора признака SCR, функционирует в различной генотипической среде, различаются степенью выраженности SCR-признака.

3.7. Обсуждение и заключение к Главе 3

Обобщая полученные результаты, следует отметить следующие закономерности. Обнаруженные нами изменения развития многоколосковых линий не касались меристемы соцветия, которая у всех линий развивалась по стандартному для пшеницы пути (Bonnet, 1936; Shitsukawa at al., 2009), а также цветковых меристем, инициировавших органы цветка как у соцветий дикого типа (Bonnet, 1936; Shitsukawa at al., 2009). Аномалии в развитии касались только колосковых меристем и привели к формированию соцветий с измененной морфологией – различным многоколосковым фенотипам колоса (Добровольская и др., 2014б, Dobrovolskaya et al., 2015, 2017а).

Группа I. Линии, принадлежащие различным морфотипам (MRS, HS, GB, TTSW) группы I, имеют сходные особенности развития, связанные с нарушением функционирования колосковых меристем соцветия, которые проявляются на одинаковых стадиях и затрагивают одни и те же процессы развития (переход к установлению идентичности цветковых меристем). Различия в развитии соцветия между представителями морфотипов группы I (внутри группы) носят количественный характер и связаны с разным числом

цветковых меристем, замещенных на эктопические колосовые меристемы, и неодинаковой степенью удлинения оси колоска. Это приводит к с формированию разного числа дополнительных колосков на уступах в первом случае и развитию ветвеподобных структур на уступах во втором случае. Развитие всех эктопических колосков морфотипов группы I идет с филлотаксиса, изменением вследствие чего сверхчисленные колоски морфотипов MRS, HS, GB, TTSW этой группы всегда расположены под углом к первичному колоску. Следует отметить, что изменения в развитии соцветия линий происходят после установления идентичности колосковых (колосковые меристем, так как первые органы колоска чешуи) закладываются нормально, но дальше происходит нарушение схемы развития и вместо органов цветка развиваются эктопические колоски. Следовательно, кластеры сидячих сверхчисленных колосков, И «веточки» И co сверхчисленными колосками на одном уступе колосового стержня группы I являются видоизмененными колосками.

Описанные нами изменения в развитии соцветия (Добровольская и др., 2014б, Dobrovolskaya et al., 2015) сходны с обнаруженными ранее особенностями развития соцветий мутантов *fzp* риса (Komatsu et al., 2003a), *bd1* кукурузы (Chuck et al., 2002), *mos1 B. distachyon* (Derbyshire, Byrne, 2013). Несмотря на разные типы соцветий у мутантов риса, кукурузы, *B. distachyon* и изучаемых нами линий (метелка, початок, колос), прослеживаются общие закономерности в развитии их соцветий, связанные с нарушениями установления идентичности цветковых меристем, на месте которых развиваются эктопические колоски, в результате чего формируются чрезвычайно разветвленные метелки (Chuck et al., 2002; Komatsu et al., 2003а) или эктопические «веточки» в колосе или початке (Chuck et al., 2002; Derbyshire, Byrne, 2013; Dobrovolskaya et al., 2015, 2017). Для мутантов риса характерны повторные циклы ветвления и формирование эктопических ветвеподобных структур вместо цветков следующих порядков; соцветия мутантов fzp, как правило, стерильны (Komatsu et al., 2003a). Развитие эктопических колосковых меристем мутантов fzp, bd1 и mos1 и описанных нами представителей группы I сопровождается сменой филлотаксиса. Ранее было показано, что смена филлотаксиса сопровождает изменение идентичности и/или детерминированности меристем (Bartlett, Thompson, 2014) и нарушениям в установлении идентичности меристем могут сопутствовать изменения филлотаксиса (Weigel et al., 1992; Laudencia-Chingcuanco, Hake, 2002; Thompson et al., 2009).

Общие черты в фенотипических проявлениях признаков и сходство обнаруженных нами изменений в развитии колоса линий многоколосковых линий гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* (Добровольская и др., 20146; Dobrovolskaya et al., 2015), диплоидной пшеницы *T. monococcum* и тетраплоидных видов пшеницы *T. durum* и *T. turgidum* (Dobrovolskaya et al., 2017) могут быть следствием мутаций в гомеологичных генах и отражать генетическое родство и общее происхождение геномов A, B и D видов пшеницы разного уровня плоидности.

Группа II. Изменения развития многоколосковой линия PI 67339 *T. turgidum* (морфотип «ложно-истинное ветвление» колоса) существенно отличаются от изменений группы I. Нарушения в схеме развития соцветия PI 67339 наступают позднее, чем у линий группы I и мутантов злаков fzp/bd1/mos1, и первые два цветка в базальной части колоска развиваются по стандартной схеме. Развитие последующих цветков нарушено и происходит сходным с группой I образом: эктопические колоски развиваются на месте цветков, их развитие сопровождается сменой филлотаксиса (Dobrovolskaya et al., 2017). К особенностям развития этого морфотипа следует отнести формирование эктопического терминального колоска, что не характерно для представителей описанной нами группы I. Мутанты других видов злаков с подобными изменениями в развитии в литературе описаны не были.

Группа III. В отличие от первых двух групп, развитие дополнительных колосков морфотипа VSS происходит вне первичного колоска. Дополнительный колосок развивается позднее первичного, расположен ниже

на уступе колосового стержня и его формирование не сопровождается сменой филлотаксиса и, таким образом, не связано с изменением идентичности/детерминированности колосковой меристемы.

Выявленные изменения морфогенеза соцветий линий всех трех групп (I-III) происходят на пятом этапе органогенеза (Куперман, 1968). Однако выделенные нами группы линий с нарушениями морфогенеза позволяют более детально охарактеризовать отдельные стадии развития соцветия во время прохождения этого этапа.

SCR-морфотип. Результаты изучения линий с SCR-морфотипом колоса позволяют сделать следующие выводы:

1) Спиральное расположение колосков у линий SCR не связано с изменениями/нарушениями на ранних этапах развития соцветия (когда происходит закладка и дифференцировка органов соцветия), а является следствием особенностей роста клеток колосового стержня на более поздних этапах роста колоса, когда дифференцировка всех органов соцветия полностью завершена (Добровольская и др., 2017а). Следовательно, спиральное расположение колосков в соцветии злаков может быть обусловлено не только особенностями расположения колосковых меристем соцветия относительно оси соцветия (типом филлотаксиса соцветия), но особенностями роста клеток;

2) SCR наследуется как доминантный моногенный признак (Добровольская и др., 2017а).

Таким образом, гетерогенная группа многоколосковых линий, отнесенных к разным морфологическим типам по результатам визуальной оценки фенотипов колоса, была разделена на три основных группы после детальных исследований особенностей развития соцветий с применением методов световой и электронной микроскопии. Каждая группа включает морфогенеза. линии С ОДНОТИПНЫМИ нарушениями Выявленные неодинаковые изменения в развитии соцветий представителей групп I, II и III многоколосковых линий, а также линий со спиральным расположением колосков морфотипа SCR предполагают различные нарушения генетической регуляции программ развития их соцветий. Охарактеризованные линии являются моделями для дальнейшего изучения генетической регуляции морфогенеза соцветия пшеницы.

Глава 4. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ МНОГОКОЛОСКОВЫХ ФЕНОТИПОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ *T. aestivum* L. И РЖИ ПОСЕВНОЙ *S. cereale* L.

Для выявления генов, регулирующих развитие соцветий с измененной морфологией, связанной с формированием дополнительных колосков на уступах колосового стержня и установления их точной локализации на картах хромосом применяли методы классической генетики и современные подходы анализа генома растений, включая молекулярно-генетическое картирование. Построение карт хромосом выполнялось с использованием микросателлитных или SSR (simple sequence repeats) маркеров пшеницы, которые отличаются высоким уровнем выявляемого внутривидового полиморфизма (Röder et al., 1998; Ganal, Röder, 2007). Для сравнительного картирования использовали COS (Conserved Ortholog Set) – SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) маркеры пшеницы (Quraishi et al., 2009), которые характеризует высокая консервативность в геномах злаков. При построении консенсусных карт хромосом пшеницы использовали информацию о положении на картах хромосом SSR и RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) маркеров (http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSRclub/GeneticPhysical).

4.1. Молекулярно-генетическое картирование гена *mrs1*, детерминирующего признак MRS

Ранее было показано, что признак MRS (multirow spike, многорядный колос) находится под моногенным рецессивным контролем (Martinek, 1998). Результаты, выполненного нами генетического анализа на популяциях гибридов F₁ и F₂ от скрещиваний Ruc163 x So149 (популяция I) и Ruc167 x So149 (популяция II), где Ruc163 и Ruc167 – линии морфотипа MRS (донор

признака –Ra1), а So149 – линия со стандартным фенотипом колоса (Рисунок 4.1, Таблица 4.1), подтвердили данные, полученные Martinek и Bednar (2001).



Рисунок 4.1 – Колосья линий мягкой пшеницы So149 (слева), Ruc163 (в центре) и Ruc167 (справа) (Разработан автором)

Колосья гибридов F_1 были стандартного типа, а в популяциях F_2 наблюдалось расщепление на растения со стандартным колосом и MRS-типом в соотношениях, соответствующих ожидаемому расщеплению 3 (стандартный колос) к 1 (MRS) (Таблица 4.1). Растения родителей и гибридов выращивали в условиях теплицы. Признак MRS учитывался как наличие/отсутствие дополнительных колосков на уступах колосового стержня, степень выраженности признака (число уступов с дополнительными колосками и число дополнительных колосков на уступе) не принималась во внимание.

Для определения хромосомной локализации гена был проведен модифицированный сегрегационный балк-анализ (далее модифицированный балк-анализ) с использованием SSR-маркеров. Методика проведения балк-анализа была разработана нами для решения задач молекулярно-

генетического картирования в случаях, когда информация о локализации изучаемого гена отсутствует или оказалась ошибочной.

Таблица 4.1 – Расщепление по типам колоса в популяциях F₂ (Разработана автором)

Скрещи- вание	Общее число	Наблюдаемое расщепление		Теоретическое расщепление		γ^2	Р
	растений	Ν	SS	Ν	SS	<i>N</i>	
Ruc167 x So149	106	80	26	79.5	26.5	0.013	> 0.90
Ruc163 x So149	100	78	22	75	25	0.48	> 0.25

Примечание: N – колос стандартного фенотипа, SS – колос со сверхчисленными колосками

Модифицированный балк-анализ был апробирован нами при проведении молекулярно-генетического картировании генов, определяющих пурпурную окраску перикарпа (Dobrovolskaya et al., 2006) и опушения листа мягкой пшеницы (Dobrovolskaya et al., 2007). Метод заключается в проведении генотипирования на части картирующей популяции, при этом ДНК растений не собирается индивидуальных В пулы, представляющие контрастные фенотипы, как это происходит при проведении сегрегационного балк-анализа по стандартной схеме, а анализируется отдельно. Основную часть анализируемых растений представляют рецессивные фенотипы. Для анализа используются молекулярно-генетические маркеры, выявляющие полиморфизм между родителями картирующих популяций и расположенные на молекулярно-генетических картах хромосом с покрытием каждых 15 - 20 cM.

В настоящем исследовании для выявления полиморфных SSR маркеров было использовано 21, 26, 28 и 25 SSR-маркеров (*GDM* и *GWM*) хромосом пшеницы 2A, 2B, 2D и 4A, соответственно (Röder et al., 1998; Pestsova et al.,

2000). 12 (2А), 19 (2В), 19 (2D), 20 (4А) полиморфных маркеров для картирующей популяции I и 13 (2А), 20 (2В), 19 (2D), 21 (4А) для популяции II были использованы для проведения модифицированного балк-анализа. Было обнаружено генетическое сцепление между *Mrs*-локусом и двенадцатью (популяция I)/одиннадцатью (популяция II) SSR-маркерами хромосомы 2D. Далее дополнительный набор из 18 маркеров хромосомы 2D (Guyomarc'h et al., 2002; Somers et al., 2004; Yu et al., 2004; Zhang et al., 2005, Zhang, 2006) был протестирован на полиморфизм на образцах ДНК родителей картирующих популяции. Все полиморфные маркеры, включая выявленные при проведении модифицированного балк-анализа, были применены для генотипирования растений картирующей популяции F_2 . В результате были сконструированы две молекулярно-генетических карты хромосомы 2D (Pucyнok 4.2).

Порядок взаимного расположения SSR маркеров и генетические расстояния между маркерами на картах хромосом 2D соответствовали опубликованным ранее (Röder et al., 1998), что свидетельствует о том, что хромосомы 2D родителей не несут крупные хромосомные перестройки – инверсии и транслокации. Отсутствие блоков тесно сцепленных SSR маркеров с нуль-аллелями свидетельствовало о том, что крупные делеции хромосом 2D также отсутствуют. Поскольку MRS находится под моногенным рецессивным контролем, мутантный аллель был обозначен *mrs1*, а аллель дикого типа – *Mrs1*.

Обнаружено, что генетический локус *Mrs1* расположен в коротком плече хромосомы 2D, тесно сцеплен с SSR-маркерами *Xgwm988* (популяции I и II) и *Xgwm484* (популяция II) и ко-сегрегирует с *Xwmc453* (популяции I и II) в обеих популяциях (Рисунок 4.2).

131



Рисунок 4.2 – Молекулярно-генетические карты хромосом 2D, содержащие *mrs1*. Генетические расстояния в сМ приведены слева от карт. S – короткое плечо; L – длинное плечо; I – картирующая популяция F₂ Ruc163 x So149; II – картирующая популяция F₂ Ruc167 x So149 (Dobrovolskaya et al., 2009)

Далее была проведена локализация *Mrs1* в делеционном бине хромосомы 2D (делеционные бины – участки хромосомы, ограниченные точками разрыва делеций) при помощи генотипирования делеционных линий 2DS-1, 2DS-3, 2DS-4 и 2DS-5 сорта пшеницы Чайниз Спринг фланкирующими ген маркерами – *Xgwm484* и *Xgwm988* и последующей их локализации в делеционных бинах (Рисунок 4.3). Обнаружено, что *Mrs1* локализован в

делеционном бине 2DS-5 (FL 0.47–1.0), занимающем 53% дистального района короткого плеча хромосомы 2DS (Dobrovolskaya et al., 2009).



Рисунок 4.3 – (а) Физическая делеционная карта хромосомы 2DS. (б) Схематическое изображение делеционных линий мягкой пшеницы, полученных на основе сорта Чайниз Спринг. Стрелки обозначают точки разрывов делеций. Прямоугольники черного цвета обозначают расположение С-бэндов (Gill et al., 1991). Обозначение делеционного бина 2DS-5 – справа от физической делеционной карты, локализованные в нем маркеры – слева (Dobrovolskaya et al., 2009)

На основе двух сконструированных карт хромосом 2D (Рисунок 4.2), референсной молекулярно-генетической карты 2D (http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSRclub/GeneticPhysical) и опубликованной ранее карты хромосомы 2D (Ganal, Röder, 2007) была сконструирована частичная консенсусная карта хромосомы 2D, содержащая генетический локус *Mrs1*, SSR и RFLP маркеры (Рисунок 4.4). Учитывая то, что RFLPлокусы *Xcdo1379, Xbcd262, Xfbb279* и *Xcdo405*, фланкирующие *Mrs1*, были ранее отнесены к богатому генами району 2S0.8 (Erayman et al., 2004), мы заключили, что *Mrs1* также принадлежит к району 2S0.8, занимающему сегмент физической карты протяженностью 7 млн. п.н. с частотой рекомбинации 215 000 п.н./сМ (Erayman et al., 2004; Dobrovolskaya et al., 2009).



Рисунок 4.4 – (а) Физическая консенсусная карта коротких плеч хромосом гомеологичной группы 2 с обозначением локализации обогащенных генами районов (Erayman et al., 2004). (б) Частичная консенсусная генетическая карта хромосомы 2D, включающая ген *mrs1* (выделен прямоугольником). RFLP-локусы подчеркнуты, общие локусы соединены пунктирными прямыми линиями (Dobrovolskaya et al., 2009)

Учитывая хромосомную локализацию гена *mrs1*, детерминирующего признак MRS, в хромосоме 2DS, почти изогенная линия NIL-*mrs1* мягкой пшеницы морфотипа MRS, донор признака MRS (KM240) и рекуррентный родитель H67 были генотипированы с использованием SSR маркеров хромосомы 2D (Рисунок 4.5). Это позволило определить итрогрессированный сегмент хромосомы почти изогенной линии, несущий маркирующий ген –

mrs1: *Хgwm815 – Хgwm515* (на генетической карте занимает 17 сМ). Локализация изучаемого гена на генетической карте и в составе сегмента интрогрессии (Рисунки 4.2 и 4.5) совпадает, что подтверждает результаты молекулярно-генетического картирования (Dobrovolskaya et al., 2009, 2015).



Рисунок 4.5 – (а) Схематическое изображение хромосомы 2D почти изогенной линии NIL-*mrs1*, несущей маркирующий ген *mrs1*. (б) Частичная консенсусная карта хромосомы 2DS. Общие локусы соединены пунктирными линиями. Прямоугольники зеленого и красного цветов обозначают сегменты хромосом рекуррентного родителя (H67) и донора MRS (линии KM240), соответственно. С – центромера (Dobrovolskaya et al., 2015)

Наряду с родителями картирующих популяций (Ruc163, Ruc167) и почти изогенной линией NIL-mrs1, девять линий мягкой пшеницы морфотипа MRS (V3-79-08, V3-82-08, V3-83-08, V3-84-08, V3-85-08, V3-86-08, V3-87-08, V3-88-08 и V3-89-08) были генотипированы с применением SSR-маркеров, фланкирующих mrs1 (Xgwm484 и Xgwm988), и ко-сегрегирующего с mrs1 маркера – Хwmc453. Было обнаружено, что, в то время как фланкирующие изучаемый ген маркеры были представлены у MRS-линий различными аллелями, все изучаемые MRS-линии несли одинаковый аллель 194-п.н. косегрегирующего микросателлитного локуса *Хwmc453*. У линий пшеницы со стандартным фенотипом колоса встречались разные аллели (представленные фрагментами различной длины) всех трех микросателлитных локусов (Рисунок 4.6, Таблица 4.2). Полученные результаты показали, что, несмотря на различия генотипической среды, все изучаемые MRS-линии несут ген mrs1, детерминирующий MRS-фенотип, в одинаковом генетическом контексте (аллель 194-п.н. локуса *Xwmc453*). Это подтверждает единое происхождение признака MRS под контролем гена *mrs1* у изучаемых линий.

Аллель 194-п.н. – *Хwmc453* может служить диагностическим маркером признака MRS, находящегося под контролем рецессивного аллеля гена *Mrs1* (Dobrovolskaya et al., 2008).

Таким образом, мы впервые показали, что признак MRS находится под контролем рецессивного аллеля гена mrs1, локализованного на молекулярногенетической карте хромосомы 2DS, тесно сцепленного с маркерами Xgwm484и Xgwm988 и ко-сегрегирующего с маркером Xwmc453. Локализация фланкирующих Mrs1 маркеров в делеционном бине 2DS-5 (FL 0.47–1.0) ограничила расположение изучаемого гена дистальной частью (1/2) короткого плеча хромосомы 2D в составе богатого генами района 2S0.8 (Добровольская, 2011; Dobrovolskaya et al., 2008, 2009).



Рисунок 4.6 – Результаты фрагментного анализа (ALF-express Amersham-Biosciences), полученные в результате разделения продуктов ПЦР амплификации маркера *Хwmc453* на образцах ДНК одинадцати линий морфотипа MRS (1–11) и линий/сортов пшеницы со стандртным фенотипом колоса (12–16). Фрагменты, соответствующие локусу *Хwmc453-2D*, обозначены стрелками. 194-п.н.-аллель локуса *Хwmc453* MRS-линий выделен прямоугольником (Dobrovolskaya et al., 2008)

Таблица 4.2 – Аллели микросателлитных локусов, тесно сцепленных с геном *mrs1*, линий морфотипа MRS, многоколосковой линии 1611 и сортов пшеницы со стандартным фенотипом колоса (Разработана автором)

Линия	Аллель микросателлитного локуса					
	(длина фрагмента амплификации в п.н.)					
	Xgwm988	Xwmc453	Xgwm484			
V3-79-08	187	194	157			
V3-82-08	187	194	165			
V3-83-08	187	194	157			
V3-84-08	187 194		157			
V3-85-08	187	194	157			
V3-86-08	157	194	165			
V3-87-08	187	194	157			
V3-88-08	187	194	157			
V3-89-08	187	194	165			
Ruc163	157	194	165			
Ruc167	187	194	157			
NIL-mrs1	187	194	155			
So149	184	200	157			
Саратовская 29	146	205	165			
Новосибирская 67	163	190	167			
Скала	167	190	163			
Линия 1611	146	205	165			

Примечание: Диагностический аллель 194-п.н. локуса *Хwmc453* выделен жирным шрифтом

4.2. Влияние перестроек хромосомы 2D на фенотип колоса мягкой пшеницы

Наряду с многоколосковыми линиями морфотипа MRS, имеющими общее происхождение (Ra1), мы протестировали на наличие диагностического маркера признака MRS (Xwmc453-194 п.н.) генетически независимые многоколосковые линии MC1611, Ruc204, Skle128, So164, представлявшие отличные от MRS морфотипы (детальная характеристика фенотипов колоса линий представлена в Главе 3). Было обнаружено, что у трех линий – Ruc204, So164, Skle128 микросателлитный локус Xwmc453 хромосомы 2D не амплифицировался, то есть был представлен нуль-аллелем, а у линии MC1611 был представлен аллелем, отличным от диагностического – 205 п.н. (Таблица 4.2). Отсутствие амплификации может быть следствием делеции района хромосомы, несущий микросателлитный локус, или ДНК-полиморфизма в районах отжига праймеров. Наличие нуль-аллелей локуса *Xwmc453-2D* у изучаемых нами линий могло быть связано как с ДНК-полиморфизмом, так и с делециями. Для дальнейшего изучения многоколосковых линий пшеницы были применены методы кариотипирования в сочетании с микросателлитным анализом.

Кариотипирование хромосом многоколосковых линий MC1611, Ruc204, Skle128, Ruc130 и So164 было выполнено с использованием методов С - дифференциального окрашивания в сотрудничестве с д.б.н. Е.Д. Бадаевой (Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва) и гибридизации FISH *in situ* в сотрудничестве с к.б.н. И.Г. Адониной (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) по опубликованным ранее методикам (Badaeva et al., 1994, 2007; Salina et al., 2006).

Кариотипирование хромосом мутантной линии MC1611 с использованием метода С-дифференциального окрашивания и гибридизации *in situ* с пробами pSc119.2 и pAs1 обнаружило, что изучаемая линия имеет 42-х хромосомный набор; хромосомные перестройки выявлены не были

(Рисунок 4.7). Полученные результаты показали, что мутантный фенотип линии MC1611 не связан с крупными хромосомными перестройками или анеуплоидией (Добровольская и др., 2014б).





Рисунок 4.7 – (А) Кариотип мутантной линии мягкой пшеницы MC1611 (Сдифференциальное окрашивание хромосом выполнено д.б.н. Е.Д. Бадаевой). 1–7 – гомеологичные группы. А, В и D – геномы пшеницы. (Б, В) FISH на метафазных хромосомах линии MC1611 с зондами (Б) pSc119.2 и (В) pAs1 (FISH-анализ выполнен к.б.н. И.Г. Адониной) (Добровольская и др., 2014б)

Кариотипирование хромосом линий So164, Skle128, Ruc204, выполненное с использованием метода С-дифференциального окрашивания и гибридизации *in situ* с пробами pSc119.2 и pAs1, показало, что изучаемые линии имеют 42-х хромосомный набор, у всех трех линий были обнаружены

хромосомные перестройки, затрагивающие хромосому 2D (Добровольская и др., 2014а; Dobrovolskaya et al., 2015). У линии So164 обнаружено замещение пары хромосом 2D гомеологичной парой хромосом 2A (Рисунок 4.8), таким образом, линия So164 является замещенной – N2DT2A.



Рисунок 4.8 – Кариотип мутантной линии мягкой пшеницы So164 (Сдифференциальное окрашивание хромосом выполнено д.б.н. Е.Д. Бадаевой) 1–7 – гомеологичные группы. А, В и D – геномы пшеницы (Dobrovolskaya et al., 2015)

Линии Skle128 и Ruc204 имели 42-х хромосомный набор, но короткие плечи хромосом 2D этих линий были укорочены: у линии Skle128 отсутствовал терминальный бэнд, хромосома была укорочена на ~50%, а у линии Ruc204 терминальный бэнд присутствовал, но хромосома была укорочена на ~10%, что указывает на наличие терминальной и интерстициальной делеций короткого плеча хромосом 2D у линий Skle128 и Ruc204, соответственно (Рисунки 4.9–4.11).

Для уточнения результатов кариотипирования и определения точек разрыва делеций был применен микросателлитный анализ с использованием маркеров, локализованных ранее на молекулярно-генетической карте хромосомы 2D (http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSRclub/GeneticPhysical/).



Рисунок 4.9 – Схематические изображения хромосом 2D с обозначением точек разрыва делеций (слева) и кариотипы линий Skle128 (а) и Ruc204 (b) (справа). Отсутствующие SSR маркеры обозначены серым цветом. Остальные обозначения как на рисунках 4.7-4.8. С-дифференциальное окрашивание хромосом выполнено д.б.н. Е.Д. Бадаевой (Dobrovolskaya et al., 2015)

В результате проведенного анализа было обнаружено, что у линии Skle128 все маркеры хромосомы 2DS, расположенные на генетической карте дистальнее *Xgwm515*, отсутствуют, что подтвердило результаты кариотипирования. Линия Skle128 несет терминальную делецию короткого плеча хромосомы 2D с точкой разрыва между микросателлитными локусами *Xgwm515* и *Xgwm988*.

У линии Ruc204 наблюдается делеция микросателлитных маркеров, расположенных на генетической карте между Xgwm484 и Xgpw2203, что 9 соответствует генетическому расстоянию cM (http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSRclub/GeneticPhysical/) (Рисунок 4.9). Таким образом, хромосома 2D линии Ruc204 несет интерстициальную делецию с точками разрыва между микросателлитными локусами Xgwm484 *— Хwmc453* в дистальной части и *Хgpw4307 – Хgpw2203* в проксимальной части (Рисунок 4.9). Хромосомные перестройки в других хромосомах данных линий обнаружены не были.

Кариотип линии Skle130 был установлен с использованием гибридизации *in situ* с пробами pSc119.2 и pAs1 (Рисунок 4.10). Показано, что изучаемая линия имеет 42-х хромосомный набор, аберрации хромосом 2-й гомеологичной группы выявлены не были; обнаружена транслокация между хромосомами 7В и 5В, сопровождающаяся переносом фрагмента длинного плеча хромосомы 5В на длинное плечо хромосомы 7В (Рисунок 4.4).

Полученные нами данные согласуются с результатами ранних исследований (Swaminathan et al., 1966; Košner, Foltýn, 1989), показавших наличие хромосомных перестроек (делеций) у линий пшеницы с дополнительными колосками. Использование методов кариотипирования в сочетании с микросателлитным анализом позволило установить, что делеции затрагивают короткое плечо хромосомы 2D.



Рисунок 4.10 – FISH на метафазных хромосомах линий Skle128 (а, б), Ruc204 (в, г), So164 (д, е), Skle130 (ж, з) с зондами pSc119.2 (левый ряд изображений) и pAs1 (правый ряд изображений). FISH-анализ выполнен к.б.н. И.Г. Адониной (Добровольская и др., 2014а)
Важно отметить, что хромосома 2DS несет ген Mrs1, мутации которого вызывают формирование множественных колосков на уступах колосового стержня линий морфотипа MRS (Dobrovolskaya et al., 2009, 2015). Ген mrs1 колокализуется на молекулярно-генетической карте с SSR-маркером Xwmc453, который попадает в область терминальной делеции хромосомы 2DS линии Skle128 и интерстициальной делеции 2DS линии Ruc204. Следует отметить, что линия Skle128 и линии морфотипа MRS имеют сходный фенотип колоса, различия связаны с числом дополнительных колосков (у Skle128 в основном развивается по три колоска на уступе, а у mrs1-мутантов – множество колосков) и с длиной колоса (Skle128 имеет укороченный колос длиной 5,5 см). Фенотипы линии Ruc204 и mrs1-мутантов также сходны. Мутантный фенотип генетически независимого многоколоскового мутанта MC1611 также детерминирован рецессивной мутацией гена, локализованного в хромосоме 2D (Лайкова и др., 2005; Добровольская и др., 2014б; Dobrovolskaya et al., 2015). Более того, с использованием методов микроскопии было показано, что линии Skle128, Ruc204, So164, MC1611 и NIL-mrs1 характеризуются сходными особенностями развития соцветия и были отнесены к группе линий с однотипными нарушениями морфогенеза соцветия – группа I (Глава 3). Таким образом, мутации гена (генов), локализованных в хромосоме 2DS, области хромосомы 2DS, интерстициальную делеции включая И терминальные делеции и, наконец, отсутствие хромосомы 2D может приводить к изменениям морфологии колоса, связанным с формированием дополнительных колосков на уступах.

По результатам наших исследований делеции короткого плеча 2DS и отсутствие хромосомы 2D могут приводить к изменению фенотипа колоса и развитию дополнительных колосков. У сорта Чайниз Спринг отсутствие хромосомы 2D имело сходный, но гораздо менее выраженный эффект и приводило к развитию дополнительного колоска на одном или нескольких уступах (Sears, 1954).

Для того чтобы определить, оказывают ли влияние на морфологию колоса делеции короткого плеча хромосомы 2D и других хромосом 2-й гомеологичной группы хромосом сорта Чайниз Спринг, мы проанализировали фенотипы колоса делеционных линий с терминальными делециями 2-й гомеологичной группы хромосом. Колосья делеционных линий Чайниз Спринг с крупными терминальными делециями 2DS-4 и 2DS-5 были укорочены до 4.8-5.5 см и имели полукомпактоидный булавовидный тип, на уступах развивалось по одному колоску (Рисунок 4.11).



Рисунок 4.11 – (а) Схематическое изображение хромосом 2D с обозначением Сбэндов (Gill et al., 1991) и фотографические изображения колосьев (в нижней части рисунка) сорта мягкой пшеницы Чайниз Спринг, делеционных линий 2DS-5 и 2DS-4, многоколосковых линий Skle128 и Ruc204. Справа от изображений хромосом линий Skle128 и Ruc204 показаны генетические карты хромосом 2D (серым цветом обозначены делеции микросателлитных маркеров). Порядок расположения

маркеров соответствует порядку, известному из литературы (http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSRclub/GeneticPhysical/). (б) Сравнение длин хромосом 2D линий Skle128 и Ruc204 и контрольной линии мягкой пшеницы (сорт Pitic). Дифференциальное С-окрашивание хромосом выполнено д.б.н. Е.Д. Бадаевой (Добровольская и др., 2014а)

Изучаемая нами линия Skle-128 с крупной терминальной делецией 2DS также имеет укороченный колос. Известно, что компактоидный тип колоса у 28-хромосомных тетра-форм мягкой пшеницы, у которых полностью отсутствует геном D, находится под контролем двух рецессивных взаимодействующих генов, но проявляется этот признак в отсутствие хромосом генома D. Так, колос сорта Thatcher имеет стандартный тип, а колос его тетра-формы, tetraThatcher, – компактоидный тип (Гончаров, 2012). Автор предположил, что у гексаплоидной мягкой пшеницы имеются рецессивный ген(ы), детерминирующий(е) компактоидный тип колоса, но их проявление супрессируется геном или генами генома D. Вероятно, у линии Skle128 и сорта Чайниз Спринг также имеются рецессивные гены, обуславливающие компактоидный тип колоса, которые проявляются в отсутствие ~ 50% терминального района хромосомы 2DS. Влияние других делеций хромосом 2-й гомеологичной группы на компактность колоса нами обнаружено не было. Колосья с «редупликацией колосков» у линий с терминальными делециями хромосомы 2D обнаружены не были. Фенотип линий с делециями короткого плеча хромосомы 2А, которые поддерживаются только В гетерозиготном состоянии, не оценивался.

одной «Редупликация колосков» была обнаружена только V делеционной линии, 2BS-7, при этом двойные колоски развивались не во всех колосьях. Дополнительные колоски на уступах располагались под нормальным, что соответствует описанию Sears (1954) и сходно с морфотипом VSS (vertical sessile spikelets) в наших исследованиях. При изучении особенностей развития многоколосковых линий пшеницы NIL-mrs1, Ruc204, Skle128 и So164, отнесенных нами к одной группе (группа I) линий с нарушениями морфогенеза (Глава 3), мы обнаружили, что вторичные аксиальные меристемы, дающие начало дополнительным колоскам, развиваются в плоскостях перпендикулярных плоскости первичного колоска дикого типа на месте цветковых меристем, в результате чего дополнительные колоски этих линий расположены под углом к первичным колоскам (Добровольская и др., 20146; Dobrovolskaya et al., 2015). Возможно, к развитию дополнительных колосков двух типов, характерных для 1) нуллисомных линий сорта Чайниз Спринг (Sears, 1954), линий Чайниз Спринг с делецией 2BS-7 и 2) линий группы многоколосковых морфотипов I, приводят разные изменения морфогенеза соцветия. Эти изменения могут быть неодинаково генетически детерминированы. В целом, следует отметить, что хромосомы 2^й гомеологичной группы мягкой пшеницы несут множество генетических локусов, определяющих характеристики колоса, среди них: число колосков на уступах колосового стержня (Dobrovolskaya et al., 2009), плотность и длина колоса (Sourdille et al., 2001).

МасКеу (1968) предположил, что большинство видимых мутаций у мягкой пшеницы вызваны хромосомными перестройками и/или анеуплоидией. Результаты экспериментов В.М. Мельника и Г.П. Пастухова по изучению цитогенетики морфологических мутантов мягкой яровой пшеницы подтвердили предположение МасКеу (Мельник, Пастухов, 1984).

Таким образом, наши исследования, выполненные на многоколосковых линиях мягкой пшеницы разного происхождения, показали, что замещение хромосомы 2D и делеции короткого плеча этой хромосомы могут влиять на морфологию колоса пшеницы, вызывая развитие дополнительных колосков на уступах колосового стержня и приводя к изменению компактности колоса. Появление многоколосковых/ветвистых форм в потомстве от скрещивания мягкой пшеницы с другими видами злаков при отдаленной гибридизации в рамках селекционных программ может служить маркером перестроек хромосом 2-й гомеологичной группы.

4.3. Определение генетического вклада делеций хромосомы 2D в формирование многоколосковых фенотипов мягкой пшеницы

Для того чтобы оценить генетический вклад обнаруженных делеций хромосомы 2D в формирование многоколосковых фенотипов колоса линий Ruc204 и Skle128, было проведено генетическое картирование на популяциях F_2 , полученных от скрещиваний Ruc204 x C29 (149 растений) и Skle128 x C29 (134 растения), где C29 – линия сорта мягкой пшеницы Capatoвская 29. Расщепление в картирующих популяциях отклонялось от моногенного и для идентификации локусов, отвечающих за формирование мутантного фенотипа, было применено QTL (Quantitative Trait Locus) - картирование. Картирование QTL выполняли по апробированной методике, адаптированной нами для анализа главных генов мягкой пшеницы, на действие которых оказывают влияние локусы с минорным эффектом (Castro et al., 2005), и признаков, находящихся под полигенным контролем (Castro et al., 2008).

Колосья гибридов поколения F_1 от скрещивания Skle128 x C29 были стандартного типа, а в поколении F_2 наблюдали расщепление на несколько фенотипических классов. Наряду с классами родительских фенотипов Skle128 и C29 были идентифицированы два промежуточных класса, отличающиеся степенью проявления признака (Рисунок 4.12). Многоколосковый фенотип далее будет обозначаться SS (Supernumerary Spikelets). Соотношение растений с SS-фенотипом (10) к остальным растениям (124) соответствовало 1 : 15 ($\chi^2 = 0.34$, P > 0.75), что предполагает наличие двух рецессивных генов, контролирующих SS-признак линии Skle128.

Результаты картирования показали наличие QTL хромосомы 2DS линии Skle128 (LOD = 12.17, P = 0.0025), который определяет до 49,6% изменчивости изучаемого признака (Рисунки 4.13, 4.17) (Dobrovolskaya et al., 2015). Положение данного QTL и микросателлитных локусов, входящих в область терминальной делеции 2DS линии Skle 218, совпадает (Рисунки 4.9,

4.13). Это означает, что наличие делеции вносит вклад в формирование многоколоскового фенотипа линии Skle128.



Рисунок 4.12 – Фенотипические классы популяции F₂ от скрещивания Skle128 х Саратовская 29 (С29). Классы #1 и #4 представляют фенотипы родителей картирующих популяций (С29, Skle128). Растения класса #2 близки к С29, колосья имеют единичные дополнительные колоски (1-2 на колос), колосья растений класса #3 имеют множественные дополнительные колоски, но многоколосковый фенотип выражен в меньшей степени по сравнению с Skle128 (Dobrovolskaya et al., 2015)



Рисунок 4.13 – Частичная молекулярно-генетическая карта хромосомы 2D (картирующая популяция Skle128 x C29) с обозначением *qSS-D*. Красный прямоугольник ограничивает район карты хромосомы 2D с показателями величин LOD >10 (Разработан автором)

Li с соавт. (2011) обнаружили, что за формирование многоколоскового фенотипа Тибетской трехколосковой формы пшеницы (Tibetan triple-spikelet wheat, TTSW) отвечает локус хромосомы 2AS. Влияние локусов хромосомы

2D, участвующих в генетическом контроле изучаемого признака, авторами не изучалось. Линия Skle128 была получена на основе формы пшеницы TTSW путем самоопыления в ряде поколений. Учитывая это, мы предположили, что наряду с локусом хромосомы 2DS, в генетическом контроле формирования трехколоскового фенотипа участвует и локус хромосомы 2AS, идентифицированный ранее Li с соавторами (2011).

Колосья гибридов F₁ от скрещивания Ruc204 x S29 были стандартного типа, а гибриды F₂ расщеплялись на несколько фенотипических классов (Рисунок 4.14). Соотношение родительского фенотипа Ruc204 (21 растение) к растениям остальных классов (128) отклонялось как от расщепления 1 : 15 ($\chi^2 = 15.6$), так и от 1 : 3 ($\chi^2 = 9.5$).



Рисунок 4.14 – Фенотипические классы популяции F₂ от скрещивания Ruc204 x Саратовская 29 (С29). Классы #1 и #4 представляют фенотипы родителей (С29, Ruc204), растения класса #2 близки к С29, колосья имеют единичные дополнительные колоски (1-2 на колос), колосья растений класса #3 имеют множественные дополнительные колоски и растения класса #5 имеют более выраженный мутантный фенотип по сравнению с Ruc204 (Dobrovolskaya et al., 2015)

С использованием SSR-маркеров были сконструированы генетические карты хромосом 2D и 2A (частичная), проведено интервальное картирование SS-признака и идентифицированы два QTL хромосом 2D и 2A с вкладом в изменчивость изучаемого признака 47.4% (LOD = 13.25, P = 0.001) и 16%

(LOD = 3.8, *P* = 0.001), соответственно (Рисунок 4.15), что означает основной вклад локуса хромосомы 2D в контроль изучаемого признака.



Рисунок 4.15 – Молекулярно-генетические карты хромосомы 2D (a) и частичная карта хромосомы 2AS (b) (картирующая популяция Ruc204 x Capatobckas 29), справа от карт – результаты интервального картирования локусов *qSS-D* (a) и *qSS-A* (b). С – центромера. Красный прямоугольник ограничивает район хромосомы 2AS с показателями величин LOD > 3.0 (Разработан автором)

Расположение на молекулярно-генетической карте хромосомы 2D локуса *qSS-D* совпадает с районом интерстициальной делеции хромосомы 2DS линии Ruc204 (Рисунки 4.9, 4.15). Это означает вклад делеции этой области хромосомы в формирование многоколоскового фенотипа линии Skle128.

Таким образом, молекулярно-генетическое картирование на популяциях F_2 от скрещивания многоколосковых линий Skle128 и Ruc204 с сортом Capatoвская 29 (C29) показало, что наличие делеций оказывает существенное влияние на проявление признака «многоколосковость», определяя до 49% изменчивости изучаемого признака. Выявлено, что наряду с генетическим(и) локусом (локусами), расположенными в хромосоме 2DS, в генетическом контроле признака «многоколосковость» участвует и локус, расположенный в хромосоме 2AS. Однако основной вклад в проявление признака вносит локус хромосомы 2DS.

4.4. Изучение генетического контроля признака «многоколосковость» линии MC1611 мягкой пшеницы

Линия MC1611 – является индуцированным мутантом мягкой пшеницы и характеризуется стабильным наследованием мутантного фенотипа – развитием дополнительных колосков на уступах колосового стержня (Мельник и др., 1980; Мельник, Пастухов, 1984). По результатам анализа кариотипа у линии не было обнаружено крупных хромосомных перестроек (Раздел 4.3; Добровольская и др., 2014б). Генотипирование с использованием микросателлитного маркера *Xwmc453*, ко-сегрегирующего с геном *mrs1*, показало, что линия несет аллель 205 п.н., отличный от диагностического для признака многоколосковости морфотипа MRS (*Xwmc453*-194-п.н.).

Для изучения особенностей наследования мутантного фенотипа были проведены скрещивания мутантной линии MC1611 с исходным сортом C29: анализирующее скрещивание MC1611/C29//MC161 и скрещивание MC1611/C29//C29, а также скрещивание с линией мягкой пшеницы сорта Скала (колос дикого типа). Гибриды F₁ от скрещиваний MC1611 х C29 и MC1611 х Скала имели колос дикого типа. Колосья растений BC₁ (140 растений) от скрещивания MC1611/C29//C29 были дикого типа, а в популяции BC₁ (155 растений) от скрещивания MC1611/C29//MC161 наблюдали расщепление: 77 растений дикого типа и 78 растений мутантного типа, соответствующее расщеплению 1 : 1 ($\chi^2 = 0,01$ при P > 0.90). Полученные результаты означают, что признак «многоколосковость» у изучаемой линии обусловлен мутацией, возникшей в одном гене в результате мутагенеза.

Лайкова с соавт. (2005) провели моносомный анализ, скрещивая линию MC1611 с моносомными тестерными линиями сорта Capaтовская 29, и показали, что в контроле изучаемого признака участвует хромосома 2D. Следовательно, мутантный ген локализован в хромосоме 2D. В нашем исследовании расщепление в поколении F_2 от скрещивания MC1611 с сортом Скала (116 растений с колосьями дикого типа : 19 растений с колосьями мутантного типа) отклонялось от моногенного ($\chi^2 = 8.6$) и дигенного ($\chi^2 = 14.2$), однако было ближе к моногенному. Обобщая полученные результаты, можно предположить, что на проявление мутации оказывает влияние генотипическая среда и наряду с главным геном, локализованным в 2D, на признак оказывают влияние минорные гены.

Используя метод интервального картирования, был идентифицирован QTL хромосомы 2D, определяющий признак «многоколосковость» линии MC1611. Для этого был выполнен модифицированный балк-анализ с использованием маркеров хромосом 2A, 2B и 2D, как описано выше для MRS - линий (см. раздел 4.1). Было обнаружено сцепление изучаемого гена и маркеров хромосомы 2D. Далее, с использованием микросателлитных маркеров хромосомы 2D (Röder et al., 1998; Guyomarc'h et al., 2002; Somers et al., 2004), сконструирована молекулярно-генетическая карта хромосомы и с помощью интервального картирования идентифицирован QTL хромосомы 2DS с вкладом в изменчивость изучаемого признака 16.4% (LOD = 3.1, P = 0.05) (Pucyhok 4.16) (Dobrovolskaya et al., 2015).



Рисунок 4.16 – Молекулярно-генетическая карта хромосомы 2D с обозначением локуса *qSS-D*, отвечающего за формирование дополнительных колосков на уступах колосового стержня линии MC1611 (картирующая популяция F₂ MC1611 x Скала) (Разработан автором)

Положение идентифицированного QTL и гена *mrs1* на генетических картах совпадает (Рисунок 4.17). Исходя из сходства мутантных фенотипов и локализации, можно предположить, что генетический фактор хромосомы 2DS, вызывающий мутантный фенотип у MC1611 (*qSS-D*), и *mrs1* являются рецессивными аллелями одного генетического локуса, при этом *qSS-D* линии

MC1611 вызывает менее выраженные изменения фенотипа и, таким образом, является «слабым» аллелем по сравнению с *msr1*.



Рисунок 4.17 – Молекулярно-генетические карты хромосомы 2D, содержащие ген *mrs1* (a, b) и локусы количественных признаков *qSS-D* (d-f). Графическое изображение хромосомы 2D почти изогенной линии NIL - *mrs1* (c), где красным прямоугольником изображена область интрогрессии. Родители картирующих популяций с многоколосковыми фенотипами (Ruc167, Ruc163, MC1611, Ruc204, Skle128) обозначены над картами хромосом. Названия морфотипов – MRS (multirow spike), HS (horizontal spikelet), HS-GB (horizontal spikelets – genuine branching), TTSW (Tibetan triple-spikelet wheat) размещены в верхней части рисунка над соответствующими родителями картирующих популяций. *del.* – делеция в

хромосоме 2DS. Светло-красные прямоугольники ограничивают области хромосом с показателями величин LOD, указанными под картами хромосом. ▶ – центромера (Dobrovolskaya et al., 2015)

Результаты генетического анализа, молекулярно-генетического картирования и цитогенетических исследований показали наличие гена (генов) хромосомы 2D, рецессивные мутантные аллели и делеции которого (которых) вызывают формирование дополнительных колосков на уступах колосового стержня. Сравнительный анализ сконструированных карт хромосом показал ко-локализацию генов и QTL (Рисунок 4.17) на картах 2DS (Dobrovolskaya et al., 2015).

По результатам наших исследований, основной вклад в проявление признака «многоколосковость» мутантных линий мягкой пшеницы вносит генетический локус, расположенный в коротком плече хромосомы 2D.

Расположение локуса *qSS-A* в хромосоме 2AS мягкой пшеницы (Рисунок 4.17) и локализация гена *bh* (2AS), детерминирующего ветвистоколосость у тетраплоидной пшеницы *T. durum* Desf. *var. ramosoobscurum* Jakubz. "Vetvistokoloskaya" R107 (Haque et al., 2012), совпадает, однако вклад этого локуса у линий тетраплоидного *T. durum* и гексаплоидного *T. aestivum* видов пшеницы неодинаков. Так, если наличие рецессивного аллеля *bh* у линии тетраплоидной пшеницы *T. durum* полностью определяет мутантный фенотип, то у линии Ruc204 *T. aestivum* определяет только 16.8% изменчивости изучаемого признака, в то время как основной вклад вносит локус, расположенный в хромосоме 2D.

Идентифицированные нами генетические локусы и делеции колокализуются на молекулярно-генетических картах хромосомы 2D (Рисунок 4.17) и вызывают сходные изменения в схеме развития соцветия несущих их SS-линий (Глава 3). На основании этого можно предположить, что мутации и делеции затрагивают один и тот же ген(гены). Для выяснения аллельности обнаруженных мутаций были проведены скрещивания, результаты которых представлены в Таблице 4.3.

Гибриды поколения F₁ всех трех скрещиваний представляли SS-фенотип. Расщепление среди гибридов F2 от скрещиваний NIL-mrs1 с делеционными линиями Skle128 и Ruc204 не наблюдалось, все растения поколения F₂ были многоколосковыми, различаясь по степени выраженности признака. Следует отметить, что обе делеционные линии наряду с делециями, вносящими основной вклад в изменчивость признака «многоколосковости», несут генетические локусы хромосомы 2AS, также оказывающие влияние на SS-признак. В скрещиваниях линий MRS-фенотипа (Ruc163 и Ruc167) с линией So149 наблюдали моногенное рецессивное наследование и влияние одного гена – mrs1 хромосомы 2DS (см. раздел 4.1). На основании полученных результатов можно предположить, что родители картирующих популяций Ruc163 x So149 и Ruc167 x So149 контрастны только по аллелям гена Mrs1 (Mrs1 vs. mrs1) и не различаются по локусам 2AS, при этом наличия одного *qSS-A* локуса хромосомы 2AS у So149 недостаточно для проявления признака многоколосковости.

Таблица 4.3 – Расщепление в популяциях F₂ от скрещиваний NIL-*mrs1* и многоколосковых линий разного происхождения (Разработана автором)

Скрещивание	F1	\mathbf{F}_2					
		Общее число	Наблюдаемое расщепление		Теоретическое расщепление	χ^2	Р
		растений	NS	SS	NS K SS		
NIL- <i>mrs1</i> x Skle128	SS	140	-	140	-	-	-
NIL- <i>mrs1</i> x Ruc204	SS	140	-	140	-	-	-
NIL- <i>mrs1</i> x MC1611	SS	142	26	116	1:3	4.2	0.025- 0.05

Примечание: NS – стандартный фенотип колоса; SS – многоколосковый фенотип (Dobrovolskaya et al., 2015).

Среди гибридов F_2 от скрещивания NIL-*mrs1* х MC1611 наблюдали расщепление близкое 3 (SS) к 1 (стандартный колос) (Таблица 4.3), следовательно, признак многоколосковости наследовался по доминантному типу. В популяциях от скрещиваний изучаемых многоколосковых линий с линиями с колосом стандартного типа наблюдали рецессивное наследование. Наличие мутантного фенотипа гибридов поколения F_1 и наследование по доминантному типу в поколении F_2 можно объяснить тем, что гены *mrs1* и *qSS*-*D* аллельны, однако несущие их линии NIL-*mrs1* и MC1611 контрастны по другому гену (генам), который(е) также оказывают виляние на проявление изучаемого признака.

Таким образом, показано, что у мутантных линий мягкой пшеницы разного происхождения основной вклад в проявление признака «многоколосковость» вносят генетические локусы хромосомы 2DS.

4.5. Изучение генетического контроля фенотипа колоса *monstrosum* ржи посевной *S. cereale*

Изучение генетического контроля многоколосокового фенотипа колоса ржи проводили на материале самонесовместимой формы ржи D40 (*monsrosum*) и инбредной линии S11 (стандартный колос) из Петергофской генетической коллекции ржи. Колос ржи формы D40 имел многоколосковый фенотип по типу близкий к описанному ранее *monstrosum* (Смирнов, Соснихина, 1984) – на уступах колосового стержня развивалось множество дополнительных колосков. Монстрозный (*monstrosum*) фенотип колоса ржи формы D40 напоминал изученный нами многоколосковый морфотип мягкой пшеницы – MRS (Рисунок 4.18).

Растения гибридов F₁ от скрещивания D40 и S11 имели колосья стандартного типа, а в популяции F₂ наблюдали расщепление: 54 (стандартный тип колоса) к 21 (монстрозный колос), соответствующее 3 : 1 $(\gamma^2 = 0.36; P > 0.50)$. Это подтверждает ранее полученные данные о рецессивном моногенном характере наследования признака monstrosum al., (De Vries, Sybenga, 1984; Benito et 1991). Картирование гена, обозначенного monstrosum1 (mol), проводили с применением SSR маркеров, локализованных ранее в хромосоме 2R, учитывая данные о хромосомной локализации гена (De Vries, Sybenga, 1984; Benito et al., 1991). В работе использовали маркеры, разработанные к SSR-локусам пшеницы (Röder et al., 1998; Ganal, Röder, 2007) и картированные затем в геноме ржи (Khlestkina et al., 2004), и SSR маркеры ржи (Korzun et al., 2001). Кроме того, применяли микросателлитные маркеры, разработанные на основе последовательностей EST пшеницы, которые амплифицируют в геноме ржи (Zhang et al., 2005; 2006). С Zhang, использованием полиморфных маркеров провели генотипирование индивидуальных растений популяции F₂.



Рисунок 4.18 – Колос фенотипа *monstrosum* формы D40 ржи посевной (а, в). Сходство фенотипов колоса MRS (multirow spike) пшеницы и (б) и *monstrosum* ржи (в) (Разработан автором)

Ген *mo1* был локализован на молекулярно-генетической карте хромосомы 2R (Рисунок 4.19).



Рисунок 4.19 – Молекулярно-генетическая карта хромосомы 2R ржи *S. cereale*, содержащая ген *mol*. S – короткое плечо, L – длинное плечо хромосомы 2R (Dobrovolskaya et al., 2009)

Положение *mo1* на карте фланкировали микросателлитные маркеры *Xrms5b* (15.7 cM) – проксимально и *Xcfe209* (10.7 cM) – дистально (Рисунок 4.19). Так как ген *mo1* располагался на карте дистально по отношению к маркеру короткого плеча хромосомы 2R - Xscm43 (Korzun et al. 2001; Malyshev et al., 2007), мы заключили, что изучаемый ген локализован в коротком плече. Расстояние от *mo1* до центромеры составило около 10 cM. Родители картирующей популяции были контрастны по признаку «безлигульность листа» и наряду с геном mol был картирован ген el, детерминирующий безлигульный фенотип (De Vries, Sybenga, 1984; Benito et al., 1991). На карте хромосомы 2R ген el ко-локализован с маркером *Xrms5a*, генетическое расстояние между генами mol и el составило около 40 сМ.

Таким образом, ген *mo1*, детерминирующий монстрозный фенотип колоса, был впервые картирован в коротком плече хромосомы 2R ржи посевной с применением микросателлитных маркеров (Dobrovolskaya et al., 2009).

4.6. Обсуждение и заключение к Главе 4

Исследования генетического контроля признака ветвистоколосости у тетраплоидной пшеницы *T. turgidum* имеют длительную историю и наличие рецессивного гена, *bh*, детерминирующего ветвистоколосый фенотип было показано Е. von Tschermak еще в 1910 г. (Гончаров, 2012). Результатами многих последующих работ было подтверждено наличие рецессивного гена (Sharman, 1967; Pennell, Halloran, 1983; Klindworth et al., 1990a; Peng et al., 1998; Martinek, Bednar, 2001). Было показано, что главный ген (*bh*), контролирующий ветвистоколосый фенотип *T. turgidum*, локализован в хромосоме 2AS (Klindworth et al., 1990b, Klindworth et al., 1997), и на его действие оказывают влияние гены с минорными эффектами (Klindworth et al., 1990b).

Изучать формы гексаплоидной мягкой пшеницы с ветвистым колосом или множеством сидячих колосков на уступах колосового стержня начали позже. Прежде всего это было связано с тем, что большая часть таких форм появилась сравнительно недавно (Цицин, 1963; Sharman, 1944; Swaminathan et al., 1966 и др.), в то время как ветвистоколосые формы пшеницы *T. turgidum* широко распространены и известны около 2 тысяч лет (Dahlgren, 1922; Дорофеев и др., 1979). Ветвистоколосые/многоколосковые формы мягкой пшеницы возникали в результате мутагенеза (Sharman, 1944; Swaminathan et

al., 1966), отдаленной гибридизации (Цицин, 1963) или анеуплоидии (Sears, 1954). Информация о числе генов, оказывающих влияние на формирование многоколоскового фенотипа мягкой пшеницы и характер их наследования (доминантность/рецессивность) была несколько противоречива (Koric, 1973, 1980, Pennell, Halloran, 1983, Peng et al., 1998).

В генетический наших исследованиях, изучая контроль многоколосковости линий разного происхождения (*mrs1*-мутанты, Ruc204, Skle128, MC1611), мы идентифицировали ген mrs1, локусы количественных признаков qSS-D и qSS-A и впервые показали, что основной вклад в формирование фенотипа и ветвистоколосых линий пшеницы, и линий со сверхчисленными сидячими колосками вносит генетический локус хромосомы 2DS (Dobrovolskaya et al., 2009, 2015).

По результатам анализа развивающего соцветия мы отнесли все эти линии к одной группе с изменениями морфогенеза I, показав, что в основе формирования их фенотипов лежат однотипные изменения развития соцветия: развитие эктопических колосковых меристем на месте цветковых меристем либо только в базальной части колоска, либо во всем колоске полностью. Причина этого – нарушения идентичности колосковой меристемы при установлении идентичности цветковых меристем и нарушение установления идентичности цветковых меристем, начиная с ранних этапов дифференцировки колосковой меристемы (Добровольская и др., 2014б; Dobrovolskaya et al., 2015). Учитывая особенности развития соцветия многоколосковых фенотипов, можно предположить, что основная роль гена Mrs1/qSS-D заключается в генетическом контроле перехода к установлению идентичности цветковых меристем соцветия, и его мутации вызывают нарушения в установлении идентичности цветковых меристем и развитие эктопических вторичных аксиальных меристем (эктопических колосковых меристем) вместо цветковых. Следует отметить, что в многоколосковом колосе (под контролем mrs1/qSS-D) дополнительные колоски ориентированы определенным образом – они всегда располагаются под углом к первичному колоску. Это вызвано сменой филлотаксиса при развитии эктопических меристем, которая сопровождает нарушенное установление идентичности.

Таким образом, формирование ветвистого колоса и колоса с дополнительными колосками пшеницы вызвано однотипными нарушениями развития и находится под генетическим контролем локусов *mrs1/qSS-D* (Добровольская и др., 2011, 20146; Dobrovolskaya et. al., 2015).

Изучая особенности наследования ветвистоколосости образца V тетраплоидной пшеницы T. turgidum Klindworth с соавт. (1990b) обнаружили, что при скрещивании с линией со стандартным колосом в поколении гибридов F₂ всегда наблюдается расщепление на три фенотипических класса. Наряду с растениями с родительскими фенотипами – стандартным колосом и ветвистым колосом (этот класс был обозначен как RS – ramified spike, ветвистый колос), появляется еще один класс с дополнительными сидячими колосками на уступах (авторы обозначили этот класс FRS, four rowed spike, четырехрядный FRS колос). При последующем самоопылении стабильно признак наследовался, а в потомстве от самоопыления RS могли снова выщепляться растения с колосьями фенотипа FRS. Позднее Zhang с соавт. (2017) на основе гибридов от скрещивания ветвистоколосого образца T. turgidum и линий со стандартным колосом получили почти изогенные линии с фенотипами RS и FRS. Результаты исследований Klindworth с соавт. (1990b) и Zhang с соавт. (2017) предполагают участие общего генетического фактора (факторов), определяющего фенотипы FRS и RS. Данные наших исследований показывают, что в основе формирования сверхчисленных колосков морфотипа HS (аналогичен FRS) и ветвистого колоса мягкой пшеницы (RS) лежат одинаковые изменения программы развития, которые находятся под контролем генов Mrs1/qSS-D и qSS-A (Добровольская и др., 2014а, 2014б; Dobrovolskaya et al., 2009, 2015). Положение генетического локуса qSS-A на карте хромосомы 2А мягкой пшеницы (Dobrovolskaya et al., 2015) и гена bh, детерминирующего ветвистоколосость тетраплоидной пшеницы *Т. durum* "Vetvistokoloskaya" R107 (Haque et al., 2012), на 2AS совпадает, на основании чего можно заключить, что гены *bh* (2AS) и *qSS-A* являются ортологами. Наличие генетического локуса хромосомы 2A, определяющего развитие многоколоскового фенотипа у мягкой пшеницы, было подтверждено в работе Li с соавт. (2011). Ген *Mrs1/qSS-D* генома D и ген генома A расположены в областях консервативной синтении, на основе чего можно предположить, что они являются представителями гомеологичной серии генов. Важно отметить, что если в геноме тетраплоидной пшеницы наличие рецессивного аллеля *bh* пшеницы полностью определяет мутантный фенотип, то у гексаплоидной пшеницы *qSS-A* определяет только 16.8% изменчивости изучаемого признака, в то время как основной вклад вносит локус, расположенный в хромосоме 2D (Dobrovolskaya et al., 2009, 2015).

Результаты наших исследований подтвердили наличие генетического фактора, определяющего ветвистоколосый/многоколосковый фенотип в хромосоме 2D мягкой пшеницы, обнаруженное ранее с использованием методов цитогенетики (Peng et al., 1998; Лайкова и др., 2005). Что касается основного вклада локуса генома D в определение SS-фенотипа, то эти данные были получены нами впервые и позднее подтверждены исследованием, выполненным при идентификации QTL, определяющих ветвистоколосость образца мягкой пшеницы (Echeverry-Solarte et al., 2014). Авторы показали, что наряду с основным вкладом генетического локуса хромосомы 2D, существуют QTL с меньшими эффектами (Echeverry-Solarte et al., 2014). Это подтвердило результаты ранних работ (Klindworth et al., 1990) о наличии минорных генов, влияющих на признак «ветвистоколосость» и результаты наших исследований о влиянии генотипической среды на проявления мутантного гена хромосомы 2D у линии MC1611 при скрещивании с сортом Скала (Добровольская и др., 20146).

Мы обнаружили, что делеции или полное отсутствие хромосомы 2D может приводить к формированию дополнительных колосков на уступах и ветвистости колоса морфотипов HS (horizontal spikelets), GB (genuine branching), принадлежащих группе I (Глава 3) линий мягкой пшеницы

(Добровольская и др., 20146; Dobrovolsakya et al., 2009; Dobrovolskaya et al., 2015). В то же время у делеционных линий сорта Чайниз Спринг такого эффекта обнаружено не было (Добровольская и др., 2014). Это может свидетельствовать о влиянии генотипической среды, в частности, наличии у Чайниз Спринг и отсутствию у изучаемых нами SS-линий генетических факторов, которые могут компенсировать нарушение функций гена (генов) *Mrs1/qSS-D* в результате мутаций или делеций.

Анализируя фенотипы делеционных линий пшеницы сорта Чайниз Спринг, мы обнаружили две линии, делеции в хромосомах которых вызвали появление пары вертикальных колосков на уступах (VSS – vertical sessile spikelets) (Добровольская и др., 2014а). Принимая во внимание особенности ориентации дополнительных колосков относительно первичного колоска и оси колоса, а также учитывая разные изменения в программах развития у многоколосковых фенотипов групп I и III (Глава 3), мы предположили, что в основе изменений этих лежат разные генетические механизмы (Добровольская и др., 2014а). Наше предположение было подтверждено результатами Boden с соавт. (2015) и Dixon с соавт. (2018), которые показали, что признак VSS находится под полигенным контролем, в котором принимают участие определенные аллели генов *Photoperiod-1 (Ppd-1)* (Boden et al., 2015) и TEOSINTE BRANCHED1 (TB1) (Dixon et al., 2018). Гомеологичные аллели гена *Ppd1* локализованы в коротких плечах 2-й гомеологичной группы хромосом также, как и Mrs1, однако на молекулярно-генетической карте 2DS ген Ppd1-D расположен дистальнее картированного нами гена mrs1 (Dobrovolskaya et al., 2009; Boden et al., 2015).

Таким образом, многоколосковые линии, отнесенные нами к разным группам (I и III) в соответствии с особенностями развития колоса (нарушениями морфогенеза), находятся под разным генетическим контролем.

Наряду с генами *mrs1/qSS-D* и *qSS-A*, детерминирующими многоколосковый фенотип мягкой пшеницы, локализованными нами в районах консервативной синтении хромосом 2DS и 2AS (Dobrovolskaya et al.,

2009, 2015), нами был картирован ген mo1, определяющий многоколосковый фенотип monstrosum ржи посевной S. cereale (Dobrovolskaya et al., 2009). Полученные нами результаты подтвердили и уточнили полученные раннее данные картирования с помощью изозимных маркеров о локализации гена в хромосоме 2RS (Benito et al., 1991). Хромосома ржи 2R сохраняет коллинеарность (сходный порядок расположения маркеров) с хромосомами 2-й гомеологичной группы пшеницы (Devos et al., 1993). Следует отметить, что ген ячменя brc1 (branched 1), детерминирующий многоколосоковый фенотип колоса также локализован в хромосоме 2HS (Castiglioni et al., 1998; Rossini et al., 2006) коллинеарной с 2R и 2D (Devos et al., 1993). Расположение генов пшеницы, ржи и ячменя в областях консервативной синтении и сходство фенотипов мутантов предполагает наличие ортологичной серии генов, мутации которых вызывают развитие дополнительных колосков на уступах, в геномах представителей трибы Triticeae.

Таким образом, исследования генетического контроля признака «многоколосковость» у линий мягкой пшеницы разного происхождения, представляющих различные многоколосковые морфотипы колоса, и ржи посевной с использованием методов молекулярно-генетического картирования и анализа кариотипов позволили получить следующие основные результаты:

1. Обнаружено, что замещение хромосомы 2D и делеции в коротком плече хромосомы 2D мягкой пшеницы могут оказывать влияние на морфологию колоса, вызывая развитие дополнительных колосков и эктопических «веточек» на уступах колосового стержня. Показано, что наличие делеций хромосомы 2DS может определять до ~ 50% изменчивости изучаемого признака – наличие дополнительных колосков на уступах.

2. Показано, формирование ЧТО ветвистого колоса колоса И С дополнительными колосками на уступах колосового стержня MRS HS морфотипов (многорядный колос), многоколосковых

(горизонтальные колоски) и GB (ветвистый колос) пшеницы вызвано однотипными нарушениями развития соцветия пшеницы и находится под контролем генетических локусов хромосом 2DS и 2AS:

а) Признак MRS мягкой пшеницы находится под контролем рецессивного аллеля гена *Mrs1*, локализованного в коротком плече хромосомы 2DS в составе богатого генами района 2S0.8;

б) За формирование колоса пшеницы морфотипов HS (горизонтальные колоски) и GB (ветвистый колос) отвечают генетические локусы *qSS-A* и *qSS-D*, расположенные в районах консервативной синтении хромосом 2AS и 2DS мягкой пшеницы, при этом основной вклад вносит локус хромосомы 2DS;

в) Генетические локусы *Mrs1* и *qSS-D* ко-локализуются на молекулярно-генетических картах хромосомы 2D и по результатам теста на аллелизм, сравнительного картирования и анализа особенностей развития мутантных фенотипов могут представлять собой разные аллели одного гена.

3. Признак monstrosum ржи посевной S. cereale находится под контролем рецессивного аллеля гена Mol, локализованного в коротком плече хромосомы 2R в области консервативной синтении с районами хромосом мягкой пшеницы 2DS и 2AS, содержащими локусы Mrs1/qSS-D и qSS-A.

Глава 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНА *mrs1*, КОНТРОЛИРУЮЩЕГО МНОГОКОЛОСКОВЫЙ ФЕНОТИП КОЛОСА МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

5.1. Установление гена-кандидата на роль гена mrs1

С использованием SSR маркеров пшеницы нами была установлена локализация гена mrs1 и локусов количественных признаков qSS-D на молекулярно-генетических микросателлитных картах хромосомы 2D мягкой пшеницы (Dobrovolskaya et al., 2008, 2009, 2015). Высокий внутривидовой полиморфизм SSR локусов позволяет применять SSR маркеры для создания насыщенных маркерами молекулярно-генетических карт хромосом (Ganal, Röder, 2007) и сравнительного картирования близких таксонов, как было показано нами ранее (Добровольская и др., 2009; Dobrovolskaya et al., 2011), но для выполнения сравнительного картирования отдаленных таксонов, установления районов консервативной синтении SSR маркеры не пригодны из-за высокой видоспецифичности (Röder et al., 1998). Определение точной локализации гена mrs1 на молекулярно-генетической карте хромосомы 2D (Dobrovolskaya et al., 2009) послужило отправной точкой для последующей основанной на синтении идентификации гена-кандидата на роль mrs1 с использованием консервативных ортологичных серий генов (Conserved Ortholog Set, COS) злаков.

Для установления районов консервативной синтении хромосомы 2DS, содержащей *mrs1*, и геномов модельных видов злаков – риса и *B. distachyon* в микросателлитные карты хромосом 2D были интегрированы COS-SSCP (Conserved Ortholog Set - Single Strand Conformation Polymorphism) маркеры, используемые для сравнительного картирования геномов отдаленных таксонов (Quraishi et al., 2009). COS-SSCP подход основан на использовании массива данных, полученных в ходе выполнения проектов по секвенированию геномов модельных видов (в данном случае модельного

вида злаковых – риса), и баз данных по физическому картированию экспрессируемых последовательностей ДНК (expressed sequence tags, EST) в менее изученных геномах (в нашем случае – в геноме мягкой пшеницы). Праймеры СОЅ маркеров разработаны к консервативным районам генов ортологичных серий, ограничивающих (фланкирующих) вариабельные районы, в основном интроны. Продукты ПЦР-амплификации с COS-SSCP праймерами разделяют в условиях, выявляющих конформационный ДНК-полиморфизм (Quraishi et al., 2009). Принцип разработки COS-маркеров показан на Рисунке 1 Приложения.

Работа по насыщению карт хромосомы 2D COS-SSCP маркерами выполнялась автором на базе лаборатории палеогеномики и эволюции, руководитель д-р Ж. Сальс (Dr. J. Salse, Paleogenomics and Evolution, UMR INRA-UBP, Клермон-Ферран, Франция) с использованием разработанных в лаборатории COS-SSCP маркеров (Quraishi et al., 2009).

COS-SSCP маркеры (61 маркер), разработанные на основе двадцати девяти последовательностей EST, локализованных в хромосомах 2AS, 2BS и 2DS (Quraishi et al., 2009), использовали для COS-SSCP анализа (Таблица 3. Приложения). Был проведен тест на полиморфизм на образцах ДНК родителей картирующих популяций Ruc163, Ruc167 и So149, в результате было обнаружено десять полиморфных маркеров (Рисунок 5.1 и Таблица 4 Приложения), один из которых, *BG263521_i1*, был интегрирован в 2D, молекулярно-генетические хромосом где карты располагался проксимально по отношению к изучаемому гену mrs1 (Рисунок 5.2) al., 2015). Остальные COS-SSCP маркеры (Dobrovolskaya et были локализованы либо в хромосомах 2BS и 2AS, либо их локализацию установить не удалось (Таблица 4 Приложения).

Таким образом, с использованием COS-SSCP маркеров нам удалось ограничить район хромосомы 2D, содержащий ген *mrs1*, проксимально, но для того чтобы определить район полностью требовались расположенные дистально по отношению к *mrs1* маркеры.



Рисунок 5.1 – Фрагментный (COS-SSCP) анализ (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer) продуктов ПЦР амплификации COS-SSCP-маркера *BF201328-i2* на образцах ДНК нули-тетрасомных линий N2AT2B, N2BT2D и N2DT2B сорта Чайниз Спринг (Chinese Spring, CS) и родителей картирующих популяций So149, Ruc163, Ruc167 (Разработан автором)

Консенсусная карта хромосомы 2DS, наряду с геном mrs1 и SSR маркерами, содержит RFLP маркеры (Рисунок 4.46 Главы 4), которые благодаря высокой консервативности использовались для сравнительного картирования отдаленных (Devos al., 1993). таксонов злаков et Последовательности ДНК многих RFLP проб доступны из баз данных (в частности, нуклеотидные последовательности СDO1479 (ВЕ439234.1) и CDO405 (AA231912.1)), их локализация в геномах злаков известна, либо они могут быть картированы в геномах модельных видов (например, риса) in silico.



Рисунок 5.2 – Частичные молекулярно-генетические карты хромосом 2D, содержащие ген *mrs1*, микросателлитные и COS-SSCP маркеры (обозначены красным цветом). І и II – картирующие популяции F₂ Ruc163 x So149 и Ruc167 x So149, соответственно. Общие локусы соединены пунктирными линиями (Разработан автором)

Молекулярно-генетические карты хромосом, содержащие COS-SSCP маркеры (Рисунок 5.2), были интегрированы в консенсусную карту хромосомы 2D (Рисунок 4.46 Глава 4). На полученной карте (Рисунок 5.3) локус *mrs1* фланкируют COS-маркеры *BG263521_i1* (далее COS1), *Xcdo405* (далее COS2) и *Xcdo1479* (COS3), представляющие серии консервативных генов: COS1 (LOCOs07g38530 -Bradi1g23970-Sb02g037070 риса, *B. distachyon* и сорго, соответственно), COS2 (LOCOs07g45064 риса) и COS3 (LOCOs07g48200-Bradi1g17680-Sb02g043000, риса, *B. distachyon* и сорго, соответственно) (Рисунок 5.3).

Таким образом, была установлена синтения COS1-COS3-района хромосомы 2DS мягкой пшеницы, хромосомы 7 риса (*O. sativa*), хромосомы 1 *B. distachyon* и хромосомы 2 сорго (*S. bicolor*), что позволило определить список генов-кандидатов на роль *mrs1* (Таблица 5 Приложения) (Dobrovolskaya et al., 2015).



Рисунок 5.3 – Локализация COS-маркеров на консенсусной молекулярногенетической карте хромосомы 2DS мягкой пшеницы (**a**) и физических картах хромосом [chr7] риса *O. sativa* (**b**), [chr1] *B. distachyon* (**c**) и [chr2] сорго *S. bicolor* (**d**). Локусы генов-ортологов соединены черными пунктирными линиями (Dobrovolskaya et al., 2015)

Было обнаружено, что в районе консервативной синтении хромосомы 7 риса расположен ген FRIZZY PANICLE (FZP), кодирующий белок транскрипционного фактора семейства APETALA 2 (AP2)/Ethylene Response Factor (ERF) (Tanaka et al., 2013). У мутантов *fzp* формирование цветков замещается повторяющимися циклами разветвления соцветия (Komatsu et al., 2003а). Фенотип мутантов *fzp* предполагает следующие функции гена FZP: подавление развития эктопических аксиальных меристем соцветия и установление идентичности цветковых меристем (Komatsu et al., 2003а). Ген кукурузы (Z. mays) BRANCHED SILKLESS1 (BD1) является ортологом гена FZP. функции генов *BD1* и *FZP* в регуляции развития соцветия консервативны, а мутанты имеют сходные фенотипы колоса (Chuck et al., 2002; Komatsu et al., 2003a) (Рисунок 5.4). Таким, образом, гены BD1, FZP и MRS1 расположны в областях консервативной синтении (Рисунок 5.3) и их мутации приводят к сходным фенотипическим изменениям при формировании соцветий.



Komatsu et al. (2003) Chuck et al. (2002)

Рисунок 5.4 – Соцветия мутантов *fzp* риса (а) и *bd1*кукурузы (b) (Chuck et al., 2002; Komatsu et al., 2003а)

Учитывая синтению хромосом злаков в области расположения локуса Mrs1, сходство изменений в программах развития соцветий и фенотипических проявлений мутаций mrs1 пшеницы (Dobrovolskaya et al., 2008, 2009, 2015), *fzp* риса (Komatsu et al., 2003а) и *bd1* кукурузы (Chuck et al., 2002), ортолог гена *FZP* пшеницы, обозначенный *WFZP* (*wheat FZP*), был выбран в качестве наиболее вероятного гена-кандидата на роль *Mrs1* (Dobrovolskaya et al., 2015).

5.2. Установление структурной организации локусов *WFZP* в геноме мягкой пшеницы

Ген риса *FZP* кодирует транскрипционный фактор, состоящий из 318 аминокислот, содержащий два консервативных домена: AP2/ERF (APETALA2/Ethylene Response Factor) и С-терминальный кислый домен. Домен AP2/ERF состоит из 58 аминокислот, расположен ближе к N-концу белка. С учетом структурной организации и расположения AP2/ERF-домена, ген *FZP* и его ортологи относят ко второму (II) классу семейства генов AP2/ERF (Chuck et al., 2002; Fujimoto et al., 2000; Tanaka et al., 2013). Показана высокая гомология AP2/ERF доменов гена риса *FZP* и других представителей семейства AP2/ERF II, например, генов арабидопсис *LEAFY PETIOLE* (van der Graaff, 2000) и *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1* (Banno et al., 2001; Komatsu et al., 2003a). С-терминальный кислый домен гена консервативен только у ортологов гена *FZP* (Komatsu et al., 2003a).

Поиск нуклеотидных последовательностей пшеницы, гомологичных гену *FZP*, с использованием алгоритма BLAST в публичных базах данных на момент выполнения исследований не дал результатов. Для выделения гена *WFZP* в геноме мягкой пшеницы была выбрана стратегия поиска гомологичных последовательностей гена при скрининге BAC (bacterial artificial chromosome) -библиотек пшеницы.

На следующем этапе исследований на основе последовательностей гена риса FZP и предполагаемого ортолога B. distachyon, BRADI1G18580.1, как наиболее генетически близкого пшенице модельного вида злаков, были разработаны новые COS-маркеры. Праймеры были подобраны К консервативным областям гена – последовательностям AP1/ERF и кислого доменов гена BRADI1G18580.1 (Рисунок 2 Приложения). Структура праймеров приведена в Таблице 6 Приложения. С помощью двух пар единичные продукты амплификации ожидаемого праймеров, дающих молекулярного веса, был проведен скрининг BAC (bacterial artificial chromosome) -библиотеки «Tae-B-Chinese Spring» мягкой пшеницы сорта Чайниз Спринг (http://cnrgv.toulouse.inra.fr/fr/library/genomic resource/Tae-B-Chinese%20spring). На первом этапе был проведен скрининг ДНК 2D (2-мерных) суперпулов ВАС-клонов, представленных на ОДНОМ 384-луночном планшете (принцип создания суперпулов приведен на Рисунке 3 Приложения, порядок расположения суперпулов в 384-луночном планшете и результаты скрининга показаны на Рисунках 4 и 5 Приложения, соответственно). Затем были определены координаты «ПОЗИТИВНЫХ» 384-луночных планшетов, содержащих «позитивные» ВАС клоны со

встройками целевых последовательностей ДНК (Рисунок 6 Приложения). Всего был обнаружен 21 «позитивный» планшет, в результате скрининга ВАС-клоны которых были выявлены с целевыми нуклеотидными последовательностями ДНК, гомологичными гену FZP. Секвенирование методом Сэнгера продуктов амплификации образцов ДНК ВАС-клонов, содержащих вставки последовательностей ДНК, обнаружило три группы последовательностей, предположительно соответствующих трем гомеологичным копиям гена *WFZP* геномов A, B и D.

Используя 454-Roche технологию, проведено секвенирование трех отобранных ВАС-клонов, CS248B13, CS184F24 и CS305H5, определена первичная структура районов ДНК, содержащих локусы гомеологичных генов WFZP протяженностью до 62000 п.н. На основе первичной структуры последовательностей WFZP разработаны специфические праймеры (Таблица 6 Приложения) и с использованием нулли-тетрасомных линий сорта Чайниз Спринг проведена локализация трех генов-гомеологов в хромосомах 2А, 2В и 2D, соответственно. Анализ результатов секвенирования и аннотация уникальных и повторяющихся последовательностей ДНК в составе ВАСклонов выполнены д-ром О. Шосон (Dr. Au. Chosson, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)-Université Blaise Pascal Unité Mixte de Recherche-1095, Клермон-Ферран, Франция), как описано в Dobrovolskaya с соавт. (2015). ДНК последовательности были депонированы в базы данных GeneBank/EMBL под номерами: BAC-clone-WFZP-A (KP276772); BAC-clone-WFZP-B (KP276773); и BAC-clone-WFZP-D (KP276774). Схематическое изображение локусов, содержащих гены WFZP, приведено на Рисунке 5.5.



Рисунок 5.5 – Ген *WFZP* мягкой пшеницы. (А) Консенсусная карта хромосомы пшеницы 2D, включающая локус *mrs1* и фланкирующие его COS-маркеры. (В) Районы консервативной синтении хромосом риса [Chr7], сорго [Chr2] и *B. distachyon* [Brachy, Chr 1], консервативные гены соединены черными линиями. (С) Аннотированные ВАС клоны представлены консервативными генами (genes, черные прямоугольники), мобильными элементами (transposable elements, TE)

различных классов, обозначенными треугольниками – Соріа (зеленый), Gypsy (голубой), неохарактеризованные (unknown, желтый) и класс II (красный. (D) Сравнение структуры гомеологичных генов WFZP. Консервативный домен AP2/ERF выделен красным цветом. Светло-серые прямоугольники и треугольники обозначают небольшие делеции И инсерции, соответственно. Серым треугольником обозначена инсерция мобильных элементов в промоторную область гена. Красные и синие вертикальные линии обозначают несинонимичные и соответственно. синонимичные однонуклеотидные полиморфизмы, Красные стрелки обозначают сайты отжига праймеров, использованных для скрининга ВАС-библиотеки. 100 bp – масштаб: 100 п.н. (Dobrovolskaya et al., 2015)

Сравнительный анализ первичной структуры ДНК генов-гомеологов *WFZP* показал, что все кодирующие последовательности гомеологичных генов содержат один экзон, в состав которого входит AP2/ERF домен, консервативный у ортологов *FZP* всех представителей злаков (Рисунок 5.5D, Рисунок 7 Приложения).

Гомология аминокислотных последовательностей AP2/ERF-домена FZP риса, BD1 кукурузы и WFZP-A-B-D пшеницы составила 100% (Рисунок 5.5D, Рисунок 7 и Таблица 7 Приложения). Промоторный район гомеолога генома B, *WFZP-B*, содержал структурные изменения – инсерцию мобильных элементов класса I – MITE (miniature inverted-repeat transposable elements) 278 п.н. и 323 п.н. в позициях – 114 и – 320 п.н. от стартового кодона, соответсвенно (Рисунок 5.5D).

5.3. Изучение особенностей экспрессии гена WFZP

Далее был проведен анализ транскрипционной активности геновгомеологов *WFZP* в разных органах (корень, лист, соцветие) и на различных стадиях развития соцветия пшеницы сорта Чайниз Спринг с использованием количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Анализ проводился с применением специфических праймеров, разработанных ДЛЯ (Таблица последовательностей каждого гена-гомеолога WFZP 6 Приложения). Полученные результаты показали, что гены-гомеологи WFZP

экспрессируются только в соцветии, при этом максимальный уровень экспрессии наблюдается в развивающемся соцветии на ранней стадии дифференцировки органов цветка (Рисунок 5.6) (Dobrovolskaya et al., 2015). Таким образом, для экспрессии генов-гомеологов *WFZP* характерна органоспецифичность и стадиеспецифичность. Был обнаружен различный уровень экспрессии трех гомеологичных копий гена: *WFZP-A*, *WFZP-B* и *WFZP-D* (Рисунок 5.6). Уровень экспрессии гена *WFZP-D* существенно превышал уровни экспрессии *WFZP-A* (в 4 раза) и *WFZP-B* (в 20 раз). Относительный уровень экспрессии гена *WFZP-B* был очень низок, что может быть следствием изменения структуры промотора в результате инсерции мобильных элементов (Рисунок 5.5D).



Рисунок 5.6 – Относительный уровень мРНК гомеологов гена *WFZP* в соцветии, листе и корне пшеницы сорта Чайниз Спринг по результатам количественной ОТ-ПЦР. SD (spikelet differentiation stage) – стадия дифференцировки колоска, EFD1 и EFD2 (early floret differentiation stage 1, 2) – ранняя стадия дифференцировки цветка 1 и 2, соответственно; LFD (late floret differentiation stage) – поздняя стадия дифференцировки цветка. Подробное описание стадий развития соцветия, а также детальное описание условий проведения эксперимента приведены в Главе 2 Материалы и методы (Dobrovolskaya et al., 2015)

5.4. Определение локализации генов *WFZP-A-B-D* в делеционных бинах хромосом 2A, 2B и 2D

На основе установленной первичной структуры ДНК генов *WFZP-A-B-D* сорта Чайниз Спринг были разработаны специфические праймеры (Таблица 6 Приложения) и использованы для амплификации трех гомеологичных копий гена *WFZP*. С применением специфических праймеров на образцах ДНК делеционных линий сорта Чайниз Спринг гены-гомеологи были локализованы в делеционных бинах хромосом второй гомеологической группы (Рисунок 8 Приложения). Локализация генов *Mrs1* и *WFZP* – гена-кандидата на роль *Mrs1*, в делеционном бине 2DS-5 0.47 совпала (Dobrovolskaya et al., 2015).

5.5. Разработка и картирование микросателлитных маркеров к WFZP-локусам мягкой пшеницы

Последовательности ДНК вставок ВАС-клонов CS248B13, CS184F24 и CS305H5, содержащие гомеологичные гены WFZP, послужили основой для идентификации и локализации микросателитных локусов в богатых генами районах хромосом 2AS, 2BS и 2DS. Было обнаружено, что среди динуклеотидных повторов преобладают AG, GA/TC (61,5%) и TA/AT (27%) (Таблица 8 Приложения). Ранее было показано, что те же классы динуклеотидных повторов (AG/CT и AT/TA) являются преобладающими динуклеотидными повторами в геноме риса (Grover et al., 2007), геномах девяти видов злаковых, включая виды T. urartu (донор генома А пшеницы) и Ae. taushii (донор генома D пшеницы) (Wang et al., 2015) и, в целом, характерны для геномов растений (Lagercrantz et al., 1993). Идентифицированные нами динуклеотидные микросателлиты локализованы как в генных локусах, так и в локусах мобильных элементов (transposable elements, TE) ДНК. неаннотированных последовательностях И
Тринуклеотидные микросателлитные повторы встречались реже, чем динуклеотидные, преобладающий мотив/мотивы обнаружены не были. Большая часть тринуклеотидных микросателлитов была представлена короткими SSR-повторами класса II (≤19 п.н.), ассоциированными с ТЕ (Таблица 8 Приложения).

В целом, преобладающая часть обнаруженных нами микросателитных локусов была ассоциирована с ТЕ класса I (ретротранспозоны) И располагалась непосредственно во внутренних районах ТЕ. Нами не было обнаружено ни одной серии гомеологичных микросателлитных локусов, ассоциированных с ТЕ (гомеологичные микросателлитные локусы – микросателлитные локусы одного типа с гомологичными фланкирующими локализованные в последовательностями, гомеологичных хромосомах разных субгеномов пшеницы). Это связано, по-видимому, с тем, что ТЕ являются быстро эволюционирующей фракцией геномов, которая вносит В Высокий основной вклад межвидовую дивергенцию. процент ассоциированных с ретротранспозонами микросателлитных повторов был обнаружен при получении насыщенной микросателлитными ранее повторами геномной библиотеки ячменя (Ramsay et al., 1999).

Тетра- (3 локуса) и пентануклеотидные (1 локус) микросателлиты были обнаружены только в неаннотированных последовательностях ДНК (Таблица 8 Приложения). Из девяти микросателлитов, обнаруженных в генных локусах, пять находились в 5'-некодирующих областях генов, два – в кодирующей области и по одному – в 3'-области и интроне, при этом в кодирующей области локализован тринуклеотидный повтор, в остальных – динуклеотидные микросателлиты. Результаты многих исследований свидетельствуют о том, что различные типы микросателитных локусов неравномерно распределены в геноме растений. Так, было обнаружено, что в кодирующих последовательностях арабидопсис, риса, кукурузы и пшеницы наиболее часто встречаются три- и гексануклеотидные повторы, в то время как некодирующая фракция содержит остальные типы микросателлитов

2002). (Morgante al., Высокую плотность микросателлитов et В последовательностях, примыкающих к стартовому кодону, включая 5'-UTR (5'-untranslated region, 5'-нетранслируемый район), обнаружили у риса, при этом наиболее представленными оказались динуклеотидные микросателлиты (AG)n и (CT)n, в то время как преобладающим динуклеотидом в геноме риса является (AT)n (Grover et al., 2007). Высокая частота микросателлитов в областях, примыкающих к стартовому кодону, может означать ИХ функциональную роль, и микросателлитные маркеры, полученные на основе таких локусов, представляют интерес для разработки функциональных маркеров с целью использования фундаментальных генетических В исследованиях и селекции.

Следует обнаруженные отметить, что нами гомеологичные микросателлитные локусы располагались либо в генах, включая 5'-районы, примыкающие К стартовому кодону, либо В неаннотированных 8 (Таблица Приложения), последовательностях отражает ЧТО консервативность этих областей. Сравнение структуры данных локусов показало, что дивергенция в них связана как с изменением числа повторов, так и с нуклеотидными заменами (Рисунок 5.7). Наличие инсерционноделеционного полиморфизма и однонуклеотидных замен в областях, фланкирующих микросателлитные повторы, позволяет разрабатывать локусспецифичные SSR-маркеры (Таблицы 8 и 9 Приложения).

Temnykh с соавт. (2001) предложили разделить микросателлитные локусы на два класса в зависимости от длины: класс I (≥ 20 п.н.) и класс II (≤ 19 п.н.). Такое разделение на классы отражает потенциал микросателлитов в качестве молекулярных маркеров, так как класс I высоко полиморфен, а Π класс по частоте мутаций не отличается ОТ уникальных 2001). последовательностей ДНК (Temnykh et al., Среди идентифицированных нами микросателлитов 14 локусов принадлежало к классу I (Таблица 8 Приложения), пять из них были ассоциированы с ТЕ (Таблица 8 Приложения) и не подходили для разработки маркеров, так как неконсервативные фланкирующие последовательности не позволяют разрабатывать локус-специфичные SSR-маркеры. Для нескольких локусов класса I, расположенных на границе контигов, было невозможно разработать праймеров. Пары праймеров были разработаны ОДИН ИЗ к семи микросателлитным локусам и протестированы на девяти линиях и сортах мягкой пшеницы. Информация о разработанных маркерах представлена в Таблице 9 Приложения.

		10	20	30	40	50	60	70
				.		.		
2A	CCATTGGGGA	GAAAATGTT	CATCGATCT	TGCTGCCTC	CCATGATG	GTGTGAGTAGI	-CCTTCAGGA	ACCTACGAG
2B	CCAGTGGGGA	GACAATCTT	CATCGAGCT	TGCTGTCT	CCATGGTGAT	GTGTGAGTAGI	TCCTTCAGG	ACCTACGGG
2D	CCATTGGGGA	GACAATCTT	CATCGACCT	TGCTGCCT	CCATGATG	TGTGAGTAG	TCCTTCAGGA	ACCTACGAG
	80	90	100	110	120) 130	140)
				.				
2A	TCCATAGCAG	TAGCTAGAC	GTCTCTCTC	TCTCTCCC	CCCTCTCTCT	[C0	CAATACAATGA	TCTCCTCT
2B	TCCATAGCAG	TAGCTACAT	CTCTCTCTC	CATCTCTC	CTCTCTCTCT	CTCGATCTTC	CAACACAATGA	ATCTCCGCT
2D	TCCATAGCAG	TAGCTAGAC	GTTTCTCTCTC	TCCCTC	TCTCTC1	CTCTCC	CAATACAATG	ATCTCCTCT

Рисунок 5.7 – Структура гомеологичных микросателлитных локусов. Подчеркнуты сайты отжига праймеров микросателлитного маркера *ssrCS184F24-1* (Добровольская и др., 2015)

Полиморфные микросателлитные маркеры были использованы для генотипирования популяции \mathbf{F}_2 (96 индивидуальных растений) ОТ скрещивания сортов мягкой пшеницы Чайниз Спринг и Ренан и построения молекулярно-генетических карт хромосом 2AS, 2BS и 2DS (Рисунок 8 Приложения). Микросателлитный маркер ssrCS305H5-1 к локусу WFZP-D на молекулярно-генетической карте хромосомы 2D ко-локализуется с маркером Xwmc453. Ранее нами было показано, что ген mrs1 на молекулярногенетической карте ко-локализован с тем же маркером, *Xwmc453*. Таким образом, мы показали, что расположение генетических локусов Mrs1 и WFZP-D (ген-кандидат на роль Mrs1) в делеционном бине хромосомы 2D (2DS-5 0.47) и на молекулярно-генетической карте хромосомы 2DS совпадает (Добровольская и др., 2015; Dobrovolskaya et al., 2009, 2015).

Установление структурной организации гена кандидата на роль mrs1 – WFZP-D и генов-гомеологов WFZP-A и WFZP-B, изучение особенностей их экспрессии (транскрипционной активности) и локализации в делеционных бинах молекулярно-генетических картах И на хромосом пшеницы проводилось с использованием генетических (делеционные линии) и (ВАС-библиотека) ресурсов, полученных на геномных основе сорта пшеницы Чайниз Спринг. Колос сорта Чайниз Спринг стандартного типа (Рисунок 3.1 Глава 3), и предполагается, что этот сорт несет аллели геновгомеологов WFZP дикого типа. Дальнейшие исследования с целью установления функциональной роли *WFZP* пшеницы проводились на мягкой генетической многоколосковых модели _ линиях пшеницы независимого происхождения, охарактеризованных нами с применением микроскопии, методов анализа кариотипа молекулярнометодов И генетических подходов (группе линий с однотипными нарушениями морфогенеза I) (Главы 3-4, Добровольская и др., 2014а, 2014б, Dobrovolskaya et al., 2008, 2009, 2015).

5.6. Определение структуры генов-гомеологов *WFZP-A-B-D* у многоколосковых линий мягкой пшеницы и линий со стандартным фенотипом колоса

Специфичные праймеры, разработанные на основе нуклеотидных последовательностей сорта Чайниз Спринг (Таблица 6 Приложения), были использованы для установления первичной структуры ДНК гомеологичных генов *WFZP-A-B-D* у семи многоколосковых линий пшеницы, представляющих различные морфотипы колоса: MRS (NIL-*mrs1*, Ruc163, Ruc167), HS (So164, MC1611), TTSW (Skle128) и GB (Ruc204), а также четырех линий мягкой пшеницы со стандартным фенотипом колоса H67, C29, So149 и Ренан (Рисунок 5.8).

Таким образом, в качестве представителей со стандартным типом колоса были выбраны линии So149 и C29, использованные нами в качестве родителей для картирования mrs1/qSS (картирующие популяции Ruc163 x So149. Ruc204 C29. Skle128 So149, Ruc167 х Х Х C29 И MC1611/C29//MC1611) и, кроме того, пары 'NIL-mrs1 – рекуррентный родитель Н67' и 'индуцированный мутант МС1611 – исходный сорт С29'. Было выполнено секвенирование методом Сэнгера продуктов ПШР. полученных с использованием специфических праймеров на образцах ДНК одиннадцати вышеперечисленных линий пшеницы. Полученные ампликоны перекрывающиеся фрагменты представляли собой генов, включая кодирующий район (CDS) и некодирующие 5'- (около 1000 п.н.) и 3'- (около 1000 п.н.) районы генов.

5.6.1. WFZP-D

Результаты ре-секвенирования гена WFZP-D у многоколосковых линий линий с нормальным колосом показали различия в структурной И организации гена (Рисунок 5.8, Рисунок 9 Приложения). Ген WFZP-D полностью отсутствовал у линий Skle128 и Ruc204, несущих делеции в хромосомах 2DS, и линии So164, у которой хромосома 2D полностью отсутствует замещения (Рисунок 5.8). Результаты вследствие генотипирования, выполненного на образцах ДНК гибридов поколения F₂ от скрещиваний Ruc204 x C29. Skle128 x C29 с использованием специфических праймеров, обнаружили отсутствие продукта амплификации (нуль-аллель) у всех растений этих популяций с SS-фенотипом колоса (Dobrovolskaya et al., 2015).

У трех линий морфотипа MRS, имеющих общее происхождение – Ruc163, Ruc167 и NIL-*mrs1*, обнаружена мутация в GCC-боксе сайта связывания функционального AP2/ERF домена гена *WFZP-D*: несинонимичная замена AAG (Ala) \rightarrow GAG (Pro) (Рисунок 5.8, Рисунок 9

Приложения). Генотипирование десяти других MRS-линий (V3-79-08, V3-82-08, V3-83-08, V3-84-08, V3-85-08, V3-86-08, V3-87-08, V3-88-08, V3-89-08 и V3-90-08) с использованием пары специфических праймеров (Таблица 6 Приложения), разработанных для идентификации этой мутации, показало ее наличие у всех изучаемых нами линий с MRS-фенотипом. Кроме того, было обнаружено, что все растения F_2 от скрещиваний Ruc163 x So149 и Ruc167 x So149 MRS-фенотипа несут мутантный аллель родителя Ruc163 или Ruc167.



C WFZP-D RFLGVRRPWGRYAAEIRDPTTKERHWLGTFDTAQEAALAYDRAALSMKGAQARTNFVY wfzp-D.1 RFLGVRRPWGRYAAKIRDPTTKERHWLGTFDTAQEAALAYDRAALSMKGAQARTNFVY wfzp-D.2 RFLGVRRPWGRYAAEIRDPTTKERHWLGTFDTA*EAALAYDRAALSMKGAQARTNFVY

Рисунок 5.8 – (А) Схематическое изображение генов *WFZP-A* и *WFZP-D* с обозначением обнаруженных мутаций. Домен AP2/ERF обозначен красным прямоугольником. Серым цветом выделены делеции. (В) *WFZP*-гаплотипы многоколосковых линий (SS, supernumerary spikelets), включая MRS (multirow spike), и линий со стандартным фенотипом колоса (NS, normal spike), обозначенных красным (SS) и зеленым (NS) цветом, соответсвенно. weak – слабовыраженный SS-фенотип. Сs – Чайниз Спринг, Rn – Ренан, N67 – Новосибирская 67, S29 – Саратовская 29. (С) Выравнивание аминокислотных последовательностей домена AP2/ERF *WFZP-D* дикого типа и мутантов *wfzp-D.1* и *wfzp-D.2* (Dobrovolskaya et al., 2015)

Обнаруженный аллель был обозначен *wfzp-D.1. wfzp-D.1* был интегрирован в молекулярно-генетические карты хромосом 2D (Рисунок 10 Приложения) (Dobrovolskaya et al., 2015). Локализация *wfzp-D.1*, гена *mrs1* и микросателлитного маркера, разработанного к *WFZP-D* локусу *ssrCS305H5-1*, на молекулярно-генетических картах хромосом 2DS совпадает (Dobrovolskaya et al., 2015, Добровольская и др., 2015).

Показано, что индуцированный мутант MC1611 несет нонсенсмутацию в функциональном домене AP2/ERF гена: GAG (Gln) \rightarrow TAG (stop) (Рисунок 5.8, Рисунок 9 Приложения). Была определена частичная нуклеотидная последовательность гена *wfzp-D* у 96-и беккроссных потомков от скрещивания MC1611/S29//MC1611. Обнаружено, что все растения с SS -фенотипом несут мутантный аллель, который был обозначен *wfzp-D.2*, в то время как остальные растения были гетерозиготами *wfzp-D.2/WFZP-D*. Таким образом, *wfzp-D.2* ассоциирован с SS-фенотипом линии MC1611 (Dobrovolskaya et al., 2015).

Сравнительный анализ генетических карт хромосомы 2D, содержащих гены *WFZP-D* и *mrs1/qSS* (Dobrovolskaya et al., 2008, 2009, 2015), мутация которого вызывает изменения в структуре колоса, показал ко-локализацию данных генов (Рисунок 10 Приложения).

Таким, образом, все изучаемые многоколосковые линии являются либо нуль-мутантами по локусу *wfzp-D*, либо несут мутации в функциональном домене AP2/ERF гена *wfzp-D* (Рисунок 5.8).

5.6.2. WFZP-B

Определение нуклеотидной последовательности гена *WFZP-B* у изучаемых линий пшеницы показало, что независимо от морфологии колоса все они несут одинаковые структурные изменения в промоторном районе гена: инсерцию двух мобильных элементов MITE (miniature inverted-repeat) в позициях -114 п.н. и -320 п.н. от стартового кодона (Dobrovolskaya et al.,

2015). Анализ экспрессии гена показал низкий уровень транскрипции – 5% от уровня транскриптов *WFZP-D* (Рисунок 5.6). Таким образом, ген *WFZP-B* у мягкой пшеницы в большой степени инактивирован, что согласуется с тем фактом, что инсерции мобильных элементов в проморный район гена могут вызывать снижение уровня экспресси гена вплоть до его сайленсинга.

5.6.3. WFZP-A

Анализ нуклеотидных последовательностей гена WFZP-А показал, что у шести из семи изучаемых многоколосковых линий пшеницы (исключение -MC1611) и одной линии с колосом дикого типа (So149) в гене WFZP-A была обнаружена делеция 14 п.н., расположенная в кодирующем районе гена за 40 п.н. до функционального домена AP2/ERF, что вызвало сдвиг рамки считывания (Рисунок 5.8 и Рисунок 9 Приложения). Для идентификации разработана данной делеции была пара праймеров, выявляющих инсерционно-делеционный полиморфизм (Таблица 6 Приложения, Рисунок 5.9) и применена для анализа 48 сортов мягкой пшеницы (Таблица 10 Приложения).



Рисунок 5.9 – Результаты фрагментного анализа, выполненного на образцах ДНК линий NIL-*mrs1* (верхняя часть рисунка) и Новосибирская 67 (нижняя часть рисунка) с использованием маркера, идентифицирующего аллель *wfzp-A.1* (соответствующий фрагмент 194 п.н. отмечен стрелкой) (Разработан автором)

Результаты фрагментного анализа показали, что данную делецию несут 6.3% проанализированных сортов пшеницы со стандартной морфологией колоса (Таблица 10 Приложения). Следовательно, делеция (обозначена как аллель *wfzp-A.1*) распространена среди сортов мягкой пшеницы со стандартным фенотипом колоса и сама по себе не вызывает изменений фенотипа. Вместе с тем, обнаружено, что сочетание аллеля *wfzp-A.1* с мутантными аллелями *wfzp-D.1* или *wfzp-D.null* приводит к выраженным изменениям фенотипа у MRS-линий (Ruc 163, Ruc167 и NIL-*mrs1*), линий, несущих делеции 2D (Ruc204 и Skle128) и замещение хромосомы 2D (So164). Линия MC1611, у которой мутантный аллель *wfzp-D.1* сочетается с аллелем дикого типа *WFZP-A*, отличается от остальных изучаемых многоколосковых линий пшеницы наименее выраженным мутантным фенотипом колоса (Глава 3).

Типы расщепления в скрещиваниях многоколосковых мутантов и линий со стандартным фенотипом колоса соответствуют обнаруженным аллельным комбинациям генов-гомеологов *WFZP-A* и *WFZP-D* (Таблица 11 Приложения). Так, расщепление в гибридной популяции F_2 от скрещивания линии со стандартным фенотипом колоса So149 (*wfzp-A.1 WFZP-D*) и MRS-линиями Ruc163 и Ruc167 (*wfzp-A.1 wfzp-D.1*) было 3 (колос дикого типа) к 1 (колос морфотипа MRS). В отличие от рекуррентного родителя H67 (*WFZP-A WFZP-D*), почти изогенная линия NIL-*mrs1* несла мутантные аллели по локусам *wfzp-A.1* и *wfzp-D.1* (Dobrovolskaya et al., 2015).

Обобщая результаты молекулярно-генетического картирования и анализа нуклеотидных последовательностей, можно заключить, что *WFZP-D* и *Mrs1* являются синонимами (Dobrovolskaya et al., 2015). Таким образом, нами впервые был выделен ген *WFZP* в геноме мягкой пшеницы и показано, что аллели *wfzp-D.1* и *wfzp-D.2* ассоциированы с мутантным многоколосковым фенотипом колоса MRS/SS мягкой пшеницы.

Полученные нуклеотидные последовательности были депонированы в общедоступную базу данных GeneBank. *WFZP-A:* H67 – MH544610, NIL*mrs1* – MH544611; So164 – MH544612, So149 – MH544613, C29 – MH544614, Ruc163 – MH544615, Ruc167 – MH544616, Ruc204 – MH544617, MC1611 – MH544618, Skle128 – MH544619; *WFZP-B:* So164 – MH544620, Ruc204 – MH544621, So149 – MH544622, Ruc163 – MH544623, C29 – MH544624, Ruc167 – MH544625, H67 – MH544626, NIL-*mrs1* – MH544627, MC1611 – MH544628; *WFZP-D:* H67 – MH544629, NIL_*mrs1* – MH544630, Ruc167 – MH544631, Ruc163 – MH544632, So149 – MH544633, C29 – MH544634, MC1611 – MH576978.

5.7. Обсуждение и заключение к Главе 5

Применение молекулярно-генетического методов картирования, основанного на синтении (сходстве организации геномов злаков), и использование детально охарактеризованных генетических моделей (серии генетически независимых многоколосковых мутантов пшеницы разного которая включает пары «почти изогенная линия – происхождения, рекуррентный родитель», «мутант – исходный сорт») позволило впервые выделить ген WFZP, изменения первичной структуры которого приводят к формированию дополнительных колосков на уступах колосового стержня. Было показано, что фенотипы многоколосковых линий, объединенных нами в одну группу с учетом особенностей развития соцветия (Глава 3), обусловлены мутациями WFZP-A-D локусов. Таким образом, результаты молекулярно-генетического анализа подтверждают предположение о едином генетическом контроле признака многоколосковость, сделанное нами на основании данных генетического картирования (Глава 5) (Добровольская и др., 2011, 2014а,б; Добровольская и др., 2017б; Dobrovolskaya et al., 2009, 2015).

Более высокий уровень транскрипции *WFZP-D* по сравнению с *WFZP-A/WFZP-B* согласуется с основным вкладом *Mrs1/qSS-D* локуса в генетический контроль признака многоколосковости мягкой пшеницы (Рисунок 5.10) (Dobrovolskaya et al., 2009, 2015).

Было установлено, что фенотипы линий группы I обусловлены мутациями *wfzp* и далее линии этой группы будут называться *wfzp*-мутантами. Изучение развивающего соцветия мутантов *wfzp* позволило на основе зафиксированных изменений определить основную функциональную роль гена *WFZP* в развитии соцветия пшеницы: генетический контроль установления идентичности цветковых меристем соцветия.



Рисунок 5.10 – Соотношения уровней транскриптов генов-гомеологов *WFZP-A-B-D* (**a**) и вклад локусов *mrs1/qSS-D* в определение признака многоколосковость мягкой пшеницы (**б**) (Разработан автором)

Сравнивая структурную организацию генетических локусов и функции генов-ортологов FZP злаков: FZP риса, BD1 кукурузы и WFZP пшеницы, мы обнаружили высокий уровень консервативности. Так, у мутантов fzp риса наблюдалось формирование эктопических аксиальных меристем И цветков эктопические веточки, замещение на что приводило К повторяющимся циклам ветвления соцветия (Komatsu et al., 2003a). Учитывая особенности мутантного фенотипа, авторы заключили, что функция гена FZP заключается в подавлении развития аксиальных меристем и контроле перехода к установлению идентичности цветковых меристем соцветия. Результаты исследований Rao с соавт. (2008) подтвердили тот факт, что FZP подавляет формирование аксиальных меристем соцветия. Ваі с соавт. (2016) показали, что ген FZP риса играет важную роль в регуляции активности генов идентичности органов цветка – АВСDЕ-генов. Было обнаружено, что FZP контролирует ветвление метелки риса, регулируя активность гена *RFL/ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 2 (APO2)*. Повышение экспрессии FZP существенно подавляло формирование аксиальных меристем соцветия и формирование вторичных веточек метелки риса и оказывало позитивное влияние на экспрессию генов классов В и Е. На основании этого авторы предположили, что FZP может играть важную роль в определении идентичности органов цветка, регулируя активность OsMADS-бокссодержащих генов (Bai et al., 2016). Ген BD1 кукурузы является ортологом гена риса fzp, мутанты bd1 и fzp имеют сходный фенотип колоса и функции генов *BD1* и *FZP* консервативны (Chuck et al., 2002).

Komatsu с соавт. (2003а) показали, что наиболее существенные последствия на фенотип метелки риса оказывали мутации в консервативном домене AP2/ERF гена FZP. Так, замена одной из шести консервативных **GCC**-бокса сайта AP2/ERF аминокислот связывания домена транскрипционого фактора FZP (мутанты fzp-2 и fzp-7) или образование преждевременного терминирующего кодона (мутанты *fzp-1* и *fzp-4*) приводили к наиболее выраженным фенотипическим эффектам (Komatsu et al., 2003a). Мы обнаружили, что у мягкой пшеницы мутация G/A GCC-бокса сайта связывания домена AP2/ERF гена WFZP-D, C/T мутация в домене AP2/ERF этого гена и делеции локуса WFZP-D приводят к формированию дополнительных колосков на уступах колосового стержня. Сочетание мутаций wfzp-D.1 и wfzp-D null с мутацией wfzp-A.1 (сдвиг рамки считывания) гомеологичной копии генома А приводит к выраженным фенотипическим эффектам, а комбинация мутантного аллеля wfzp-D.2 с аллелем дикого типа *WFZP-A* приводила лишь к слабым фенотипическим проявлениям, что также подтверждает обнаруженный нами основной вклад гена *WFZP-D* в контроль изучаемого признака.

Derbyshire и Byrne (2013) получили индуцированный мутант more spikelets1 (mos1) вида В. distachyon с нарушениями в развитии И фенотипическими особенностями морфологии соцветия, сходными С мутантами *bd1* и *fzp*. При определении структурной организации гена, гомологичного FZP, у mos1 мутаций в кодирующем районе гена обнаружено не было. Однако промоторный район гена содержал инсерцию, связанную, как предположили авторы, с небольшим (20%), но статистически значимым уменьшением экспрессии гена. С использованием праймеров к гену WFZP, разработанных в нашем исследовании, был проведен скрининг TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes)-популяции вида В. distachyon, в результате которого были обнаружены два новых аллеля с мутациями в домене AP2/ERF гена-ортолога FZP В. distachyon (мутанты Bd8202 и Bd8972), ассоциированные с мутантным фенотипом – формированием дополнительных колосков в соцветии *B. distachyon* (Dobrovolskaya et al., 2015).

Таким образом, полученные нами результаты показали ключевую роль гена *FZP* (включая *WFZP*) в определении архитектуры колоса злаков и определили функциональную значимость домена AP2/ERF этого гена.

Мягкая пшеница (BBAADD) – природный аллогексаплоид, геном которого произошёл в результате гибридизации трех предков с диплоидными геномами: предок субгенома A - T. *urartu*, субгенома D - Ae. *tauschii*, a произошел от предка наиболее генетически субгеном В близкого современному виду Ae. speltoides (Feldman, 2001; Feldman, Levy, 2005). Мы выделили в геноме мягкой пшеницы копии генов-гомеологов WFZP-A, WFZP-B И WFZP-D. установили ИХ структурную-функциональную организацию и показали, что мутации WFZP-D и WFZP-A/WFZP-D вызывают мутантый SS-фенотип колоса. Мутация гомеологичной копии гена генома А - wfzp-A.1 при наличии аллеля дикого типа WFZP-D не вызывает изменений фенотипа, однако в сочетании с мутациями wfzp-D приводит более выраженным аномалиям строения колоса. На основании сходства паттернов экспрессии генов WFZP-A и WFZP-D и особенностей мутантных фенотипов, мы предположили, что функция генов WFZP-A и WFZP-D сходны, но фенотипические проявления мутаций *wfzp-A* могут маскироваться при нормальном функционировании гена WFZP-D, который вносит больший вклад В определение признака (Dobrovolskaya et al., 2015). Эти предположения были вскоре подтверждены результатами исследований Poursarebani с соавт. (2015), которые выделили ген WFZP-А в геноме тетраплоидной пшеницы T. turgidum (BBAA), в состав которого не входит субгеном D, и показали, что фенотип 30-и ветвистоколосых образцов T. turgidum разного происхождения обусловлен одной и той же мутацией *TtBH-A1* гена WFZP-A.

Таким образом, были получены следующие основные результаты:

1. С учетом синтении хромосом злаков в области расположения локуса Mrs1, сходства изменений в схеме развития соцветий и фенотипических проявлений мутаций mrs1 пшеницы, fzp риса и bd1 кукурузы, ортолог гена FZP пшеницы, обозначенный нами WFZP (Wheat FZP), был выбран в качестве наиболее вероятного гена-кандидата на роль Mrs1.

2. Гомеологичные гены *WFZP-A*, *WFZP-B* и *WFZP-D* были впервые выделены в геноме мягкой пшеницы.

3. Показано, что уровень экспрессии (уровень транскриптов) генов гомеологов *WFZP-A*, *WFZP-B* и *WFZP-D* в геноме мягкой пшеницы не одинаков с преобладанием уровня транскриптов *WFZP-D*, что согласуется с основным вкладом генетического локуса *mrs1/qSS-D* в определение признака многоколосковость мягкой пшеницы.

4. Обнаружено, что мутантные фенотипы многоколосковых линий независимого происхождения ассоциированы с мутациями гена *WFZP- D*, и, таким образом, *Mrs1* и *WFZP-D* являются синонимами.

Глава 6. ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНА *WFZP* ДИПЛОИДНЫХ И ТЕТРАПЛОИДНЫХ ВИДОВ ПШЕНИЦЫ

Анализ структурно-функциональной организации генов-гомеологов *WFZP* мягкой пшеницы показал, что гомеологичные копии субгеномов A и D функционально активны, но при этом их вклад в формирование мутантного фенотипа колоса неодинаков, с преобладанием влияния копии субгенома D (Dobrovolskya et al., 2015). Следующий этап исследований был посвящен изучению роли гена *WFZP* в определении многоколоскового фенотипа у диплоидных (AA) и тетраплоидных (BBAA) видов пшеницы.

6.1. Определение структурной организации гена *WFZP-A* диплоидных видов пшеницы

Учитывая сходство фенотипов и особенностей развития соцветия индуцированного мутанта КТ 3-24 с ветвистым колосом диплоидной пшеницы вида Т. monococcum (AA) и охарактеризованных wfzp-мутантов мягкой пшеницы (Глава 5, Dobrovolskaya et al., 2015), а также принимая во внимание локализацию в коротком плече хромосомы 2A гена *bh^m*, детерминирующего мутантный фенотип колоса линии К 3-24 Т. топососсит (Amagai et al., 2014b), WFZP-A был выбран в качестве гена-кандидата на роль гена *bh^m*. Набор специфических праймеров, разработанных на основе нуклеотидной последовательности гена WFZP-А мягкой пшеницы (Таблица 6 Приложения), был использован нами для основанного на ПЦР выделения WFZP по гомологии в геномах диплоидных видов пшеницы гена Т. monococcum и T. sinskajae. ПЦР с WFZP-A-специфичными праймерами проводили на образцах ДНК мутанта КТ 3-24 Т. топососсит с ветвистым колосом, линии PI 418587 вида T. sinskajae с компактоидным неветвистым колосом (КТ 3-24 и РІ 418587 – родители популяции F₂, на которой проводилось картирование гена bh^m Amagai с соавт. (2014b)). В результате секвенирования ампликонов были получены перекрывающиеся последовательности ДНК гена *WFZP-A^m*, содержащие кодирующий район, 5'-и 3'-районы гена (GeneBank: KT 3-24 *T. monococcum* – MH544635; PI 418587 *T. sinskajae* – MH544636). Обнаружено, что ген *WFZP-A^m* мутантной линии KT 3-24 несет мутацию – несинонимичную замену TGC (Cys) \rightarrow TAC (Thr) в функциональном домене AP2/EFR, консервативной области генов ортологов *FZP* злаков (Рисунок 6.1, Dobrovolskaya et al., 2017).



Рисунок 6.1 – (а) Схематическое изображение гена *WFZP-A^m T. monococcum* с обозначением мутации *wfzp-A.2.* AP2/ERF-домен обозначен прямоугольником красного цвета. WT (wild-type) – дикий тип (б) Частичная карта хромосомы $2A^m$, содержащая микросателлитные маркеры и локусы *wfzp-A.2* и *bh^m* (Dobrovolskaya et al., 2017)

С использованием *WFZP-A*-специфичных праймеров (Таблица 6 Приложения) были получены ампликоны кодирующего района гена

 $WFZP-A^m$ у 94-х растений картирующей популяции F_2 KT 3-24 х PI 418587, с помощью секвенирования методом Сэнгенра определена их первичная структура. Было обнаружено, что все растения с ветвистым колосом несут мутацию гена $WFZP-A^m$. Ген был интегрирован в молекулярно-генетическую карту хромосомы 2A^m, сконструированную Amagai с соавт. (2014b). Было обнаружено, что разработанный нами микросателлитный маркер ssrCS248B13 к локусу WFZP-А (Добровольская и др., 2015) полиморфен между родителями картирующей популяции: КТ 3-24 (аллель 180 п.н.) и РІ 418587 (аллель 178 п.н.). С использованием ssrCS248B13 проведено генотипирование растений картирующей популяции, микросателлитный локус ssrCS248B13 был интегрирован в карту хромосомы $2A^m$ (Amagai et al., 2014b; Dobrovolskaya et al., 2017). Локализация *bh^m*, *WFZP-A^m* и *ssrCS248B13* на молекулярно-генетической карте хромосомы 2А совпадает (Рисунок 6.1б). На основе полученных результатов можно заключить, что bh^m и WFZP-A^m – синонимы (Dobrovolskaya et al., 2017). Мутантный аллель был обозначен wfzp-A.2.

Мутация в консервативном AP2/ERF-домене гена *WFZP-A^m* вызывает изменения в схеме развития соцветия мутанта KT 3-24, сходные с обнаруженными нами у *wfzp*-мутантов мягкой пшеницы (Глава 3, Dobrovolskaya et al., 2015, 2017), что предполагает консервативность функций генов *WFZP* диплоидной пшеницы вида *T. monococcum* и гексаплоидной мягкой пшеницы *T. aestivum*.

6.2. Определение структурной организации гена *WFZP-A* тетраплоидных видов пшеницы

Линия R-107 тетраплоидной пшеницы вида *T. durum*, как и мутант диплоидной пшеницы КТ 3-24, имеет сходный фенотип и особенности развития соцветия с мутантами *wfzp* пшеницы (Глава 3). Ген *bh*, детерминирующий мутантный фенотип линии R-107, был картирован в хромосоме 2AS (Haque et al., 2012). Учитывая фенотипические сходства в проявлении мутаций *bh T. durum*, *bh^m/wfzpA.2 T. monococcum* и *wfzp T. aetstivum*, ген *WFZP-A* был выбран в качестве наиболее вероятного кандидата на роль *bh* и выделен в геномах тетраплоидной пшеницы *T. durum* (линия R-107, LD222 – линия с диким фенотипом колоса) и *T. turgidum* (K-40750 – ветвистоколосый образец) по гомологии с геном *WFZP-A T. aestivum* с использованием набора праймеров к *WFZP-A* (Таблица 6 Приложения), как было описано для K 3-24 *T. monococcum* (см. раздел 6.1). Было обнаружено, что линии тетраплоидных видов пшеницы *T. durum* R-107 и *T. turgidum* K-40750 несут одну и ту же мутацию (несинонимичную замену CTG (Leu) \rightarrow CCG (Pro) в консервативном районе гена – домене AP2/ERF (Рисунок 6.2). GeneBank: R-107 *T. durum* – MH544639; LD222 *T. durum* – MH544637; K-40750 *T. turgidum* – MH544638.



Рисунок 6.2 – (**A**) Колосья линий LD222 стандартного типа (WT- дикий тип), R-107 (морфотип HS-RS (horizontal spikelets) - RS (ramified spike) *T. durum* и ветвистоколосого образца K-40750 *T. turgidum* (Bh^t – ветвистый колос тургидного типа) (**B**) Схематическое изображение гена *WFZP-A* пшеницы с обозначением мутации *wfzp-A/TtBH-A1* (Dobrovolskaya et al., 2017)

Обнаруженная мутация не является новой, и ранее было показано, что данная мутация, *wfzp-A/TtBH-A1*, ассоциирована с ветвистоколосым

фенотипом у тридцати образцов пшеницы *T. turgidum* разного происхождения (Poursarebani et al., 2015).

Был проведен тест на аллелизм: получены гибриды F_1 и F_2 от скрещивания R-107 x K-40750 и проведена оценка их фенотипов. Колосья гибридов F_1 были промежуточного типа, среди гибридов поколения F_2 встречались как ветвистоколосые растения, так и растения с колосом морфотипа HS/FRS (horizontal spikelets/four rowed spike). Все растения F_1 и F_2 представляли многоколосковый фенотип колоса и растения со стандартным фенотипом колоса среди них обнаружены не были. Результаты теста на аллелизм подтвердили данные секвенирования: фенотип колоса у линий R-107 и K-40750 детерминирован аллелем *wfzp-A/TtBH-A1*.

Таким образом, было показано, что фенотип колоса у многоколосковых/ветвистоколосых образцов тетраплоидных видов пшеницы *T. durum* и *T. turgidum* может быть обусловлен одним и тем же мутантным аллелем гена *WFZP-A*: *wfzp-A/TtBH-A1*.

6.3. Изучение структурной организации промоторного района ортологов гена *WFZP-B* тетраплоидных видов пшеницы и *Ae. speltoides*

Мы обнаружили, что у гексаплоидной мягкой пшеницы T. aestivum гомеологичная копия гена WFZP генома В функционально не активна, что вероятнее всего связано с инсерцией мобильных элементов в промоторный район гена (Глава 5, Dobrovolskaya et al., 2015). Для того чтобы выяснить, на каком эволюционном этапе произошли структурные изменения промоторного района гена *WFZP-B* пшеницы, был проведен анализ образцов тетраплоидных видов пшеницы, принадлежащих эволюционной линии Emmer (BBAA) – T. dicoccoides ERGE33769 и ERGE33780, T. durum ERGE33795, T. turgidum ERGE33819 и эволюционной линии Timopheevii (GGA^tA^t) – *T. militinae* TRI 17488, *T. timopheevii* К-38555, а также образца 37 Ae. speltoides (SS) с использованием пары праймеров WFZP 2B F2 и WFZP_2B_R2 к 5'-району гена *WFZP-B* (Таблица 6 и Рисунок 11 Приложения) с последующим секвенированием полученных ампликонов.

Полученные результаты показали, что все изученные образцы тетраплоидных видов пшеницы *T. dicoccoides* (GeneBank: MH536337 (ERGE33769), MH536338 (ERGE33780)), *T. turgidum* (GB: MH536334, MH536335), *T. durum* (GB: MH536336) эволюционной линии Emmer несут структурные изменения в промоторном районе гена *WFZP-B*, аналогичные обнаруженным у мягкой пшеницы. У *Ae. speltoides*, диплоидного вида, геном S которого наиболее генетически близок геномам B и G пшеницы, и видов эволюционной линии Timopheevii они отсутствуют (GeneBank: 37 *Ae. speltoides* – MH550117; K-38555 *T. timopheevii* – MH536339, TRI 17488 *T. militinae* – MH536340). Следовательно, инсерция мобильных элементов произошла в эволюционной линии Emmer.

Косвенное доказательство того, что гомеологичная копия гена WFZP генома В (WFZP-B)функционально не активна, было получено N. Poursarebani с соавт. (2015) при анализе фенотипов растений TILLINGпопуляции *T. turgidum* с мутациями в консервативных районах гена WFZP-B. Авторы обнаружили, что эти мутации не оказывают влияния на фенотип колоса (Poursarebani et al., 2015), в то время как подобные структурные изменения гомеологичной копии генома А (WFZP-A) приводили К формированию ветвистого колоса.

Обобщая полученные нами данные – анализ структурной организации промоторного района генов *WFZP-B/G* видов пшеницы разного уровня плоидности, принадлежащих разным эволюционным линиям, и изучение транскрипционной активности генов-гомеологов *WFZP-A-B-D* мягкой пшеницы, а также результаты Poursarebani с соавт. (2015), можно заключить, что вследствие структурных изменений промоторного района – инсерции мобильных элементов, ген *WFZP-B* представителей эволюционной линии

Emmer потерял свою функциональную активность (Dobrovolskaya et al., 2015; Poursarebani et al., 2015).

С праймеров FZP_F2 (Таблица применением пары FZP R1 6 Приложения), разработанных к консервативным районам гена WFZP, на образцах вида 8 и 37 Ae. speltoides были получены ампликоны, имеющие С инсерционно-делеционный полиморфизм. использованием этой комбинации праймеров, были генотипированы растения картирующей популяции 8 x 37 (Dobrovolskaya et al., 2011) и ген FZP Ae. speltoides был интегрирован в молекулярно-генетическую карту хромосомы 2S (Рисунок 12 Приложения). Обнаружено, что ген локализован в области консервативной синтении с генами WFZP-A-B-D.

6.4. Изучение взаимодействия генов WHEAT FRIZZY PANICLE и SHAM RAMIFICATION 2

Изучение особенностей развития соцветий многоколосковых линий пшеницы показало, что развитие соцветий морфотипа «ложно-истинное ветвление» колоса (f-tR, false-true ramification) линии PI 67339 T. turgidum (группа фенотипов II, Глава 3) и мутантов *wfzp* (группа фенотипов I, Глава 3) имеет общие черты, связанные с нарушением установления идентичности цветковых меристем, сопровождаемого изменением филлотаксиса, что приводит к развитию эктопических колосков на месте цветков (Глава 3, Добровольская и др., 2014a, 2014б; Dobrovolskaya et al., 2015, 2017). f-tRфенотип находится под контролем рецессивного аллеля гена Sham Ramification 2 (SHR2), локализованного в длинном плече хромосомы 2А (Amagai et al., 2014a, 2017), а за формирование многоколоскового фенотипа линий группы I (Глава 3) отвечают мутации генов WFZP, локализованных в 2AS/2DS, с основным вкладом гомеологичной копии субгенома D – WFZP-D (Главы 4-6. Dobrovolskaya al., 2009. 2015. et 2017). Многоколосковые/ветвистоколосые линии тетраплоидной пшеницы R-107

T. durum и K-40750 T. turgidum были отнесены к группе I с учетом особенностей развития соцветия (Глава 3). Мы показали, что фенотип колоса линии R-107 и образца ветвистоколосой пшеницы K-40750 T. turgidum аллелем гена WFZP-A: wfzp-A/TtBH-A1 детерминирован мутантным (Dobrovolskaya et al., 2017). Для изучения возможного взаимодействия генов WFZP и SHR2, мутации которых вызывают сходные изменения в развитии колоска соцветия пшеницы, был применен классический генетический анализ – получены гибриды от скрещиваний PI 67339 (shr2) x R-107 (wfzp-PI 67339 K-40750 A/TtBH-A1) И (shr2)х (*wfzp-A/TtBH-A1*) И проанализированы фенотипы колоса растений гибридов поколений F₁ и F₂.

6.4.1. Гибриды PI 67339 × R-107

Колосья растений гибридов F₁ от скрещивания PI 67339/R-107 были стандартного типа (Рисунок 6.3). В поколении гибридов F₂ наблюдали расщепление на несколько фенотипических классов: (1) стандартный колос, (2) морфотип HS/FRS с сидячими дополнительными колосками на уступах, (3) морфотип RS с истинным ветвлением колоса (класс '1' и класс '2' представляли фенотип родителя R-107), (4) морфотип f-tR «ложно-истинное ветвление» колоса (фенотип родителя PI 67339) и (5) аддитивный фенотип, представляющий собой комбинацию родительских фенотипов, когда на уступе развивается дополнительный колосок под углом к первичному, что характерно для R-107 и wfzp-мутантов в целом, а первичный колосок имеет измененную морфологию, характерную для другого родителя – PI 67339, когда первые два цветка формируются в соответствии со стандартной схемой развития и дают зерновки, а развитие последующих цветков замещается формированием эктопических колосков (Рисунок 6.3). Расщепление в поколении F₂: 40 растений фенотипа родителя R-107 (фенотипические классы ^(2', '3', '5') к 103 растениям остальных классов ('1', '4') соответствовало 1 : 3 $(\chi^2 = 0.67, P > 0.25).$



Рисунок 6.3 – Фенотипы колоса гибридов F_1 и F_2 , полученных от скрещивания линий PI 67339 *T. turgidum (shr2)*, R-107 *T. durum (wfzp-A/TtBH-A1)* и K-40750 *T. turgidum (wfzp-A/TtB)*. **A-D**. Колосья родительских линий (**A**), гибридов F_1 (**B**) и

гибридов F_2 (C-D) от скрещивания PI 67339/K-40750. Е-Н. Колосья родительских линий (E), гибридов F_1 (F) и гибридов F_2 (G, H) от скрещивания PI 67339/R-107. С и D. Колосья гибридов F_2 представляющие различные фенотипические классы: тургидный тип ветвления (*T.t.*- branching), ложно-истинное ветвление (false-true ramification, f-tR), истинное ветвление (ramified spike, RS), горизонтальные колоски (horizontal spikelet, HS), колос стандартного типа (wild type, WT). (D) колос с аддитивным фенотипом (additive phenotype) (слева), с дополнительным колоском на уступе (supernumerary spikelets, SS) (в центре) и колоском f-tR (справа) на одном уступе; gl (glumes) - колосковые чешуи, l (lemma) - нижняя цветковая чешуя, ра (palea) - верхняя цветковая чешуя, звездочками отмечены эктопические колоски (Dobrovolskaya et al., 2017)

Эти результаты подтвердили моногенный рецессивный характер наследования *bh/wfzp-A/TtBH-A1* (Haque et al., 2012; Dobrovolskaya et al., 2017). Расщепление в поколении гибиридов F₂: 22 растения морфотипа f-tR (классы #4 и #5) к 121 растению остальных классов отклонялось от моногенного рецессивного 1 : 3 ($\chi^2 = 7$).

И, наконец, соотношение растений класса '5' (4 растения), представляющих аддитивный фенотип колоса к 139 остальным растениям соответствовало 1:15 ($\chi^2 = 2.7$, P > 0.10) (Таблица 6.1). Полученные результаты показали, что гены *bh1/wfzp-A/TtBH-A1* и *shr2* наследуются независимо и могут принадлежать разным путям генетической регуляции развития соцветия.

6.4.2. Гибриды PI 67339 × К-40750

Несмотря на то, что мутантный аллель *wfzp-A/TtBH-A1* является основным генетическим фактором, определяющим SS-фенотип линий R-107 и K-40750, мы обнаружили неодинаковые результаты скрещиваний PI67339/R-107 и PI67339/K-40750. Гибриды F₁ от скрещивания PI 67339/K-40750 имели фенотип колоса как у родителя PI 67339, но с более выраженными морфологическими изменениями (Рисунок 6.3). В поколении

F₂ наблюдали расщепление на несколько фенотипических классов (Рисунок 6.3, Таблица 6.1).

Таблица 6	.1 – Расщепление в	в популяциях F ₂	от скрещивания	линий	PI67339,
K40750 и R	k-107 (Dobrovolskay	ya et al., 2017)			

Скрещивание	F ₂						
	NS	HS (FRS)	RS	f-tR	HS и	SHR	Всего
	(#1)	(#2)	(#3)	(#4)	f-tR (#5)	(#6)	
PI67339/K40750	26	7	12	103	4	10	162
PI67339/R-107	85	32	4	18	4	-	143

Примечание: Обозначения фенотипов колоса (морфотипов): NS, normal spike (#1) – колос стандартного типа, HS (FRS) (#2) – горизонтальные колоски, RS (#3) – истинное ветвление колоса, f-tR (#4) ложно-истинное ветвление колоса, HS и f-tR (#5) – аддитивный фенотип, SHR (#6) – ложное ветвление колоса

Наряду с фенотипическими классами '1' – '5', описанными выше (см. раздел 6.4.1), обнаружили новый фенотипический класс '6': удлинение оси колоска, на которой развивались цветки (фенотип соответствует ранее описанному морфотипу «ложное ветвление колоса» или «sham ramification» (Amagai et al., 2014a)). Соотношения фенотипических классов отличались от описанных выше для скрещивания PI 67339/R-107 (Таблица 6.1). Признак f-tR в данном скрещивании наследовался как доминантный, соотношение фенотипических классов 107 f-tR к 55 не-f-tR отклонялось от 3:1 (χ^2 = 6.9). Соотношение числа растений с фенотипом ветвистоколосого родителя K-40750 (23) к остальным растениям (129) отклонялось от ожидаемого 1:3 (χ^2 = 10.8). Среди гибридов поколения F₂ этого скрещивания были также обнаружены растения с аддитивным мутантным фенотипом колоса (Таблица 6.1).

Zhang с соавт. (2017) показали, что наряду с геном wfzp-A/TtBH-A1, существуют другие генетические факторы, участвующие в контроле тургидного типа ветвления колоса. Эти факторы определяют развитие колоска с удлиненной колосковой осью (RS, ramified spike) и формирование ветвистого колоса типичного тургидного типа. Фенотипы колоса линий R-107 и K-40750 различаются длиной колосковой оси: у K-40750 она длинная, а у R-107 укороченная. Полученные нами результаты предполагают, что ген *shr2* может взаимодействовать с геном (генами), которые участвуют в развитии удлиненной колосковой оси колоса тургидного типа, и эти гены, которые мы обозначили RS (ramified spike), могут иметь общие функции с геном *shr2*. Наличие растений с аддитивным фенотипом колоса среди гибридов поколения F₂ подтверждает результаты скрещивания PI 67339/ shr2 и wfzp-A/TtBH-A1 независимо R-107 и предполагает, что гены наследуются и, возможно, принадлежат разным генетическим путям, управляющим развитием соцветия.

6.5. Обсуждение и заключение к Главе 6

Изучение многоколоскового индуцированного мутанта диплоидной пшеницы *Т. топососсит* обнаружило, что мутантный фенотип линии – следствие мутации в функциональном домене AP2/ERF гена *WFZP-A* (Dobrovolskaya et al., 2017). Спонтанные мутанты у диплоидных видов пшеницы из литературных источников не известны (Гончаров, 2012). В то же время, ветвистоколосые образцы тетраплоидной пшеницы *T. turgidum* широко распространены и хорошо известны на протяжении долгого периода времени (Дорофеев и др., 1979). Роигsarebani с соавт. (2015) показали, что фенотип 30-и ветвистоколосых образцов *T. turgidum* ассоциирован с одним и тем же мутантным аллелем *TtBH-A1* локуса *WFZP-A* генома A, что предполагает монофилетическое происхождение этого аллеля. Ареал произрастания и экологические характеристики образцов с нормальным

фенотипом колоса *T. turgidum* convar. *turgidum* и ветвистоколосых образцов *T. turgidum* convar. *compositum* (L.f.) Filat. в целом совпадают, единственное исключение – Тибетский экотип, среди образцов которого ветвистоколосые растения обнаружены не были (Дорофеев и др., 1979). Следовательно, мутация *TtBH-A1* произошла на ранних этапах эволюционной истории вида *T. turgidum* и затем распространялась вместе с видом, занимая современные места произрастания, исключением оказался Тибетский экотип, растения которого не несут эту мутацию.

Среди образцов другого тетраплоидного вида пшеницы Т. durum (ВВАА) ветвитоколосые формы встречаются редко (Дорофеев и др., 1979). В 1955 году М.М. Якубцинер обнаружил ветвистоколосые формы пшеницы среди растений двух сортов твердой пшеницы – Акмолинка 5 и Гордееформе 10, обозначенные ramosohordeforme И ramosoapulicum (Дорофеев, 1968). Две оригинальные формы твердой пшеницы с ветвистым колосом, var. ramosohordeforme и var. ramosoapulicum были обнаружены во время экспедиции В.Ф. Дорофеева по Закавказью (1961–1964), где они произрастали в естественной среде обитания в смешанных популяциях пшеницы (T. aestivum, T. durum и T. turgidum) (Дорофеев, 1968). В.Ф. Дорофеев предположил, что ветвистоколосые формы *T. turgidum* могли произойти в результате спонтанной гибридизации между растениями *T. durum* со стандартной формой колоса и ветвистоколосыми формами *T. turgidum* в местах их совместного произрастания (Дорофеев, 1968).

Мы охарактеризовали спонтанный ветвистоколосый мутант R-107, обнаруженный в Дагестане, с использованием методов микроскопии и молекулярной генетики и обнаружили, что за формирование мутантного фенотипа R-107 отвечает аллель *wfzp-A/TtBH-A1*, который вызывает формирование ветвистого колоса тургидного типа у растений *T. turgidum* convar. *compositum* (L.f.) Filat. (Poursarebani et al., 2015; Dobrovolskaya et al., 2017). Полученные нами результаты подтвердили предположение относительно того, что ветвистоколосые формы *T. durum*, обнаруженные в

Закавказье, или любом другом регионе, где *T. turgidum* произрастает совместно с другими видами пшеницы, с которыми возможна его гибридизация, могли возникнуть в результате спонтанной гибридизации. Следует отметить, что фенотип колоса линии R-107 *T. durum* имеет большее сходство с фенотипом FRS (four rowed spike), чем с типичным тургидным типом колоса. Следовательно, генотипическая среда оказывает существенное влияние на фенотипические проявления мутантного аллеля *wfzp-A/TtBH-A1*.

Таким образом, мы охарактеризовали *wfzp*-мутантов линий пшеницы видов разного уровня плоидности (диплоидных, тетраплоидных и гексаплодных видов), на основании чего можно сделать выводы об общих чертах их фенотипов и особенностях развития соцветия, что позволит на основании оценки фенотипов предположить, является ли какая-либо новая, еще не охарактеризованная многоколосковая форма пшеницы, *wfzp*мутантом. Несмотря на то, что среди *wfzp*-мутантов встречаются разные морфотипы (MRS, HS, GB), развитие соцветия всех *wfzp*-мутантов характеризуется следующими общими особенностями:

 развитие эктопических колосков на месте цветков под углом 90° по отношению к первичному колоску или эктопическому колоску предыдущего порядка;

2) формирование редуцированных колосковых чешуй у первичного колоска;

3) замещение цветков базальной части колоска на эктопические колоски.

Различия между отдельными морфотипами *wfzp*-мутантов носят количественный характер (число сверхчисленных колосков на уступе, число уступов со сверхчисленными колосками и длина оси колоска). Как мы обнаружили, у мягкой пшеницы на степень проявление признака под контролем *wfzp* может оказывать влияние наличие мутаций по двум генам-гомеологам *wfzp-A.1 wfzp-D.1* или *wfzp-A.1 wfzp-D null* (Dobrovolskaya et al., 2015). Это делает фенотипические проявления более выраженными –

формируется больше уступов со сверхчисленными колосками и большее число сверхчисленных колосков на уступах, однако на длину колосковой оси оказывают влияние другие генетические факторы. Так, у линии Skle128 (*wfzp-A.1 wfzp-D null*) формировались только сидячие сверхчисленные колоски независимо от условий произрастания, а у линии Ruc204 (*wfzp-A.1 wfzp-D null*) в полевых условиях дополнительные колоски развивались на "веточках" (Dobrovolskaya et al., 2015). Независимо от уровня плоидности, все охарактеризованные *wfzp*-мутанты были фертильны.

В настоящее время мутанты *wfzp* являются наиболее изученными среди многоколосковых форм пшеницы (Добровольская и др., 2014а, 2014б, 2017; Dobrovolskaya et al., 2008, 2009, 2015, 2017; Poursarebani et al., 2015; Zhang et al., 2017), в то время как морфотип «ложно-истинное ветвление» колоса под контролем гена shr2 (sham ramification 2) изучен в меньшей степени (Amagai et al., 2014a, 2017; Dobrovolskaya et al., 2017). С использованием SEM-анализа нами было впервые показано, что развитие соцветия линии PI 67339 морфотипа ложно-истинное ветвление колоса (f-tR) сопровождается следующими нарушениями: развитием эктопических колосков на месте цветков (начиная с третьего цветка) под углом 90° к первичному колоску и развитием эктопического терминального колоска в составе первичного колоска (Dobrovolskaya et al., 2017). Мутантный фенотип подразумевает следующие функции гена shr2: генетический контроль установления идентичности цветковых меристем и детерминированности колосковой меристемы.

Особенности развития эктопических колосков линии PI 67339 и мутантов *wfzp* в целом сходны, различия связаны с судьбой первых двух цветковых меристем, которые у мутантов *wfzp* развиваются как эктопические колосковые, а у мутантов *shr2* всегда развиваются в соответствии со стандартной схемой развития (Dobrovolskaya et al., 2015, 2017). Общие черты в развитии мутантных соцветий могут означать наличие общих функций у генов *WFZP* и *SHR2*, однако выполненный классический генетический анализ

не выявил возможного взаимодействия этих генов и показал, что они действуют независимо и принадлежат различным генетическим путям регуляции развития соцветия (Dobrovolskaya et al., 2017). Вместе с тем, ген shr2 взаимодействует обнаружено, что с другими, ранее не охарактеризованными генами, обозначенными RS (Ramified Spike), действие которых проявляется только в определённый генотипической среде (Dobrovolskaya et al., 2017). Мы полагаем, что гены RS являются теми генетическими факторами, которые определяют развитие колоска с удлиненной осью у ветвистоколосых образцов *T. turgidum* (Zhang et al., 2017), но на настоящий момент об этих генах практически ничего не известно.

Таким образом, были получены следующие основные результаты:

1) Впервые ортолог гена *WFZP* выделен в геномах диплоидных $(A^{m}A^{m})$ видов пшеницы, показано, что за формирование мутантного ветвистоколосого фенотипа индуцированного мутанта KT 3-24 *Т. топососсит* отвечает мутация в домене AP2/ERF гена *WFZP-A^m*;

2) Впервые ортолог гена WFZP-А выделен в геноме тетраплоидной T.durum (BBAA), пшеницы обнаружено, ЧТО многоколосковый/ветвистоколосый фенотип лини R-107 T. durum обусловлен мутацией TtBH-A1, распространенной среди ветвистоколосых форм T. turgidum, что предполагает происхождение этой мутации T. durum в результате спонтанной гибридизации с T. turgidum;

3) Впервые показано, что формирование ложно-ветвистого фенотипа под контролем гена *shr2* вида *T. turgidum* сопряжено с нарушениями в установлении идентичности цветковых меристем в дистальной части колоска и изменением детерминированности колосковых меристем соцветия;

4) Обнаружено, что гены *WFZP* и *SHR2* контролируют установление идентичности цветковых меристем на разных стадиях развития

многоцветкового колоска пшеницы, действуют независимо и принадлежат разным путям генетической регуляции развития соцветия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

особенность Главная соцветия злаков наличие колоска, _ элементарного соцветия, содержащего цветки. Строение колоска и пути его развития, в целом, сходны у разных представителей семейства Злаки, и разнообразие форм соцветий в большей степени определяется паттерном ветвления (Bommert et al., 2005; Malcomber et al., 2006). Вместе с тем, для экономически значимых зерновых культур одним из важных показателей является число зерновок в соцветии, которое у пшеницы зависит от строения и озерненности колоска (Арбузова и др. 2014; Reynolds et al., 2012; Sreenivasulu, Schnurbusch, 2012). Было установлено, что наряду с высоко консервативными путями регуляции развития соцветий злаков, существуют блоки или отдельные гены в ИХ составе, регулирующие развитие специфичных для некоторых таксонов структур соцветия (Tanaka et al., 2013). Строение и развитие колоска пшеницы имеет общие черты с другими злаками, но в отличие от риса, кукурузы и ячменя, колосок пшеницы многоцветковый (Bonnet, 1936). Исследование генетического контроля формирования многоцветкового колоска пшеницы, определение консервативных и специфичных блоков генетических путей регуляции развития имеет как фундаментальное значение, расширяя наши представления о генетических механизмах, лежащих в основе формирования разнообразия форм соцветий растений, так и очевидную практическую значимость.

Важными генетическими ресурсами для идентификации генов, регулирующих развитие цветка и соцветия высших растений, являются мутанты с измененной морфологией цветка и соцветия (Bowman et al., 1989; Goto, Meyerowitz, 1994; Komatsu et al., 2003a; Taguchi-Shiobara et al., 2011; Pourkheirandish, Komatsuda, 2007). В наших исследованиях на основе признаковых коллекций пшеницы были сформированы и охарактеризованы, с применением комплекса методов микроскопии, классической генетики и современных подходов анализа генома растений, коллекции линий пшеницы с изменениями морфогенеза – модели для изучения генетической регуляции морфогенеза соцветия пшеницы. Так, нами впервые детально охарактеризована коллекция мутантов пшеницы с аномалиями в строении колоса, связанными с формированием дополнительных колосков и "веточек" на уступах колосового стержня, а также нарушениями во взаимном расположении колосков и их положения относительно колосовой оси (Добровольская и др., 2011, 2014а, 2014б, 2015, 2017а, 2017б; Dobrovolskaya et al., 2008, 2009, 2015, 2017).

Было показано, что гетерогенную группу многоколосковых форм со сходными изменениями в строении колоса, по совокупности которых линии ранее относили к разным морфологическим типам или морфотипам (Martinek, 1998), можно точно разделить на отдельные группы, учитывая особенности развития, приводящие к формированию колоса с измененной архитектурой (Добровольская дp., 2014a, 2014б, 2017a. 2017б: И Dobrovolskaya et al., 2009, 2015, 2017). Мы предположили, что в основе формирования колоса линий, отнесенных к разным группам с изменениями морфогенеза, лежат нарушения в программе развития под контролем различных генов. Это было подтверждено результатами молекулярногенетического картирования и анализа первичной структуры регулирующих развитие генов (Добровольская и др., 2014а, 2014b, 2017; Dobrovolskaya et al., 2015, 2017; Boden et al., 2015; Dixon et al., 2018).

Охарактеризованные коллекции многоколосковых линий пшеницы, принадлежащих к отдельным группам с однотипными изменениями морфогенеза соцветия, послужили основой для идентификации генов, регулирующих развитие соцветия пшеницы на стадии формирования колоска и определения их роли в развитии соцветия.

Было впервые показано, что замещение хромосомы 2D и делеции в коротком плече 2DS мягкой пшеницы могут оказывать влияние на морфологию колоса, вызывая развитие дополнительных колосков и

214

эктопических "веточек" на уступах колосового стержня. Показано, что наличие делеций хромосомы 2DS может определять до 50% изменчивости изучаемого признака – наличие дополнительных колосков на уступах (Добровольская и др., 2014а; Dobrovolskaya et al., 2015). Появление многоколосковых/ветвистых форм в потомстве от скрещивания мягкой пшеницы с другими видами злаков при отдаленной гибридизации в рамках селекционных программ может служить маркером перестроек хромосом 2-й гомеологичной группы хромосом.

Было впервые показано, что формирование ветвистого колоса и колоса с дополнительными сидячими колосками на уступах колосового стержня пшеницы вызвано однотипными нарушениями развития соцветия пшеницы и находится под контролем генетических локусов хромосом 2DS и 2AS: Mrs1/qSS-D и qSS-A, с основным вкладом генетического локуса хромосомы 2DS (Добровольская и др., 2014а; Dobrovolskaya et al., 2009, 2015, 2017). Это означает, что причиной появления соцветий со сходными изменениями архитектуры, могут быть однотипные отклонения в программах развития под контролем одних и тех же генетических факторов (главных генов). При этом фенотипические проявления таких признаков будут варьировать В зависимости от влияния генотипической среды на действие главных генов, ключевых регуляторов развития.

Было впервые обнаружено, формирования что В основе многоколосковых и ветвистоколосых форм пшеницы разного уровня плоидности (диплоидных, тетраплоидных и гексаплоидных видов пшеницы) WFZP (Wheat FRIZZY PANICLE) мутации генов-гомеологов лежат (Dobrovolskaya et al., 2015, 2017). Анализируя первичную структуру WFZP у мутантов и линий со стандартной морфологией колоса, мы показали ключевую роль гена FZP (включая WFZP) в определении архитектуры колоса функциональную значимость домена AP2/ERF злаков И ЭТОГО гена (Dobrovolskaya et al., 2015, 2017).

На основе анализа фенотипов *wfzp*-мутантов была установлена основная функция генов-гомеологов *WFZP* пшеницы в развивающемся соцветии, которая заключается в генетическом контроле установления идентичности цветковых меристем, и эта функция консервативна у всех представителей злаков (Chuck et al., 2002; Komatsu et al., 2003a; Derbyshire, Byrne, 2013; Dobrovlskaya et al., 2015). Таким образом, было показано, что в развитии многоцветкового колоска пшеницы и одноцветковых колосков других злаков (риса, кукурузы, ячменя и др.) участвуют генетические факторы, функции которых консервативны, в частности, это ортологи гена *FZP*.

Было обнаружено, что вклад гомеологичных копий гена WFZP-A (qSS-A, TtBH-A1), WFZP-D (mrs1/qSS-D) и WFZP-B в генетическом контроле признака «многоколосковость» мягкой пшеницы не одинаков, что может быть связано со структурными изменениями регуляторных участков генов (Dobrovolskaya et al., 2015). Так, в промоторном районе гена WFZP-В MITE, обнаружена инсерция мобильных элементов которая предположительно привела к сайленсингу гена и потере им функций. Инсерция произошла В процессе эволюции при формировании тетраплоидного генома в эволюционный линии Emmer (Dobrovolskaya et al., 2015). Обнаружено, что различный уровень экспрессии генов-гомеологов (уровень транскриптов генов) полиплоидного генома мягкой пшеницы может приводить к неодинаковому вкладу отдельных гомеологичных копий генов в фенотип растения, и результаты однотипных мутаций в таких генах будут иметь разную степень фенотипического проявления (Dobrovolskaya et al., 2015). В целом, обнаруженный нами феномен отражает процесс коадаптации субгеномов в составе единого аллополиплоидного генома в процессе эволюции. Интересно отметить, что наиболее функционально активная копия гена – WFZP-D принадлежит субгеному D, который считают доминирующим в геноме мягкой пшеницы (Pont, Salse, 2017).

216
Таким образом, полученные нами результаты продемонстрировали, что изменения структурной организации геномов растений в процессе аллополиплоидизации и дальнейшей ко-эволюции в составе единого генома могут приводить к преобладающей функциональной роли отдельных генов-гомеологов в определении фенотипических признаков, в частности, признаков колоса пшеницы.

Ветвистоколосые формы тетраплоидной пшеницы *T. turgidum* (BBAA) широко распространены и известны уже около 2000 лет (Дорофеев и др., 1979). Недавно было обнаружено, что формирование ветвистого колоса является следствием мутации в функциональном домене AP2/ERF гена *WFZP-A* (аллель *TtBH-A1*) (Poursarebani et al., 2015; Dobrovolskaya et al., 2017). В наших исследованиях было показано, что ветвистоколосые формы тетраплодной пшеницы *T. durum*, которые для этого вида не характерны и встречаются редко, могли возникнуть в результате спонтанной гибридизации с ветвистоколосыми растениями вида *T. turgidum* при их совместном произрастании (Dobrovolskaya et al., 2017).

Результаты наших исследований, выполненных на многоколосковых линиях аллогексаплоидной мягкой пшеницы (BBAADD), показали, что проявление мутации гена *WFZP-A* подавляется при наличии аллеля дикого типа *WFZP-D* (Dobrovolskaya et al., 2015). Следовательно, перенос признака ветвистоколосости от тетраплоидной пшеницы *T. turgidum* в гексаплодиную пшеницу *T. aestivum* затруднен, так как аллель *TtBH-A1* не проявляется при наличии аллеля дикого типа *WFZP-D* (около 93%) сортов мягкой пшеницы (Dobrovolskaya et al., 2015).

Наши исследования впервые показали, что в формировании многоцветкового колоска пшеницы на стадии закладки и дифференцировки цветковых меристем его дистальной части принимает участие ген *Sham Ramification 2 (SHR2).* Мутация *shr2* вызывает нарушение установления идентичности цветковых меристем и изменение детерминированности

колосковой меристемы, в результате чего наблюдается развитие эктопических колосков на месте цветков и формование терминированного колоска пшеницы (Dobrovolskaya et al., 2017).

Впервые было обнаружено, что гены WFZP и SHR2 контролируют установление идентичности цветковых меристем на разных стадиях развития многоцветкового колоска пшеницы, действуют независимо и, вероятно, принадлежат разным путям генетической регуляции развития соцветия (Dobrovolskaya et al., 2015; Dobrovolskaya et al., 2017). Следует отметить, что функции ортологов FZP, контролирующих установление идентичности цветковых меристем на начальной стадии развития колоска пшеницы, консервативны у злаков и с одноцветковыми колосками (например, у риса (Poursarebani et al., (Komatsu et al., 2003а), ячменя 2015)), и с многоцветковыми колосками (например, у B. distachyon (Derbyshire, Byrne, 2013), пшеницы (Добровольская и др., 20146; Dobrovolskaya et al., 2015, 2017)). Что касается гена SHR2, участвующего в регуляции установления идентичности цветковых меристем на более поздних стадиях развития колоска пшеницы (Dobrovolskaya et al., 2015), мы не обнаружили в литературных источниках информации о генах риса, кукурузы или ячменя, мутации которых вызывают сходные изменения в развитии одноцветковых колосков и имеют сходные фенотипические проявления. Возможно, наряду с консервативными модулями генетической регуляции, к одному из которых принадлежит ген WFZP, существуют отдельные специфичные модули или гены, регулирующие развитие многоцветкового колоска, К которым принадлежит SHR2.

Нами были обнаружены новые генетические факторы, обозначенные RS (ramified spike), вовлеченные в генетический контроль развития колоска (Dobrovolskaya al., Показано, пшеницы et 2017). что ЭТИ гены SHR2, взаимодействуют С HO на настоящий момент характер ИХ наследования, локализация в геноме пшеницы и структурно-функциональная (Dobrovolskaya et al., 2017). организация не известны Дальнейшие

218

исследования структурной организации гена SHR2, которая на настоящий момент не установлена, и изучение RS уточнит их роль и генетические механизмы регуляции развития соцветия, в частности, в определении идентичности и детерминированности колосковых и цветковых меристем пшеницы.

Показано, что формирование колоса со спиральным расположением колосков на колосовой оси у линий морфотипа SCR (screwed spike rachis) не сопряжено с изменениями идентичности или детерминированности меристем на ранних этапах развития соцветия, что обычно сопровождается сменой филлотаксиса (Bartlett, Thompson, 2014), а является следствием особенностей роста клеток колосового стержня на более поздних этапах роста соцветия (Добровольская и др., 2017). Таким образом, спиральное расположение соцветии злаков может быть обусловлено колосков В не только особенностями взаимного расположения колосковых меристем соцветия относительно (типом филлотаксиса соцветия), оси соцветия но И особенностями роста клеток.

В ходе выполнения исследований были разработаны новые молекулярные ДНК маркеры – COS, SSR, которые могут быть использованы в проектах по молекулярно-генетическому картированию генов и локусов количественных признаков пшеницы (COS, SSR) и злаков (COS), в целом, оценки характеристик новых перспективных линий и форм пшеницы (SSR), изучению организации геномов сородичей пшеницы (COS, SSR), с применением ранее предложенных нами (Добровольская и др., 2009; Арбузова и др., 2012; 2014; Dobrovolskaya et al., 2005, 2006, 2007, 2009, 2011, 2015; Tikhenko et al., 2010) и новых стратегий.

Полученные результаты, в целом, являются основой для дальнейших исследований, направленных на понимание роли генов, управляющих развитием соцветия злаков, изучению их взаимодействия, установлению генных сетей и определению возможных генов-мишеней направленного воздействия на программы развития растений с целью получения новых перспективных линий и форм злаков с улучшенными качествами, в частности, с высокой урожайностью.

Предложенный комплексный подход изучения морфогенеза соцветия пшеницы, основанный на применении методов световой и электронной микроскопии, современных методов анализа генома растений на генетических моделях: коллекциях линий пшеницы С однотипными изменениями морфогенеза соцветия разного происхождения диплоидных, тетраплоидных и гексаплоидных видов, будет востребован для изучения морфогенеза соцветия растений co сложными аллополиплоидными геномами.

В целом, полученные результаты внесли существенный вклад в понимание молекулярно-генетических механизмов, управляющих развитием соцветия пшеницы на стадии формирования колоска. Стратегия, разработанная в настоящем исследовании, учитывающая синтению и особенности сложной организации аллополиплоидных геномов злаков будет использована для изучения генетических механизмов, лежащих в основе формирования различных фенотипических признаков пшеницы и других растений.

выводы

- Создана и охарактеризована коллекция линий пшеницы с нарушениями морфогенеза соцветия. В результате изучения линий коллекции впервые выявлены изменения в схеме развития соцветия пшеницы, приводящие к появлению нестандартных морфологических типов колоса – многоколосковых фенотипов. Установлено, что в основе формирования многоколосковых фенотипов пшеницы лежат изменения ранних этапов развития соцветия:
 - (а) нарушения установления идентичности цветковых меристем, сопровождающиеся сменой филлотаксиса, которые приводят К формированию укороченной эктопических колосков на (V многоколосковых форм с сидячими колосками) или удлиненной (у ветвистоколосых форм) оси колоска со сменой филлотаксиса;
 - (б) нарушения установления идентичности цветковых меристем дистальной части колоска со сменой филлотаксиса и изменением детерминированности колосковой меристемы, которые приводят к формированию зерновок в базальной части и эктопических колосков в дистальной части колоска;
 - (в) развитие дополнительных колосков на уступах колосового стержня вне первичных колосков без смены филлотаксиса.

На основе линий коллекции выделены модели для исследований генетической регуляции отдельных этапов морфогенеза соцветия пшеницы.

2. Впервые показано, что формирование колоса со спиральным порядком расположения колосков на колосковой оси у линий морфотипа SCR (screwed spike rachis) не сопряжено с изменениями идентичности или детерминированности меристем на ранних этапах развития соцветия, а является следствием особенностей роста клеток колосового стержня на

221

более поздних этапах роста соцветия и находится под моногенным доминантым контролем.

3. Разработана и применена стратегия исследования генетической регуляции морфогенеза соцветия пшеницы, основанная на использовании выделенных и охарактеризованных генетических моделей, линий разного происхождения диплоидных, тетраплоидных и гексаплоидных видов с однотипными нарушениями морфогенеза пшеницы соцветия, И применении комплекса современных методов анализа генома растений: молекулярно-генетического картирования, анализа кариотипов, позиционного клонирования. С применением данной стратегии:

а) впервые установлено, что замещение хромосомы 2D и делеции в коротком плече хромосомы 2D мягкой пшеницы могут оказывать влияние на морфологию колоса, вызывая развитие дополнительных колосков и эктопических «веточек» на уступах колосового стержня;

б) впервые показано, что формирование ветвистого колоса и колоса с дополнительными сидячими колосками на уступах колосового стержня пшеницы вызвано однотипными нарушениями развития соцветия пшеницы и находится под контролем генетических локусов хромосом 2DS (Mrs1/qSS-D) и 2AS (qSS-A), с основным вкладом генетического локуса хромосомы 2DS;

в) впервые определено положение гена *monstrosum 1 (mo1)*, детерминирующего многоколосковый фенотип ржи посевной *S. cereale* L., на молекулярно-генетической микросателлитной карте хромосомы 2RS.

 Впервые в геноме мягкой пшеницы выделены ключевые регуляторы развития соцветия злаков – гены-гомеологи Wheat FRIZZY PANICLE (WFZP-A, WFZP-B и WFZP-D) и определена структурно-функциональная организация содержащих их локусов.

а) Впервые установлено, что мутации в функциональном домене AP2/ERF генов *WFZP-D* и *WFZP-A* приводят к формированию

222

многоколосковых/ветвистоколосых фенотипов видов пшеницы разного уровня плоидности *T. aestivum* (BBAADD), *T. durum* (BBAA) и *T. monococcum* (AA).

б) Впервые установлено, что основная функция гена *WFZP* пшеницы в развивающемся соцветии заключается в генетическом контроле установления идентичности цветковых меристем. Сходство мутантных фенотипов линий диплоидных, тетраплоидных и гексаплоидных видов пшеницы означает консервативность функций гена *WFZP* в пределах рода *Triticum* L.

в) Впервые показано, что установление идентичности цветковых меристем базальной и дистальной частей многоцветкового колоска пшеницы находятся под контролем генов *WFZP* и *SHAM RAMIFICATION 2*, действующих независимо на разных этапах развития колоска. Выдвинута гипотеза о том, что установление идентичности флоральных меристем базальной и дистальной частей многоцветкового колоска пшеницы находятся под управлением разных генетических путей регуляции развития.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ВЦвЧ верхняя цветковая чешуя
- дНТФ дезоксинуклеотидтрифосфаты
- Зав завязь с рыльцевыми ветвями
- КАМ апикальная меристема корня
- КМ колосковая меристема
- КЧ колосковая чешуя
- Ло –лодикулы
- МС меристема соцветия
- м.п.н. миллион пар нуклеотидов
- Н67 сорт Саратовская 29 T. aestivum
- НК ножка колоска
- НКЧ нижняя колосковая чешуя
- НЦвЧ нижняя цветковая чешуя
- ОБП ось бокового побега, несущего цветок
- ОК ось колоска
- ОТ обратная транскрипция
- ОЦ организующий центр центральной зоны апикальной меристемы
- п.н. пар нуклеотидов
- ПАМ апикальная меристема побега
- ПОЦв примордии органов цветка
- ПЦР полимеразная цепная реакция
- С29 сорт Саратовская 29 Т. aestivum
- сМ сантиморган
- ТБЕ трис-боратный буфер
- ТЕ трис-ЭДТА буфер
- ТК терминальный колосок
- ТФ транскрипционный фактор
- Тч тычинки

ФМ – флоральная меристема

ЦЧ – цветковая чешуя

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВАС – искусственная бактериальная хромосома (bacterial artificial chromosome)

COS – сет консервативных ортологов (Conserved Ortholog Set)

CS – сорт Чайниз Спринг T. aestivum

es – эктопический колосок (ectopic spikelet)

es2nd – вторичный эктопический колосок (second ectopic spikelet)

EST – экспрессирующиеся последовательности ДНК (expressed sequence tags)

ets – эктопический терминальный колосок (ectopic terminal spikelet)

f-цветок (floret)

F₁ – гибрид первого поколения

 F_2 , F_3 – второе, третье поколения от самоопыления F_1

Fm – флоральная меристема (floral meristem)

FRS – четырехрядный колос (Four rowed spike)

f-tRS – ложно-истинное ветвление (false-true ramification или false-true ramified spike)

GB – истинное ветвление (genuine branching)

GISH – геномная in situ гибридизация

gl – колосковая чешуя (glume)

gr – зерновка (grain)

HS – горизонтальные колоски (horizontal spikelets)

im – меристема соцветия (inflorescence meristem)

1 – нижняя цветковая чешуя (lemma)

LF – менее фракционированные или консервативные районы генома (less fractionated)

lo – лодикулы (lodicules)

MF – более фракционированные, пластичные районы генома (more fractionated)

MRS – многорядный колос (multirow spike)

NIL – почти изогенная линия (near isogenic line)

ра – верхняя цветковая чешуя (palea)

pi – пестик (pistil)

QTL – локусы количественных признаков (quantitative trait loci)

SCR – скрученный колосовой стержень (screwed spike rachis)

SDS – додецил сульфат натрия

SHR – ложная ветвистость (sham ramification)

sm – меристема колоска (spikelet meristem)

SNP – однонуклеотидный полиморфизм (Single Nucleotide Polymorphism)

SS – сверхчисленные колоски (supernumerary spikelets)

SSCP – полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК (Single Strand Conformation Polymorphism)

SSR – простые повторяющиеся последовательности (Simple Sequence Repeats)

st – тычинка (stamen)

ts – терминальный колосок (terminal spikelet)

tsm- меристема терминального колоска (terminal spikelet meristem)

VVS – вертикальные колоски (vertical sessile spikelets)

ws – колосок дикого типа, развивающийся по стандартной схеме (wild-type spikelet)

WT– дикий тип (wild type)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алиева, А.Дж. Влияние генома D пшеницы на проявление признака нового типа ветвистоколосости в гибридных популяциях линии 171ACS / А.Дж. Алиева, Н.Х. Аминов // Генетика. – 2013. – Т. 49, № 11. – С. 1284–1291.
- Антропов. В.И. Культурная флора СССР. Хлебные злаки. Рожь, ячмень, овес. /. В.И. Антропов, В.Ф. Антропов, А.И. Мордвинкина, А.А. Орлов; ред. Е.В. Вульф. – М.–Л.: Гос. изд. совхозной и колхозной литературы, 1986. – Т. 2. – 442 с.
- Арбузова, В.С. Цитогенетическое изучение голубозерной линии мягкой пшеницы сорта Саратовская 29 / В.С. Арбузова, Е.Д., Бадаева Т.Т. Ефремова, Т.С. Осадчая, Н.В. Трубачеева, О.Б. Добровольская // Генетика. – 2012. – Т. 48. – С. 926.
- Арбузова, В.С. Изменчивость признаков продуктивности колоса у гибридов F2, полученных от скрещивания сортов мягкой пшеницы Новосибирская 67, Саратовская 29, Рига-4 с многоцветковой линией Skle 123-9 / В.С. Арбузова, Т.Т. Ефремова, П. Мартинек, Е.В. Чуманова, О.Б. Добровольская // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 18. С. 704–712.
- Батыгина, Т.Б. Хлебное зерно (Атлас) / Т.Б. Батыгина // Л.: Наука, 1987. – 104 с.
- Батыгина, Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни / Т.Б.
 Батыгина. Санкт-Петербург: Из-во ДЕАН, 2014. 764 с.
- Вавилов, Н.И. Центры происхождения культурных растений / Н.И. Вавилов. – Л.: Тип. им. Гутенберга, 1926. – 248 с.
- Гончаров, Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей / Н.П. Гончаров. – Новосибирск: ООО «Академическое изд-во «Гео», 2012. – 523 с.

- Добровольская, О.Б. Синтения хромосом генома А двух эволюционных линий пшеницы / О.Б. Добровольская, П. Сурдий, М. Бернард, Е.А. Салина // Генетика. – 2009. – Т. 45. – С. 1548–1555.
- Добровольская, О.Б. Молекулярно-генетическое и физическое картирование генов, вовлеченных в контроль развития соцветия мягкой пшеницы и близкородственных видов / О.Б. Добровольская // Живая наука. 2011. № 2. С. 10–11.
- Добровольская, О.Б. Влияние перестроек хромосом 2-й гомеологической группы на морфологию колоса мягкой пшеницы / О.Б. Добровольская, П. Мартинек, И.Г. Адонина, Е.Д. Бадаева, Ю.Л. Орлов, Е.А. Салина, Л.И. Лайкова // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014а. Т. 18. № 4/1. С. 672–680.
- Добровольская, О.Б. Изучение морфогенеза соцветия и выявление особенностей наследования признака "многоколосковость" у мутантной линии мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / О.Б. Добровольская, Е.Д. Бадаева, И.Г. Адонина, О.М. Попова, А.А. Красников, Л.И. Лайкова // Онтогенез. – 20146. – Т. 45. – С. 434–414.
- Добровольская, О.Б. Разработка новых SSR-маркеров к локусам гомеологичных генов WFZP на основе изучения строения и локализации микросателлитов в богатых генами районах хромосом 2AS, 2BS, 2DS мягкой пшеницы / О.Б. Добровольская, К. Понт, Ю.Л. Орлов, Ж. Сальс // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015. Т. 19. № 3. С. 303-309.
- Добровольская, О.Б. Изучение ранних этапов развития колоса со спиральным расположением колосков линий мягкой пшеницы *T. aestivum* L. нестандартного морфотипа SCR / О.Б. Добровольская, А.А. Красников, К.И. Попова, П. Мартинек, Н. Ватанабе // Вавиловский журнал генетики и селекциию. – 2017а. – Т. 21, № 2. – С. 222–226.
- 15. Добровольская, О.Б. Ранние этапы развития соцветия пшеницы: изучение генетического контроля и физиологии / О.Б. Добровольская,

Е.Д. Бадаева, К.И. Попова, А.А. Красников, П. Мартинек // ActaNaturae. – 20176 – Т. 9, спецвыпуск 1. – С. 59.

- Дорофеев, В.Ф. Спонтанные мутации как фактор формообразования пшеницы / В.Ф. Дорофеев // Вестник с.-х. науки. – 1968. – Т. 7. – С. 16– 26.
- Дорофеев, В.Ф. Культурная флора СССР. Пшеница / В.Ф. Дорофеев, А.А. Филатенко, Э.Ф. Мигушева, Р.А. Удачин, М.М. Якубцинер; ред. тома В.Ф. Дорофеев, О.Н. Коровина. – Л: Колос, Ленинградское отделение, 1979. – Т. 1. – 348 с.
- Жегалов, С.И. Введение в селекцию сельскохозяйственных растений / С.И. Жегалов. – М.–Л.: Гос. издат. – 1930. – С. 363–369.
- Куперман, Ф.М. Морфофизиология растений / Ф.М. Куперман Москва: Издательство «Высшая школа», 1968. – 224 с.
- 20. Лайкова, Л.И. Изучение ветвистости колоса у мутантных линий мягкой пшеницы сорта Саратовская 29 / Л.И. Лайкова, В.С. Арбузова, О.М. Попова и др. // Актуальные задачи селекции и семеноводства сельскохозяйственных растений на современном этапе: Доклады и сообщения IX генетико-селекционной школы. – Новосибирск, 2005. – С. 388–393.
- Лутова, Л.А. Генетика развития растений / Л.А. Лутова, Т.А. Ежова,
 И.Е. Додуева, М.А Осипова. С–Петербург: Издательство Н-Л, 2010. –
 432 с.
- Мельник, В.М. Изучение аллельных взаимоотношений у индуцированных мутантов яровой пшеницы / В.М. Мельник, В.Ф. Козловская, Г.П. Пастухов, В.В. Хвостова // Актуальные вопросы генетики и селекции растений: Тез. докл. сиб. регион. конф.; отв. ред. В.К. Шумный, И.П. Калинина. – Новосибирск, 1980. – С. 313.
- 23. Мельник, В.М. Генетические исследования индуцированных мутантов яровой пшеницы / В.М. Мельник, Г.П. Пастухов // Химический

мутагенез в повышении продуктивности сельскохозяйственных растений. – М.: Наука, 1984. – 270 с.

- 24. Нечас, Й. Наследование ветвистости колоса ржи, сопровождаемой умножением цветков и частей цветков / Й. Нечас // Biologia plantarum. 1961. Т. 1. № 1. С. 65–74.
- Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. Минск: Вышейшая школа, 1973. – 318 с.
- Смирнов, В.Г. Генетика ржи / В.Г. Смирнов, С.П. Соснихина. Л.: Издательство Ленинградского университета, 1984. – 264 с.
- Цвелев, Н.Н. Злаки СССР / Н.Н. Цвелев; отв. ред. А. А. Федоров. Л.: Наука, 1976. – 788 с.
- 28. Цицин, Н.В. Ветвистая озимая рожь / Н.В. Цицин // Отдаленная гибридизация. М.: Сельхозгиз, 1954. С. 313–322.
- 29. Abrouk, M. Palaeogenomics of plants: synteny-based modelling of extinct ancestors / M. Abrouk, F. Murat, C. Pont, J. Messing, S. Jackson, T. Faraut, E. Tannier, C. Plomion, R. Cooke, C. Feuillet, J. Salse // Trends Plant Sci. 2010. V. 15. P. 479–487.
- Aliyeva, A.J. Inheritance of the branching in hybrid populations among tetraploid wheat species and the new branched spike line 166-Schakheli / A.J. Aliyeva, N.K. Aminov // Genet. Res. Crop Evol. – 2011. – V. 58. – P. 621–628.
- 31. Altschul, S.F. Basic local alignment search tool / S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman // Journal of Molecular Biology. 1990. V. 215, N. 3. P. 403–410.
- 32. Amagai, Y. Microsatellite mapping of the genes for sham ramification and extra glume in spikelets of tetraploid wheat / Y. Amagai, A.J. Aliyeva, N.Kh. Aminov, P. Martinek, N. Watanabe, T. Kuboyama // Genet Resour Crop Evol. – 2014a. – V. 61. – P. 491–498.

- Amagai, Y. Microsatellite mapping of genes for branched spike and soft glumes in *Triticum monococcum* L. / Y. Amagai, P. Martinek, N. Watanabe, T. Kuboyama // Genet Resour Crop Evol. 2014b. V. 61. P. 465–471.
- 34. Amagai, Y. The third glume phenotype is associated with rachilla branching in the spikes of tetraploid wheat (*Triticum* L.) / Y. Amagai, S. Gowayed, P. Martinek, N. Watanabe // Genet Resour Crop Evol. 2017. V. 64. P. 835–842.
- Arcade, A. BioMercator: integrating genetic maps and QTL towards discovery of candidate genes / A. Arcade, A. Labourdette, M. Falque, B. Mangin, F. Chardon, A. Charcosset, J. Joets // Bioinformatics. – 2004. – V. 20, N. 14. – P. 2324–2326.
- Badaeva, E.D. Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* (Poaceae) / E.D. Badaeva, N.S. Badaev, B.S. Gill et al. // Plant Syst. Evol. – 1994. – V. 192. – P. 117–145.
- Badaeva, E.D. Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution / E.D. Badaeva, O.S. Dedkova, V.A. Pukhalskyi et al. // Genome. – 2007. – V. 50. – P. 907–926.
- Bartlett, M.E. Meristem identity and phyllotaxis in inflorescence development / M.E. Bartlett, B. Thompson // Frontiers in Plant Science. – 2014. – V. 5. – Article 508. DOI: 10.3389/fpls.2014.00508.
- 39. Beales, J. A Pseudo-response regulator is missexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) / J. Beales, A. Turner, S. Griffiths, J.W. Snape, D.A. Laurie // Theor Appl Genet. 2007. V. 115. P. 721–733.
- Bell, C.D. The age of the angiosperms: a molecular timescale without a clock / C.D. Bell, D.E. Soltis, P.S. Soltis // Evolution. 2005. V. 59. P. 1245–1258.
- 41. Benito, C. A map of rye chromosome 2R using isozyme and morphological markers / C. Benito, C. Zaragoza, F.J. Gallego, A. De la Pena, A.M. Figueiras // Theor Appl Genet. -1991. V. 82. P. 112-116.

- Boden, S.A. *Ppd-1* is a key regulator of inflorescence architecture and paired spikelet development in wheat / S.A. Boden, C. Cavanagh, B.R. Cullis, K. Ramm, J. Greenwood et al. // Nature Plants. 2015. V. 1. Article 14016. DOI: 10.1038/nplants.2014.16.
- 43. Bomblies, K. Duplicate *FLORICAULA/LEAFY* homologs *zfl1* and *zfl2* control inflorescence architecture and flower patterning in maize / K. Bomblies, R.-L. Wang, B.A. Ambrose, R.J. Schmidt, R.B. Meeley, J. Doebley // Development. 2003. V. 130. P. 2385–2395.
- 44. Bommert, P. Genetics and evolution of inflorescence and flower development in grasses / P. Bommert, N. Satoh-Nagasawa, D. Jackson, H.Y. Hirano //Plant Cell Physiol. 2005. V. 46(1). P. 69–78.
- 45. Bommert, P. Quantitative variation in maize kernel row number is controlled by the *fasciated ear2* locus / P. Bommert, N.S. Nagasawa, D. Jackson // Nat. Genet. – 2013. – V. 45. – P. 334–337.
- 46. Bommert, P. Grass inflorescence architecture and meristem determinacy / P. Bommert, C. Whipple // Seminars in Cell & Developmental Biology. 2017. Режим доступа: https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.004.
- 47. Bonnet, O.T. The development of the wheat spike / O.T. Bonnet // J Agr Res. - 1936. - V. 53. - P. 445-451.
- 48. Bortiri, E. *Ramosa2* encodes a LATERAL ORGAN BOUNDARY domain protein that determines the fate of stem cells in branch meristems of maize / E. Bortiri, G. Chuck, E. Vollbrecht, T. Rocheford, R. Martienssen, S. Hake // Plant Cell. 2006. V. 18. P. 574–585.
- 49. Bowman, J.L. Genes directing flower development in Arabidopsis / J.L.
 Bowman, D.R. Smyth, E.M. Meyerowitz // Plant Cell. 1989. V. 1. P. 37–52.
- Brenchley, R. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing / R. Brenchley, M. Spannagl, M. Pfeifer, G.L. Barker, R. D'Amore et al. // Nature. 2012. V. 491(7426). P. 705-710.

- Brown, R.H. A Ds insertional mutant of a barley miR172 generesults in indeterminate spikelet development / R.H. Brown, P. Bregitzer // Crop Sci. 2011. – V. 51. – P. 1664–1672.
- Castiglioni, P. An AFLP-based procedure for the efficient mapping of mutations and DNA probes in barley / P. Castiglioni, C. Pozzi, M. Heun, V. Terzi, K.J. Muller, W. Rohde, F. Salamini // Genetics. – 1998. – V. 149. – P. 2039–2056.
- 53. Castro, A.M. Mapping antixenosis genes on chromosome 6A of wheat to greenbug and to a new biotype of Russian wheat aphid / A.M. Castro, A. Vasicek, M. Manifiesto, D.O. Gimenez, M.S. Tacaliti, O. Dobrovolskaya et al. // Plant Breed. 2005. V. 124. P. 229–233.
- 54. Castro, A.M. Mapping quantitative trait loci for growth responses to exogenously applied stress induced hormones in wheat / A. M. Castro, M. S. Tacaliti, D. Gimenez, E. Tocho, O. Dobrovolskaya et al. // Euphytica. 2008. V. 164. P. 719–727.
- Chen, Z.J. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids / Z.J. Chen, Z. Ni // BioEssays. – 2006. – V. 28. – P. 240–252.
- 56. Cheng, F. Biased gene fractionation and dominant gene expression among the subgenomes of *Brassica rapa* / F. Cheng, J. Wu, L. Fang, S. Sun, B. Liu, K. Lin et al. // PLoS One. 2012. V. 7. Article e36442. DOI: 10.1371/journal.pone.0036442.
- 57. Cheng, F. Deciphering the diploid ancestral genome of the Mesohexaploid Brassica rapa / F. Cheng, T. Manda'kova', J. Wu, Q. Xie, M.A. Lysak, X. Wang // Plant Cell. – 2013. – V. 25. – P. 1541–1554.
- 58. Cheng, F. Genome triplication drove the diversification of *Brassica* plants / F. Cheng, J. Wu, X. Wang // Hortic Res. 2014. V. 1. Article 14024.
 Режим доступа: https://www.nature.com/articles/hortres201424.
- 59. Cheng, F. Epigenetic regulation of subgenome dominance following whole genome triplication in *Brassica rapa* / F. Cheng, C. Sun, J. Wu, J. Schnable,

M.R. Woodhouse, J. Liang, C. Cai, M. Freeling, X. Wang // New Phytol. – 2016a. – V. 211. – P. 288–299.

- Cheng, F. Subgenome parallel selection is associated with morphotype diversification and convergent crop domestication in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea* / F. Cheng, R. Sun, X. Hou, H. Zheng, F. Zhang, Y. Zhang, B. Liu et al. // Nat Genet. 2016b. V. 48. P. 1218–1224.
- 61. Chu, H. The *floral organ number4* gene encoding a putative ortholog of Arabidopsis *CLAVATA3* regulates apical meristem size in rice / H. Chu, Q. Qian, W. Liang, C. Yin, H. Tan, X. Yao, Z. Yuan, J. Yang, H. Huang, D. Luo et al. // Plant Physiol. 2006. V. 142. P. 1039–1052.
- Chuck, G. The control of maize spikelet meristem fate by the APETALA2like gene indeterminate spikelet1 / G. Chuck, R.B. Meeley, S. Hake // Genes Dev. – 1998. – V. 12. – P. 1145–1154.
- Chuck, G. The control of spikelet meristem identity by the *branched* silkless1 gene in maize / G. Chuck, M. Muszynski, E. Kellogg, S. Hake, R.J. Schmidt // Science. 2002. V. 298. P. 1238–1241.
- 64. Chuck, G. The maize *tasselseed4* microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting *Tasselseed6/indeterminate spikelet1* / G. Chuck, R. Meeley, E. Irish, H. Sakai, S. Hake // Nat. Genet. 2007. V. 39. P. 1517–1521.
- 65. Chuck, G. Floral meristem initiation and meristem cell fate are regulated by the maize AP2 genes *ids1* and *sid1* / G. Chuck, R. Meeley, S. Hake // Development. – 2008. – V. 135. – P. 3013–3019.
- Clark, L.G. The grass subfamilies Anomochloöideae and Pharoideae (Poaceae) / L.G. Clark, E.J. Judziewicz // Taxon. 1996. V. 45. P. 641–645.
- 67. Clark, S.E. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis/ S.E. Clark, R.W. Williams, E.M. Meyerowitz // Cell. 1997. V. 89. P. 575–585.

- Coffman, F.A. Supernumerary spikelets in Mindum wheat / F.A. Coffman // J Hered. – 1924. – V. 5. – P. 187–192.
- Cuadrado, A. Evolutionary trends of different repetitive DNA sequences during speciation in the genus secale / A. Cuadrado, N. Jouve // J Hered. – 2002. – V. 93. – P. 339–345.
- Dahlgren, B.E. Wheat / B.E. Dahlgren // Chicago: Field Museum of Natural History, 1922.
- De Vries, J.N. Chromosomal location of 17 monogenically inherited morphological markers in rye (*Secale cereale* L.) using the translocation tester set / J.N. De Vries, J. Sybenga // Z Pflanzenzücht. – 1984. – V. 92. – P. 117–139.
- Debernardi, J.D. MicroRNA172 plays a crucial role in wheat spike morphogenesis and grain threshability / J.D. Debernardi, H. Lin, G. Chuck, J.D. Faris, J. Dubcovsky // Development. – 2017. – V. 144. – P. 1966–1975.
- 73. Derbyshire, P. *MORE SPIKELETS1* is required for spikelet fate in the inflorescence of Brachypodium distachyon / P. Derbyshire, M.E. Byrne // Plant Physiol. 2013. V. 161. P. 1291–1302.
- 74. Devos, K.M. Comparative RFLP maps of the homoeologous group-2 chromosomes of wheat, rye and barley / K.M. Devos, T. Millan, M.D. Gale // Theor Appl Genet. 1993. V. 85. P. 784–792.
- 75. Dibari, B. Deciphering the genomic structure, function and evolution of carotenogenesis related phytoene synthases in grasses / B. Dibari, F. Murat, A. Chosson, V. Gautier, C. Poncet, P. Lecomte, I. Mercier, H. Bergès, C. Pont, A. Blanco, J. Salse // BMC Genomics. 2012. V. 13. Article 221. Режим доступа: https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-221.
- 76. Ditta, G. The SEP4 gene of Arabidopsis thaliana functions in floral organ and meristem identity / G. Ditta, A. Pinyopich, P. Robles, S. Pelaz, M.F. Yanofsky // Curr Biol. 2004. V. 14. P. 1935–1940.
- 77. Dixon, L.E. *TEOSINTE BRANCHED1* Regulates Inflorescence Architecture and Development in Bread Wheat (*Triticum aestivum*) / L.E. Dixon, J.R.

Greenwood, S. Bencivenga, P. Zhang, J. Cockram, G. Mellers, K. Ramm, C. Cavanagh, S.M. Swain, S.A. Boden // Plant Cell. – 2018. – V. 30, N. 3. – P. 563–581.

- Dobrovolskaya, O. Rationalising germplasm collections a case study for wheat / O. Dobrovolskaya, U. Saleh, L. Malysheva-Otto, M.S. Roder, A. Borner // Theor. Appl. Genet. – 2005. – V. 111. – P. 1322–1329.
- 79. Dobrovolskaya, O. Microsatellite mapping of complementary genes for purple grain colour in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / O. Dobrovolskaya, V.S. Arbuzova, U. Lohwasser, M.S. Röder, A. Borner // Euphytica. 2006. V. 150. P. 355–364.
- Bobrovolskaya, O. Molecular mapping of genes determining hairy leaf character in common wheat with respect to other species of the Triticeae / O. Dobrovolskaya, T.A. Pshenichnikova, V.S. Arbuzova, U. Lohwasser, M.S. Röder, A. Borner // Euphytica. 2007. V. 155. P. 285–293.
- 81. Dobrovolskaya, O. Microsatellite mapping of a mutant gene (*mrs*) for multirow spike in wheat (T. aestivum) / O. Dobrovolskaya, P. Martinek, M.S. Röder, A. Börner // Proc. Intern. Conference "Conventional and molecular breeding of field and vegetable crops." Novi Sad, Serbia, 2008. P. 133–136.
- Dobrovolskaya, O. Microsatellite mapping of genes that determine supernumerary spikelets in wheat (*T. aestivum*) and rye (*S. cereale*) / O. Dobrovolskaya, P. Martinek, A.V. Voylokov, V. Korzun, M.S. Röder, A. Boerner // Theor Appl Genet. 2009. V. 119. P. 867–874.
- Bobrovolskaya, O. Microsatellite mapping of *Ae. speltoides* and map-based comparative analysis of the S, G, and B genomes of Triticeae species / O. Dobrovolskaya, C. Boeuf, J. Salse, C. Pont, P. Sourdille et al. // Theor. Appl. Genet. 2011. V. 123 P. 1145–1157.
- Bobrovolskaya, O. FRIZZY PANICLE drives supernumerary spikelets in bread wheat (*T. aestivum* L.) / O. Dobrovolskaya, C. Pont, R. Sibout, P. Martinek, E. Badaeva et al. // Plant Physiol. 2015. V 167. P. 189–199.

- Bobrovolskaya, O.B. Genes WHEAT FRIZZY PANICLE and SHAM RAMIFICATION 2 independently regulate differentiation of floral meristems in wheat / O.B. Dobrovolskaya, Y. Amagai, K.I. Popova, A.E. Dresvyannikova, P. Martinek, A.A. Krasnikov, N. Watanabe // BMC Plant Biology. – 2017. – V. 17, Suppl. 2. – Article 252. DOI: 10.1186/s12870-017-1191-3.
- Dvorak, J. Genome analysis in the *Triticum-Aegilops* alliance / J. Dvorak // Proc. 9th Intern. Wheat Genetics Symposium; ed. Slinkard AE. – Saskatoon, Saskatchewan, Canada: University of Saskatchewan, University Extension Press, 1998. – P. 8–11.
- 87. Echeverry-Solarte, M. Genome-Wide Genetic Dissection of Supernumerary Spikelet and Related Traits in Common Wheat / M. Echeverry-Solarte, A. Kumar, S. Kianian, E.E. Mantovani, S. Simsek et al. // Plant Gen. 2014. V. 7. P. 1–16.
- Edger, P.P. Gene and genome duplications: the impact of dosage-sensitivity on the fate of nuclear genes / P.P. Edger, J.C. Pires // Chromosome Res. – 2009. – V. 17. – P. 699–717.
- El Baidouri, M. Reconciling the evolutionary origin of bread wheat (*Triticum aestivum*) / M. El Baidouri, F. Murat, M. Veyssiere et al. // New Phytologist. – 2017. – V. 213. – P. 1477–1486.
- 90. Erayman, M. Demarcating gene-rich regions of the wheat genome / M. Erayman, D. Sandhu, D. Sidhu, M. Dilbirligi, P.S. Baenziger, K.S. Gill // Nucleic Acids. 2004. V. 32. P. 3546–3565.
- 91. Fang, L. The impact of genome triplication on tandem gene evolution in *Brassica rapa* / L. Fang, F. Cheng, J. Wu, X. Wang // Front Plant Sci. 2012. V. 3. Article 261. Режим доступа: https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00261.
- 92. Faris, J.D. Genomic targeting and high-resolution mapping of the domestication gene Q in wheat / J.D. Faris, B.S. Gill // Genome. 2002. V. 45. P. 706–718.

- 93. Faris, J.D. A bacterial artificial chromosome contig spanning the major domestication locus *Q* in wheat and identification of a candidate gene / J.D. Faris, J.P. Fellers, S.A. Brooks, B.S. Gill // Genetics. 2003. V. 164. P. 311–321.
- 94. Feldman, M. Wheats / M. Feldman, F.G.H. Lupton, T.E. Miller // Evolution of Crop Plants; eds. J. Smartt, N.W. Simmonds – London: Longman Scientific& Technical, 1995. – P. 184–192.
- 95. Feldman, M. The origin of cultivated wheat / M Feldman // The Wheat Book; eds. A. Bonjean, W. Angus – Paris: Lavoisier, 2001. – P. 1–56.
- 96. Feldman, M. Allopolyploidy A shaping force in the evolution of wheat genomes / M. Feldman, A.A. Levy // Cytogenet Genome Res. – 2005. – V. 109. – P. 250–258.
- 97. Feng, N. Transcriptome Profiling of Wheat Inflorescence Development from Spikelet Initiation to Floral Patterning Identified Stage-Specific Regulatory Gene / N. Feng, G. Song, J. Guan, K. Chen, M. Jia, D. Huang, J. Wu, L. Zhang, X. Kong, S. Geng, J. Liu, A. Li, L. Mao // Plant Physiol. 2017. V. 174(3). P. 1779–1794.
- 98. Flavell, R.B. The evolution of plant genome structure / R.B. Flavell, J. Rimpau, D.B. Smith, M. O'Dell, J. Bedbrook // Genome Organization and Expression in Plants. NATO Advanced Study Institutes Series (Series A: Life Sciences); ed. C.J. Leaver Boston, MA: Springer, 1979. V. 29. P. 35–47.
- 99. Fujimoto, S.Y. Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression / S.Y. Fujimoto, M. Ohta, A. Usui, H. Shinshi, M. Ohme-Takagi // Plant Cell. – 2000. – V. 12. – P. 393–404.
- 100. Gallavotti, A. The role of *barren stalk1* in the architecture of maize / A. Gallavotti, Q. Zhao, J. Kyozuka, R..B. Meeley, M.K. Ritter, J.F. Doebley, M.E. Pè, R.J. Schmidt // Nature. 2004. V. 432. P. 630–635.

- 101. Ganal, M.W. Microsatellite and SNP markers in wheat breeding / M.W. Ganal, M.S. Röder // Genomics-Assisted Crop Improvement; eds. R.K. Varshney, R. Tuberosa. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2007. V. 2. P. 1–24.
- 102. Gao, X. The SEPALLATA-like gene OsMADS34 is required for rice inflorescence and spikelet development / X. Gao, W. Liang, C. Yin, S. Ji, H. Wang, X. Su, C. Guo, H. Kong, H. Xue, D. Zhang // Plant Physiol. – 2010. – V. 153. – P. 728–740.
- Gaut, B.S. DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize / B.S. Gaut, J.F. Doebley // Proc. Natl. Acad. Sci. – USA, 1997. – V. 94. – P. 6809–6814.
- 104. Gaut, B.S. Patterns of chromosomal duplication in maize and their implications for comparative maps of the grasses / B.S. Gaut // Genome Res. - 2001. - V. 11. - P. 55-66.
- 105. Gill, B.S. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and aberrations in wheat (*Triticum aestivum*) / B.S. Gill, B. Friebe, T.R. Endo // Genome. 1991. V. 34. P. 830–839.
- 106. Goff, S.A. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L.ssp. japonica) / S.A. Goff et al. // Science. 2002. V. 296. P. 92–100.
- 107. Goto, K. Function and regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene *PISTILLATA* / K. Goto, E.M. Meyerowitz // Genes Dev. – 1994. – V. 8. – P. 1548–1560.
- 108. Greenwood, J.R. New alleles of the wheat domestication gene Q reveal multiple roles in growth and reproductive development / J.R. Greenwood, E.J. Finnegan, N. Watanabe, B. Trevaskis, S.M. Swain // Development. – 2017. – V. 144. – P. 1959–1965.
- 109. Grover, A. Biased distribution of microsatellite motifs in the rice genome /
 A. Grover, V. Aishwarya, P.C. Sharma // Mol. Gen. and Genom. 2007. –
 V. 277. P. 469–480.

- 110. Gupta, P.K. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat / P.K. Gupta, H.S. Balyan, K.J. Edwards et al. // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 105. P. 413–422.
- 111. Guyomarc'h, H. Characterisation of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat / H. Guyomarc'h, P. Sourdille, J. Edwards, M. Bernard // Theor and Appl Genet. 2002. V. 104. P. 1164–1172.
- 112. Hama, E. Pistillody is caused by alterations to the clas s-MADS-box gene expression pattern in alloplasmic wheats / E. Hama, S. Takumi, Y. Ogihara, K. Murai // Planta. 2004. V. 218. P. 712–20.
- 113. Haque, M.A. Microsatellite mapping of genes for semi-dwarfism and branched spike in *Triticum durum* Desf. var. *ramosoobscurum* Jakubz. "Vetvistokoloskaya" / M.A. Haque, P. Martinek, S. Kobayashi, I. Kita, K. Ohwaku, N. Watanabe, T. Kuboyama // Genet Resour Crop Evol. 2012. V. 59. P. 831–837.
- 114. Heslop-Harrison, J.S. Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes / J.S. Heslop-Harrison, T.Schmidt // Trends Plant Sci. 1998. V. 3. P. 195–199.
- 115. Huang, S. Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat / S. Huang, A. Sirikhachornkit, X. Su, J. Faris, B. Gill et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. – USA, 2002. – V. 99. – P. 8133–8138.
- 116. Ikeda, K. Aberrant panicle organization 1 temporally regulates meristem identity in rice / K. Ikeda, N. Nagasawa, Y. Nagato // Dev. Biol. 2005. V. 282. P. 349–360.
- 117. Ikeda, K. Rice Aberrant Panicle Organization 1, encoding an F-box protein, regulates meristem fate / K. Ikeda, M. Ito, N. Nagasawa, J. Kyozuka, Y. Nagato // Plant J. 2007. V. 51. P. 1030–1040.

- 118. Ikeda-Kawakatsu, K. Aberrant Panicle Organization 2/RFL, the rice ortholog of Arabidopsis LEAFY, suppresses the transition from inflorescence meristem to floral meristem through interaction with APO1 / K. Ikeda-Kawakatsu, M. Maekawa, T. Izawa, J. Itoh, Y. Nagato // Plant J. – 2012. – V. 69. – P. 168–180.
- International Rice Genome Sequencing Project. The map-based sequence of the rice genome / International Rice Genome Sequencing Project // Nature. – 2005. – V. 436(7052). – P. 793–800.
- 120. Jack, T. Molecular and genetic mechanisms of floral control / T. Jack // Plant Cell. – 2004. – V. 16. – P. S1–S17.
- 121. Je, B.I. Signaling from maize organ primordia via *FASCIATED EAR3* regulates stem cell proliferation and yield traits / B.I. Je, J. Gruel, Y.K. Lee, P. Bommert, E.D. Arevalo, A.L. Eveland, Q. Wu, A. Goldshmidt, R. Meeley, M. Bartlett, M. Komatsu, H. Sakai, H. Jonsson, D. Jackson // Nat. Genet. 2016. V. 48. P. 785–791.
- 122. Jiang, L. Characterization of the rice floral organ number mutant *fon3* / L. Jiang, Q. Qian, L. Mao, Q.Y. Zhou, W.X. Zhai // J Integr Plant Biol. 2005. V. 47. P. 100–106.
- 123. Katkout, M. QTL analysis of genetic loci affecting domestication-related spike characters in common wheat / M. Katkout, M. Kishii, K. Kawaura, K. Mishina, S. Sakuma et al. // Genes and Genet. Syst. – 2014. – V. 89. – P. 121-131.
- 124. Kellogg, E.A. Early inflorescence development in the grasses (Poaceae) / E.A. Kellogg, P.E. Camara, P.J. Rudall, P. Ladd, S.T. Malcomber, C.J. Whipple, N.A. Doust // Front Plant Sci. 2013. V. 4. Article 250. Режим доступа: https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00250.
- 125. Khlestkina, E.K. Mapping of 99 new microsatellite-derived loci in rye (*Secale cereale* L.) including 39 expressed sequence tags / E.K. Khlestkina, M.H.M. Than, E.G. Pestsova, M.S. Röder, S.V. Malyshev, V. Korzun, A. Börner // Theor Appl Genet. – 2004. –V. 109. – P. 725–732.

- 126. Kim, C. Molecular cloning and characterization of *OsLRK1* encoding a putative receptor-like protein kinase from Oryza sativa / C. Kim, D.H. Jeong, G. An // Plant Sci. – 2000. – V. 152. – P. 17–26.
- 127. Klindworth, D.L. Inheritance of supernumerary spikelets in a tetraploid wheat cross / D.L. Klindworth, N.D. Williams, L.R. Joppa // Genome. – 1990a. – V. 33. –P. 509–514.
- 128. Klindworth, D.L. Chromosomal location of genes for supernumerary spikelets in tetraploid wheat / D.L. Klindworth, N.D. Williams, L.R. Joppa // Genome. – 1990b. – V. 33. – P. 515–520.
- 129. Klindworth, D.L. Telosomic mapping of four genetic markers in durum wheat / D.L. Klindworth, M.M. Klindworth, N.D. Williams // J Hered. – 1997. – V. 88. – P. 229–232.
- 130. Kobayashi, K. Inflorescence meristem identity in rice is specified by overlapping functions of three AP1/FUL-like MADS box genesand PAP2, a SEPALLATA MADS box gene / K. Kobayashi, N. Yasuno, Y. Sato, M. Yoda, R. Yamazaki, M. Kimizu, H. Yoshida, Y. Nagamura, J. Kyozuka // Plant Cell. – 2012. – V. 24. – P. 1848–1859.
- 131. Komatsu, M. The LAX1 and FRIZZY PANICLE 2 genes determine the inflorescence architecture of rice by controlling rachis-branch and spikelet development / Komatsu M., Maekawa M., Shimamoto K., Kyozuka J. // Dev Biol. – 2001. – V. 231. – P. 364–373.
- 132. Komatsu, M. FRIZZY PANICLE is required to prevent the formation of axillary meristems and to establish floral meristem identity in rice spikelets / M. Komatsu, A. Chujo, Y. Nagato, K. Shimamoto, J. Kyozuka // Development. 2003a. V. 130. P. 3841–3850.
- 133. Komatsu, K. LAX and SPA: major regulators of shoot branching in rice / K. Komatsu, M. Maekawa, S. Ujiie, Y. Satake, I. Furutani, H. Okamoto, K. Shimamoto, J. Kyozuka // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003b. V. 100. P. 11765–11770.

- 134. Koppolu, R. *Six-rowed spike4* (*Vrs4*) controls spikelet determinacy and row-type in barley. / R. Koppolu, N. Anwar, S. Sakuma, A. Tagiri, U. Lundqvist, M. Pourkheirandish, T. Rutten, C. Seiler, A. Himmelbach, R. Ariyadasa, H.M. Youssef, N. Stein, N. Sreenivasulu, T. Komatsuda, T. Schnurbusch // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013. V. 110. P. 13198–13203.
- 135. Koric, S. Branching genes in *Triticum aestivum* / S. Koric // Proc. 4th Intern.
 Wheat Genetics Symposium; eds. E.R. Sears, L.M.S. Sears. Columbia, MO, USA, 1973. – P. 283–288.
- 136. Koric, S. Study of branched gene complex of *T. aestivum* ssp. *vulgare* and its significance for wheat breeding / S. Koric // J Sci Agric Res. – 1980. – V. 142. – P. 271–282.
- 137. Korzun, V. A genetic map of rye (*Secale cereale* L.) combining RFLP, isozyme, protein, microsatellite and gene loci / V. Korzun, S. Malyshev, A. Voylokov, A. Börner // Theor Appl Genet. 2001. V. 102. P. 709–717.
- 138. Kato, K. QTL mapping of genes controlling ear emergence time and plant height on chromosome 5A of wheat / K. Kato, H. Miura, S. Sawada // Theor Appl Genet. – 1999. – V. 98. – P. 472–476.
- 139. Kato, K. Dwarfing effect associated with the threshability gene Q on wheat chromosome 5A / K. Kato, R. Sonokawa, H. Miura, S. Sawada // Plant Breed. – 2003. – V. 122. – P. 489–492.
- 140. Kosambi, D. The estimation of map distances from recombination values /
 D. Kosambi // Ann Eugen. 1944. V. 12. P. 172–175.
- 141. Košner, J. Chromozomalní poměry pšenice obecné (*Triticum aestivum* L.) s větevnatým klasem / J. Košner, J. Foltýn // Sbor ÚVTIZ, Genet Šlecht. 1989. V. 25, N. 1. P. 11–17.
- 142. Kosuge, K. New sources of compact spike morphology determined by the genes on chromosome 5A in hexaploid wheat / K. Kosuge, N. Watanabe, V.M. Melnik, L.I. Laikova, N.P. Goncharov // Genet. Resour. Crop Evol. 2012. V.59. P.1115–1124.

- 143. Kubis, S.E. Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes / S.E. Kubis, T. Schmidt, J.S. Heslop-Harrison // Ann. Bot. 1998. V. 82S. P. 45–55.
- 144. Kyozuka, J. Down-regulation of *RFL*, the *FLO/LFY* homolog of rice, accompanied with panicle branch initiation / J. Kyozuka, S. Konishi, K. Nemoto, T. Izawa, K. Shimamoto // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – V. 95. – P. 1979–1982.
- 145. Lagercrantz, U. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates / U. Lagercrantz, H. Ellegren, L. Andersson // Nucleic Acids Res. – 1993. – V. 21. – P. 1111–1115.
- 146. 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.
- 147. Laudencia-Chingcuanco, D. The indeterminate floral apex1 gene regulates meristem determinacy and identity in the maize inflorescence / D. Laudencia-Chingcuanco, S. Hake // Development. 2002. –V. 129 P. 2629–2638.
- 148. Lee, D.Y. The rice heterochronic gene SUPERNUMERARY BRACT regulates the transition from spikelet meristem to floral meristem / D.Y. Lee, J. Lee, S. Moon, S.Y. Park, G. An // Plant J. – 2007. – V. 49. – P. 64–78.
- 149. Lee, D.Y. Two AP2 family genes, supernumerary bract (SNB) and Osindeterminate spikelet 1 (OsIDS1), synergistically control inflorescence architecture and floral meristem establishment in rice / D.Y. Lee, G. An // Plant J. – 2012. – V. 69. – 445–461.
- Levy, A.A. The impact of polyploidy on grass genome evolution / A.A.
 Levy, M. Feldman // Plant Physiol. 2002. V. 130. P. 1587–1593.
- 151. Li, X. Control of tillering in rice / X. Li, Q. Qian, Z. Fu, Y. Wang, G. Xiong,
 D. Zeng, X. Wang, X. Liu, S. Teng, F. Hiroshi et al. // Nature. 2003. –V.
 422. P. 618–621.

- 152. Li, Y.C. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution / Y.C. Li, A.B. Korol, T. Fahima, E. Neno // Mol. Biol. Evol. 2004. V. 21. P. 991–1007.
- 153. Li, J. SSR Mapping for locus conferring on the triple spikelet trait of the Tibetan triple-spikelet wheat (*Triticum aestivum* L. concv. tripletum) / J. Li, Q. Wang, H. Wei, X. Hu, W. Yang // Triticeae Genomics Genet. 2011. –V. 2. P. 1–6.
- 154. Li, L.F. A re-evaluation of the homoploid hybrid origin of *Aegilops tauschii*, the donor of the wheat D-subgenome / L.F. Li, B. Liu, K.M. Olsen, J.F. Wendel // New Phytologist. – 2015a. – V. 208. – P. 4–8.
- 155. Li, L.F. Multiple rounds of ancient and recent hybridizations have occurred within the Aegilops–Triticum complex / L.F. Li, B. Liu, K.M. Olsen, J.F. Wendel // New Phytologist. – 2015b. – V. 208. – P. 11–12.
- Ma, X.F. Allopolyploidization-accommodated genomic sequence changes in Triticale / X.F. Ma, J.P. Gustafson // Ann. Bot. – 2008. – V. 101. – P. 825– 832.
- 157. MacKey, J. Neutron and X-ray experiments in wheat and revision of the speltoid problem / MacKey, J. // Hereditas. 1954. V. 40. P. 65–180.
- 158. MacKey, J. Mutagenesis in vulgare wheat / J. MacKey // Hereditas. 1968.
 V. 53. P. 505–517.
- 159. Magallon, S. Using fossils to break long branches in molecular dating: a comparison of relaxed clocks applied to the origin of angiosperms / S. Magallon // Syst Biol. 2010. V. 59. P. 384-399.
- 160. Maia, L.C.D. SSR Locator: tool for simple sequence repeat discovery integrated with primer design and PCR simulation / L.C.D. Maia, D.A. Palmieri, V.Q.D. Souza, M.M. Kopp, F.I.F.D. Carvalho, A.C.D. Oliveira // Int. J. Plant Genomics. 2008. V. 2008. Article 412696. Режим доступа: http://dx.doi.org/10.1155/2008/412696.

- 161. Malcomber, S.T. Developmental gene evolution and the origin of grass inflorescence diversity / S.T. Malcomber, J.C. Preston, R. Reinheimer et al. // Advances in Botanical Research. 2006. V. 44. P. 423–479.
- 162. Malyshev, S.V. Molecular markers linked to the synaptic genes in rye (*Secale cereale* L.) / S.V. Malyshev, T.V. Dolmatovich, A.V. Voylokov, S.P. Sosnikhina, N.A. Kartel // Proc. Intern. Symposium on Rye Breeding and Genetics. – Rostock, Germany, 2007. – P. 257–259.
- 163. Maniatis, T. Molecular cloning: A laboratory manual / T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook // Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. 2230 p.
- 164. Marcussen, T. Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat / T. Marcussen, S.R. Sandve, L. Heier et al. // Science. – 2014. – V. 345. – Article 1250092. DOI: 10.1126/science.1250092.
- 165. Martinek, P. Gene resources with non-standard spike morphology in wheat / Martinek P. // Proc. 9th Intern. Wheat Genetics Symposium. – Saskatoon, Saskatchewan, Canada, 1998. – V. 2. – P. 286–288.
- 166. Martinek, P. Changes of spike morphology (multirow spike –MRS, long glumes –LG) in wheat (*Triticum aestivum* L.) and their importance for breeding / P. Martinek, J. Bednar // "Genetic Collections, isogenic and alloplasmic lines": Proc. Intern. Conference. Novosibirsk, Russia, 2001. P. 192–194.
- 167. Mayer, K. F. X. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem / K. F. X. Mayer, H. Schoof, A. Haecker, M. Lenhard, G. Jürgens, T. Laux // Cell. – 1998. – V. 95. – P. 805–815.
- Mayer, K.F. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome / K.F. Mayer, J. Rogers, J. Doležel, C. Pozniak, K. Eversole, C. Feuillet, B. Gill, B. Friebe et al. // Science. 2014. V. 345. Article 1251788. P. 1–11. DOI: 10.1126/science.1251788.

- McIntosh, R.A. Catalogue of gene symbols for wheat / R.A. McIntosh // Proc. 4th Intern. Wheat Genetics Symposium; eds. E.R. Sears, L.M.S. Sears. – Columbia, MO, USA, 1973. – P. 893-937.
- 170. McSteen, P. A floret by any other name: control of meristem identity in maize / P. McSteen, D. Laudencia-Chingcuanco, J. Colasanti // Trends Plant Sci. – 2000. – V. 5. – P. 61–66.
- McSteen, P. *Barren inflorescence2* regulates axillary meristem development in the maize inflorescence / P. McSteen, S. Hake // Development. – 2001. – V. 128. – P. 2881–2891.
- 172. Morgante, M. Microsatellites are preferentially asociated with nonrepetitive DNA in plant genomes / M. Morgante, M. Hanafey, W. Powell // Nat. Genet. – 2002. – V. 30. – P. 194–200.
- 173. Müller, R. The receptor kinase CORYNE of Arabidopsis transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1 / R. Müller, A. Bleckmann, R. Simon // Plant Cell. 2008. V. 20. P. 934–946.
- 174. Murai, K. WAP1, a wheat APETALA1 homolog, plays a central role in the phase transition from vegetative to reproductive growth / K. Murai, M. Miyamae, H. Kato et al. // Plant Cell Physiol. – 2003. – V. 44. – P. 1255– 1265.
- 175. Muramatsu, M. Dosage effect of the *spelta* gene q of hexaploid wheat / M.
 Muramatsu // Genetics. 1963. V. 48. P. 469–482.
- 176. Muramatsu, M. Presence of the *vulgare* gene, Q, in a densespike variety of *Triticum dicoccum* Schubl / M. Muramatsu // Report of the Plant Germ-Plasm Institute, Kyoto University. – 1979. – No. 4. – P. 39–41.
- 177. Muramatsu, M. Spike type in two cultivars of *Triticum dicoccum* with the *spelta* gene *q* compared with the *Q*-bearing variety *liguliforme* / M. Muramatsu // Jpn J Breed. 1985. V. 35. P. 255–267.
- 178. Muramatsu, M. The *vulgare* super gene, Q: its universality in durum wheat and its phenotypic effects in tetraploid and hexaploid wheats / M. Muramatsu // Can J Genet Cytol. – 1986. – V. 28. – P. 30–41.

- 179. Muramatsu, M. A presumed genetic system determining the number of spikelets per rachis node in the tribe Triticeae / M. Muramatsu // Breed. Sci. 2009. V. 59. P. 617–620.
- Murat, F. Paleogenomics in Triticeae for translational research / F. Murat, C.
 Pont, J. Salse // Curr Plant Biol. 2014a. V. 1. P. 34–39.
- 181. Murat, F. Shared subgenome dominance following polyploidization explains grass genome evolutionary plasticity from a seven protochromosome ancestor with 16K protogenes / F. Murat, R. Zhang, S. Guizard, R. Flores, A. Armero, C. Pont, D. Steinbach, H. Quesneville, R. Cooke, J. Salse // Genome Biol Evol. 2014b. V. 6. P. 12–33
- 182. Nagasawa, N. Mutations associated with floral organ number in rice / N. Nagasawa, M. Miyoshi, H. Kitano, H. Satoh, Y. Nagato // Planta. 1996. V. 198. P. 627–633.
- 183. Nardmann, J. The shoot stem cell niche in angiosperms: expression patterns of WUS orthologues in rice and maize imply major modifications in the course of mono- and dicot evolution / J. Nardmann, W. Werr // Mol. Biol. Evol. – 2006. – V. 23. – P. 2492–2504.
- 184. Nicot, N. Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs) / N. Nicot, V. Chiquet, B. Gandon, L. Amilhat, F. Legeai, F. Leroy, M. Bernard, P. Sourdille // Theor Appl Genet. - 2004. - V. 109. - P. 800-805.
- 185. Oikawa, T. Two-step regulation of LAX PANICLE1 protein accumulation in axillary meristem formation in rice / T. Oikawa, J. Kyozuka // Plant Cell. - 2009. - V. 21. - P. 1095–1108.
- 186. Ortiz, R. Wheat genetic resources enhancement by the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) / R. Ortiz, H.J. Braun, J. Crossa et al. // Genetic Resources and Crop Evolution. – 2008. – V. 55. – P. 1095– 1140.
- 187. Paux, E. Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome

3B / E. Paux, D. Roger, E. Badaeva, G. Gay et al. // Plant J. – 2006. – V. 48. – P. 463–474.

- 188. Pelaz, S. B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes / S. Pelaz, G.S. Ditta, E. Baumann, E. Wisman, M.F. Yanofsky // Nature. – 2000. –V. 405. – P. 200–203.
- 189. Peng, Z.S. Chromosomal location of genes for supernumerary spikelet in bread wheat / Z.S. Peng, C. Yen, J.L. Yang // Euphytica. – 1998. – V. 103. – P. 109–114.
- 190. Pennell, A.L. Inheritance of supernumerary spikelets in wheat / A.L.
 Pennell, G.M. Halloran // Euphytica. 1983. V. 32. P. 767–776.
- 191. Percival, J. The Wheat Plant / Percival, J. London: Duckworth and Co, 1921. – 463 p.
- 192. Pestsova, E. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat / E. Pestsova, M.W. Ganal, M.S. Röder // Genome. – 2000. – V. 4. – P. 689–697.
- 193. Petersen, G. Phylogenetic relationships of Triticum and Aegilops and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (Triticum aestivum) / G. Petersen, O. Seberg, M. Yde, K. Berthelsen // Mol. Phylogenet. Evol. – 2006. – V. 39. – P. 70–82.
- 194. Plaschke, J. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers / J. Plaschke, M.W. Ganal, M.S. Röder // Theor Appl Genet. – 1995. – V. 91. – P. 1001–1007.
- 195. Pont, C. RNA-seq in grain unveils fate of neo- and paleopolyploidization events in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / C. Pont, F. Murat, C. Confolent, S. Balzergue, J. Salse // Gen. Biol. – 2011. – V. 12. – Article R119. Режим доступа: https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-12-r119.
- 196. Pont, C. Wheat syntenome unveils new evidences of contrasted evolutionary plasticity between paleo- and neoduplicated subgenomes / C. Pont, F. Murat, S. Guizard, R. Flores, S. Foucrier, Y. Bidet, U.M. Quraishi, M. Alaux et al // Plant J. – 2013. – V. 76, N. 6. – P. 1030–1044.

- 197. Pont, C. Wheat paleohistory created asymmetrical genomic evolution / Pont
 C., J. Salse // Current Opinion in Plant Biology. 2017. V. 36. P. 29–37.
- 198. Pourkheirandish, M. The importance of barley genetics and domestication in a global perspective / M. Pourkheirandish, T. Komatsuda // Ann Bot. 2007.
 V. 100, N. 5. P. 999–1008.
- 199. Poursarebani, N. The genetic basis of composite spike form in barley and "Miracle-Wheat" / N. Poursarebani, T. Seidensticker, R. Koppolu, C. Trautewig, P. Gawronski et al. // Genetics. 2015. V. 201. P. 155–165.
- 200. Prunet, N. Flower Development in *Arabidopsis*: There Is More to It Than Learning Your ABCs / N. Prunet, T.P. Jack // Flower Development. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols); eds. J. Riechmann, F. Wellmer. New York, NY: Humana Press, 2014. V. 1110. Режим доступа: https://rd.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4614-9408-9.pdf.
- 201. Quraishi, U.M. Genomics in cereals: from genome-wide conserved orthologous set (COS) sequences to candidate genes for trait dissection / U.M. Quraishi, M. Abrouk, S. Bolot, C. Pont, M. Throude, N. Guilhot, C. Confolent, F. Bortolini, S. Praud, A. Murigneux et al. // Funct Integr Genomics. – 2009. – V. 9. – P. 473–484.
- 202. Ramsay, L. Intimate association of microsatellite repeats with retrotransposons and other dispersed repetitive elements in barley / L. Ramsay, M. Macaulay, L. Cradle, M. Morgante, S.D. Ivanissevich, E. Maestri, W. Powell, R. Waugh // Plant J. – 1999. – V. 17. – P. 415–425.
- 203. Rao, N.N. Distinct regulatory role for *RFL*, the rice *LFY* homolog, in determining flowering time and plant architecture / N.N. Rao, K. Prasad, P.R. Kumar, U. Vijayraghavan // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008. V. 105. P. 3646–3651.
- 204. Rasheed, A. Wheat genetic resources in the post-genomics era: promise and challenges / Awais Rasheed, Abdul Mujeeb-Kazi, Francis Chuks

Ogbonnaya, Zhonghu He, Sanjaya Rajaram // Annals of Botany. – 2018. – V. 121. – P. 603–616.

- 205. Renny-Byfield, S. Persistence of subgenomes in paleopolyploid cotton after 60 My of evolution / S. Renny-Byfield, L. Gong, J.P. Gallagher, J.F. Wendel // Mol Biol Evol. 2015. V. 32. P. 1063–1071.
- 206. Reynolds, M. Achieving yield gains in wheat / M. Reynolds, J. Foulkes, R. Furbank, S. Griffiths, J. King et al. // Plant Cell Environ. 2012. –V. 35. P. 1799–1823.
- 207. Ritter, M.K. The maize mutant *barren stalk1* is defective in axillary meristem development / M.K. Ritter, C.M. Padilla, R.J. Schmidt // Am J Bot. – 2002. – V. 89. – P. 203–210.
- 208. Röder, M.S. A microsatellite map of wheat / M.S.Röder, V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M.H. Tixier, P. Leroy, M.W. Ganal // Genetics. 1998. V.149. P. 2007–2023.
- 209. Rossini, L. Candidate genes for barley mutants involved in plant architecture: an *in silico* approach / L. Rossini, A. Vecchietti, L. Nicoloso, N. Stein, S. Franzago, F. Salamini, C. Pozzi // Theor Appl Genet. 2006. V. 112. P. 1073–1085.
- 210. Sakamura, T. Kurze Mitteilung uber die chomosomenzahlen und die Verwantschaftsverhaltnisse der *Triticum*-Arten / T. Sakamura // Bot. Mag. Tokyo. – 1918. – V. 100. – P. 231-237
- 211. Sakuma, S. The domestication syndrome genes responsible for the major changes in plant form in the triticeae crops / S. Sakuma, B. Salomon, T. Komatsuda // Plant Cell Physiol. – 2011. – V. 52. – P. 738–749.
- 212. Salamini, F. Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east / F. Salamini, H. Özkan, A. Brandolini, R. Schäfer-Pregl, W. Martin // Nat. Rev. Genet. – 2002. – V. 3. – P. 429–441.
- 213. Salina, E.A. Phylogenetic reconstruction of Aegilops section Sitopsis and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids

/ E.A. Salina, Y.K. Lim, E.D. Badaeva et al. // Genome. – 2006. – V.49. – P. 1023–1035.

- 214. Salse, J. Reconstruction of monocotelydoneous proto-chromosomes reveals faster evolution in plants than in animals / J. Salse, M. Abrouk, S. Bolot, N. Guilhot, E. Courcelle et al. // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2009. V. 106(35). P. 14908–14913.
- 215. Salse, J. *In silico* arheogenomics unveils modern plant genome organization, regulation and evolution / J. Salse // Curr opinion in plant biology. 2012. V. 15. P. 122–130.
- 216. Salse, J. Deciphering the evolutionary interplay between subgenomes following polyploidy: a paleogenomics approach in grasses / J. Salse // Am J Bot. - 2016. - V. 103. - P. 1167-1174.
- 217. Satoh-Nagasawa, N. A. trehalose metabolic enzyme controls inflorescence architecture in maize / N. Satoh-Nagasawa, N. Nagasawa, S. Malcomber, H. Sakai, D. Jackson // Nature. – 2006. – V. 441. – P. 227–230.
- 218. Schlegel, Rolf H.J. Rye: genetics, breeding, and cultivation / Rolf H.J. Schlegel New York, NY: CRC Press Taylor & Francis Group, 2014. 382 р. Режим доступа: http://ru.b-ok.org/book/2650623/18cb63.
- 219. Schnable, J.C. Genome-wide analysis of syntenic gene deletion in the grasses / J.C. Schnable, M. Freeling, E. Lyons // Genome Biol Evol. 2012a. V. 4. P. 265–277.
- 220. Schnable, J.C. Escape from preferential retention following repeated whole genome duplications in plants / J.C. Schnable, X. Wang, J.C. Pires, M. Freeling // Front Plant Sci. – 2012b. – V. 3. – Article 94. Режим доступа: https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00094.
- 221. Scholz, F. Die Gaterslebener Mutanten der Saatgerste in Beziehung zur Formenmannigfaltigkeit der Art Hordeum vulgare L.s.l.I / F. Scholz, O. Lehmann // Kulturpflanzen. – 1958. – V. 6. – P. 123–166.
- 222. Schulz, A. Die Geschichte der Kultiwierten Getreide / A. Schulz // Halle am Saale: Neubert Verlag, 1913. 134 p.
- 223. Sears, E.R. Misdivision of univalents in common wheat / E.R. Sears // Chromosoma. 1952. V. 4. P. 535–550.
- 224. Sears, E.R. The aneuploids of common wheat / E.R. Sears. –Columbia, MO, USA: University of Missouri, 1954. P. 3–58.
- 225. Sharman, B.C. Branched head in wheat and wheat hybrids / B.C. Sharman // Nature. 1944. V. 153. P. 497–498.
- 226. Sharman, B.C. Interpretation of the morpholiogy of various naturally occurring abnormalities of the inflorescence of wheat (*Triticum*) / B.C. Sharman // Can. J. Plant Sci. 1967. V. 45. P. 2073–2080.
- 227. Shewry, P.R. Wheat / P.R. Shewry // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 1537–1553.
- 228. Shitsukawa, N. WFL, a wheat FLORICAULA/LEAFY ortholog, is associated with spikelet formation as lateral branch of the inflorescence meristem / N. Shitsukawa, A. Takagishi, C. Ikari, S. Takumi, K. Murai // Genes Genet. Syst. 2006. V. 81. P. 13–20.
- 229. Shitsukawa, N. Genetic and epigenetic alteration among three homoeologous genes of a class EMADS box gene in hexaploid whtat / N. Shitsukawa, C. Tahira, K. Kassai et al. // Plant Cell. 2007. V. 19. P.1723–1737.
- 230. Shitsukawa, N. Heterochronic development of the floret meristem determines grain number per spikelet in diploid, tetraploid and hexaploid wheats / N. Shitsukawa, H. Kinjo, S. Takumi, K. Murai // Annals of Botany. 2009. V. 104. P. 243–251.
- 231. Simons, K.J. Molecular characterization of the major wheat domestication gene Q / K.J. Simons, J.P. Fellers, H.N. Trick, Z. Zhang, Y.S. Tai, B.S. Gill, J.D. Faris // Genetics. 2006. V. 172. P. 547–555.
- 232. Smoček, J. Screwedness of the spike rachis A new phenomenon in wheat spike morphology / J. Smoček // Rostlinná Výroba. – 1991. – V. 37. – P. 507–514.

- 233. Soltis, D.E. Origin and early evolution of angiosperms / D.E. Soltis, C.D.
 Bell, S. Kim, P.S. Soltis // Ann N Y Acad Sci. 2008. V. 1133. P. 3–25.
- 234. Somers, D.J. A high-density wheat microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / D.J. Somers, P. Isaac, K. Edwards // Theor Appl Genet. – 2004. – V. 109. – P.1105–1114.
- 235. Somssich, M. CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem / M. Somssich, B. Je, R. Simon, D. Jackson // Development. 2016. V. 143. P. 3238–3248.
- 236. Song, Q.J. Characterization of trinucleotide SSR motifs in wheat / Q.J. Song,
 E.W. Fickus, P.B. Cregan // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 104. P. 286–293.
- 237. Song, Q.J. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat / Q.J. Song, J.R. Shi, S. Singh et al. // Theor. Appl. Genet. 2005. V. 110. P. 550–560.
- 238. Sourdille, P. Transferability of wheat microsatellites to diploid triticeae species carrying the A, B and D genomes / P. Sourdille, M. Tavaud, G. Charmet, M. Bernard // Theor Appl Genet. 2001. V. 103. P. 346–352.
- 239. Sourdille, P. Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.) / P. Sourdille, S. Singh, T. Cadalen et al. // Func. Integr. Genomics. 2004. V. 4. P. 12–25.
- 240. Sreenivasulu, N. A genetic playground for enhancing grain number in cereals / N. Sreenivasulu, T. Schnurbusch // Trends Plant Sci. 2012. V. 17. P. 91–101.
- 241. Sun, D.F. Inheritance of genes controlling supernumerary spikelet in wheat line 51885 / D.F. Sun, J. Fang, G. Sun // Euphytica. – 2009. – V. 167. – P. 173–179.
- 242. Suzaki, T. The gene FLORAL ORGAN NUMBER1 regulates floral meristem size in rice and encodes a leucine-rich repeat receptor kinase orthologous to Arabidopsis CLAVATA1 / T. Suzaki, M. Sato, M. Ashikari,

M. Miyoshi, Y. Nagato, H.Y. Hirano // Development. – 2004. – V. 131. – P. 5649–5657.

- 243. Suzaki, T. Functional diversification of CLAVATA3-related CLE proteins in meristem maintenance in rice / T. Suzaki, A. Yoshida, H.Y. Hirano // Plant Cell. – 2008. – V. 20. – P. 2049–2058.
- 244. Suzaki, T. FON2 SPARE1 redundantly regulates floral meristem maintenance with FLORAL ORGAN NUMBER2 in rice / T. Suzaki, M. Ohneda, T. Toriba, A. Yoshida, H.-Y. Hirano // PLoS Genet. 2009. V. 5. Article e1000693. Режим доступа: https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000693.
- 245. Swaminathan, M.S. Expression and stability of an induced mutation for ear branching in bread wheat / M.S. Swaminathan, V.L. Chopra, G.R.K. Sastry // Curr Sci. – 1966. – V.35. – P. 91–92.
- 246. Sybenga, J. Gene analysis in rye / J. Sybenga, R. Prakken // Genetica. 1962. V. 33. P. 95–105.
- 247. Sykorova, E. Telomere variability in the monocotyledonous plant order Asparagales / E. Sykorova, K.Y. Lim, Z. Kunická, M.W. Chase et al. // Proc. Biol. Sci. – 2003. – V. 270. – P. 1893–1904.
- 248. Taguchi-Shiobara, F. The *fasciated ear2* gene encodes a leucine-rich repeat receptor-like protein that regulates shoot meristem proliferation in maize / F. Taguchi-Shiobara, Z. Yuan, S. Hake, D. Jackson // Genes Dev. – 2011. – V. 15. – P. 2755–2766.
- 249. Tanaka, W. Grass meristems II: inflorescence architecture, flower development and meristem fate / W. Tanaka, M. Pautler, D. Jackson, H.Y. Hirano // Plant Cell Physiol. – 2013. – V. 54, N. 3. – P. 313–324.
- 250. Tanaka, W. Axillary meristem formation in rice requires the WUSCHEL ortholog TILLERS ABSENT1 / W. Tanaka, Y. Ohmori, T. Ushijima, H. Matsusaka, T. Matsushita, T. Kumamaru, S. Kawano, H.Y. Hirano // Plant Cell. – 2015. – V. 27. – P. 1173–1184.

- 251. Temnykh, S. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon association, and genetic marker potential / S. Temnykh, G. DeClerck, A. Lukashova, L. Lipovich, S. Cartinhour, S. McCouch // Genome Res. 2001. V. 11. P. 1441–1452.
- 252. Theissen, G. Floral quartets / G. Theissen, H. Saedler // Nature. 2001. –V.
 409. P. 469–471.
- 253. Thomas, B.C. Following tetraploidy in an Arabidopsis ancestor, genes were removed preferentially from one homeolog leaving clusters enriched in dose-sensitive genes / B.C. Thomas, B. Pedersen, M. Freeling // Genome Res. – 2006. – V. 16. – P. 934–946.
- 254. Thompson, B.E. The bearded-ear encodes a MADS box transcription factor critical for maize floral development / B.E. Thompson, L. Bartling, C. Whipple, D.H. Hall, H. Sakai, R. Schmidt, S. Hake // Plant Cell. 2009. V. 21. P. 2578–2590.
- 255. Thompson, B.E. Translational biology: from Arabidopsis flowers to grass inflorescence architecture / B.E. Thompson, S. Hake // Plant Physiol. 2009. V. 149. P. 38–45.
- 256. Tikhenko, N. Embryo lethality in wheat x rye hybrids mode of inheritance and the identification of a complementary genes in wheat / N. Tikhenko, N. Tsvetkova, A. Voylokov, O. Dobrovolskaya, K. Zaynali Nezhad, M.S. Roder, A Borner // Euphytica. – 2010. – V. 176. – 191-198.
- 257. Unrau, J. Spike density, speltoidy and compactoidy in hexaploid wheat / J. Unrau, W.E. Smith, R.C. McGinnis // Can J Res Com. 1950. V. 28. P. 273–276.
- 258. Untergasser, A. Primer3 new capabilities and interfaces / Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG // Nucleic Acids Research. – 2012. – V. 40(15). – Article e115. Режим доступа: https://doi.org/10.1093/nar/gks596.

- 259. van der Graaff, E. Activation tagging of the *LEAFY PETIOLE* gene affects leaf petiole development in *Arabidopsis thaliana* / E. van der Graaff, A.D Dulk-Ras, P.J. Hooykaas, B.Keller // Development. 2000. V. 127. P. 4971–4980.
- 260. van Ooijen, J.W. MapQTL®5, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations / J.W. van Ooijen // Wageningen, Netherlands: Kyazma B.V., 2004.
- 261. Vershinin, A.V. The large-scale genomic organization of repetitive DNA families at the telomeres of rye chromosomes / A.V. Vershinin, T. Schwarzacher, J.S. Heslop-Harrison // Plant Cell. 1995. V. 7. P. 1823–1833.
- 262. Vollbrecht, E. Architecture of floral branch systems in maize and related grasses / E. Vollbrecht, P.S. Springer, L. Goh, E.S. Buckler IV, R. Martienssen // Nature. – 2005. – V. 436. – P. 1119–1126.
- 263. Wang, X. Duplication and DNA segmental loss in the rice genome and their implications for diploidization / X. Wang, X. Shi, B.L. Hao, S. Ge, J. Luo // New Phytol. 2005. V. 165. P. 937–946.
- Wang, Y. Genome-wide distribution comparative and composition analysis of the SSRs in Poaceae / Y. Wang, C. Yang, Q. Jin, D. Zhou, S. Wang et. al.
 // BMC Genet. 2015. V. 16. Article 18. Режим доступа: https://doi.org/10.1186/s12863-015-0178-z.
- 265. Weigel, D. *LEAFY* controls floral meristem identity in Arabidopsis / D. Weigel, J. Alvarez, D.R. Smyth, M. F. Yanofsky, E.M. Meyerowitz // Cell. 1992. V. 69. P. 843–859.
- 266. Wolfe, K.H. Date of the monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data / K.H. Wolfe, M. Gouy, Y.W. Yang, P.M. Sharp, W.H. Li // Proc Natl Aced Sci USA. – 1989. – V. 86. – P. 6201– 6205.
- 267. Woodhouse, M.R. Following tetraploidy in maize, a short deletion mechanism removed genes preferentially from one of the two homologs /

M.R. Woodhouse, J.C. Schnable, B.S. Pedersen, E. Lyons, D. Lisch, S. Subramaniam, M. Freeling // PLoS Biol. – 2010. – V. 8. – Article e1000409. Режим доступа: https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000409

- 268. Yan, L. The wheat VRN2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization / L. Yan, A. Loukoianov, A. Blechl, G. Tranquilli1, W. Ramakrishna et al. // Science. 2004. V. 303. P. 1640–1644.
- 269. Yan, L. The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT / L. Yan, D. Fu, C. Li, A. Blechl, G. Tranquilli et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. – USA, 2006. – V. 103. – P. 19581–19586.
- 270. Yang, W.-Y. Inheritance of the triple-spikelet character in a Tibetan landrace of common / W.-Y. Yang, B.-R. Lu, X.-R. Hu, Y. Yu, Y. Zhang // Genet Resour Crop Ev. – 2005. – V. 52. –P. 847–851.
- 271. Yi, G. Morphological and molecular characterization of a new *frizzy panicle* mutant, "*fzp-9(t)*", in rice (Oryza sativa L.) / G. Yi, J.H. Choi, E.G. Jeong, N.S. Chon, K.K. Jena, Y.C. Ku, D.H. Kim, M.Y. Eun, J.S. Jeon, M.H. Nam // Hereditas. 2005. V. 142. P. 92–97.
- 272. Yoshida, A. *TAWAWA1*, a regulator of rice inflorescence architecture, functions through the suppression of meristem phase transition / A. Yoshida, M. Sasao, N. Yasuno, K. Takagi, Y. Daimon, R. Chen, R. Yamazaki, H. Tokunaga, Y. Kitaguchi, Y. Sato, Y. Nagamura, T. Ushijima, T. Kumamaru, S. Iida, M. Maekawa, J. Kyozuka // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013. V. 110. P. 767–772.
- 273. Yoshiya, K. Genetic mapping of the gene for brittle rachis in a *Triticum aestivum-Aegilops triuncialis* introgression line / K. Yoshiya, N. Watanabe, T. Kuboyama, I.F. Lapochkina // Genet. Resour. Crop Evol. 2012. V. 59. P. 67–72.
- 274. Yu, J.-K. Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat / J.-K. Yu, T.M. Dake, S. Singh, D. Benscher, W. Li, B. Gill, M.E. Sorrells // Genome. 2004. V. 47. P. 805–818.

- 275. Zhang, L.Y. High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals / L.Y. Zhang, M. Bernard, P. Leroy, C. Feuillet, P. Sourdille // Theor Appl Genet. – 2005. – V. 111. – P. 677–687.
- 276. Zhang, L.Y. Study of the transferability of microsatellite markers derived from bread wheat (*T. aestivum*) or rice (*O. sativa*) ESTs (EST-SSRs) to their close and wild relatives and evaluation of their potential for the organization of genetic resources / L.Y. Zhang // PhD Thesis. – Clermont-Ferrand, France: Université Blaise Pascal. – 2006. – 160 p.
- 277. Zhang, Z.C. Duplication and partitioning in evolution and function of homoeologous *Q* loci governing domestication characters in polyploid wheat/ Z.C. Zhang, H. Belcram, P. Gornicki, M. Charles, J. Just, C. Huneau, G. Magdelenat, A. Couloux, S. Samain, B.S. Gill, J.B. Rasmussen, V. Barbe, J.D. Faris, B. Chalhoub // Proc Natl Acad Sci USA. 2011. V. 108. P. 18737–18742.
- 278. Zhang, B. Novel function of a putative MOC1 ortholog associated with spikelet number per spike in common wheat / B. Zhang, X. Liu, W. Xu, J. Chang, A. Li, X. Mao, X. Zhang, R. Jing // Sci Rep. 2015. V. 5. Article 12211. Режим доступа: http://www.nature.com/articles/srep12211.pdf.
- Zhang, R.Q. Agronomic characterization and genetic analysis of the supernumerary spikelet in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) / R.Q. Zhang, F. Hou, J. Chen, S.L. Chen, L.P. Xing, Y.G. Feng, A.Z. Cao // J Integrative Agr. 2017. V. 16. P. 1304–1311.
- 280. Zhu, Q.H. *Ds* tagging of *BRANCHED FLORETLESS 1 (BFL1)* that mediates the transition from spikelet to floret meristem in rice (*Oryza sativa* L) / Q.H. Zhu, M.S. Hoque, E.S. Dennis, N.M. Upadhyaya // BMC Plant Biol. 2003. V. 3. Article 6. Режим доступа: https://doi.org/10.1186/1471-2229-3-6.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1 — Линии нестандартных морфотипов колоса, использованные в исследованиях (Добровольская и др., 2014а, 2014б, 2017а, 2017б; Dobrovolskaya et al., 2008, 2009, 2015, 2017)

Вид	Линия	Морфотип	Особенности фенотипа колоса	Происхождение
T. aestivum	Ruc163 ¹			
	Ruc167 ¹			
	V3-79-08 ¹			
	V3-82-08 ¹			Донор признака MRS – ветвистоколосая
	V3-83-08 ¹			в результате химического мутагенеза.
	V3-84-08 ¹			
	V3-85-08 ¹	MRS	Кластер из множества сидячих колосков (до 10-и) на уступах колосового стержня	Маркирующий признак почти изогенной линии NIL-mrs1 перенесен от линии KM240 (донор MRS-признака этой линии – Ra1), рекуррентным родителем являлась линия сорта мягкой яровой пшеницы Новосибирская 67.
	V3-86-08 ¹			
	V3-87-08 ¹			
	V3-88-08 ¹			
	V3-89-08 ¹			
	V3-90-08 ¹			
	NIL-mrs1 ³			
	Ruc204 ¹	HS-GB	Дополнительные сидячие колоски расположены на уступах или ветвистый колос	Не известно
	Skle128 ¹	HS	По три сидячих колоска расположено на большей части уступов	Тибетская трехколосковая форма мягкой пшеницы (Tibetan triple-spikelet wheat, TTSW)
	So164 ¹	HS	По паре сидячих колосков расположено на большей части уступов	Гибрид от скрещивания с ветвистоколосой формой тетраплоидной пшеницы

Вид	Линия	Морфотип	Особенности фенотипа колоса	Происхождение
T. aestivum	$MC1611^4$ HS По паре сидячих колосков на уступах нижней части колоса		По паре сидячих колосков на уступах нижней части колоса	Индуцированный мутант (НММ- мутагенез), исходный сорт Саратовская29
	Ruc130 ¹	GB	Ветвистый колос	Не известно
	Ruc57 ¹	VSS	Парные или вертикальные колоски развиваются на уступах один над другим.	Форма мягкой пшеницы Z GK 331-8
	Ruc62 ¹	VSS	Парные или вертикальные колоски развиваются на уступах один над другим.	Форма мягкой пшеницы Z GK 3-82
	Ruc 30-11 ¹	SCR	Спиральным расположением колосков на колосовом стержне	Форма мягкой пшеницы Z GK 242-82
	Ruc 34-11 ¹	SCR	Спиральным расположением колосков на колосовом стержне	Форма мягкой пшеницы Z GK 242-82
T. monococcum	KT 3–24 ³	GB	Ветвистый колос	Индуцированный мутант
T. durum	R-107 ³	HS-GB	Дополнительные сидячие колоски на уступах или ветвистый колос	Ветвистоколосый образец, Дагестан
T. turgidum	K-40750 ²	GB	Ветвистый колос типичного тургидного типа	Ветвистоколосый образец, Болгария
	PI 67339 ³	f-tR	Ложно-истинное ветвление колоса	Образец PI 67339 NSGC USDA-ARS
S. cereale	D40 ⁵	monstrosum	Множество колосков на уступе	Спонтанно возникшая форма

Примечание: Линии предоставлены 1 – д-ром П. Мартинеком (Dr. P. Martinek, Agrotest Fyto Ltd, Кромержиж, Чешская республика); 2 –Всероссийским институтом растениеводства имени Н.И. Вавилова (г. Санкт-Петербург, Россия); 3 – проф. Н. Ватанабэ (Prof. N. Watanabe, College of Agriculture, Ibaraki University, Ибараки, Япония), 4 – В.М. Мельником (ФГБНУ Алтайский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, г. Барнаул); 5 – д.б.н. А.В. Войлоковым (Санкт-Петербургский филиал ИОГен РАН, г. Санкт-Петербург). Морфотипы: f-tR (false-true ramification) — ложно-истинное ветвление колоса; GB (genuine branching) – истинное ветвление колоса; HS (horizontal spikelet) – горизонтальные колоски; MRS (multirow spike) – "многорядный" колос, SCR (screwed spike rachis) – скрученный колосовой стержень; VSS (vertical sessile spikelets) –вертикальные колоски, *monstrosum* – монстрозный колос. HMM – нитрозометилмочевина. NSGC USDA-ARS – National Small Grain Collection, United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service

Таблица 2 – Краткое описание нестандартных морфотипов колоса пшеницы (Разработана автором)

Морфотип	Краткое описание		
колоса пшеницы			
MRS (multirow spike)	Многорядный колос, на уступах колосового стержня которого формируются кластеры из многочисленных сидячих колосков (до 10 колосков).		
TTSW (Tibetan triple-spikelet wheat)	Тибетская трехколосковая форма мягкой пшеницы, которая отличается развитием трех колосков на большей части уступов колосового стержня.		
HS (horizontal spikelets)	Характеризуется наличием сидячих колосков (чаще всего пары) расположенных рядом по горизонтали. Синонимы – <i>'tetrastichon</i> sessile spikelets' (четырехрядные сидячие колоски), FRS (four rowed spike).		
GB (genuine branching)	Истинное ветвление колоса. На уступах колосового стержня развиваются не только дополнительные колоски, но и вторичные колосковые оси ("веточки"). Синоним – RS (ramified spike) – ветвистый колос. Синоним – "turgidum type of spike" – тургидный тип колоса, ветвистый колос характерный для ветвистоколосых форм пшеницы <i>T. turgidum</i> .		
f-tR (false-true ramification)	Ложно-истинное ветвление колоса. Формирование колосков с удлиненной колосковой осью, в базальной части которых формируется пара зерновок, а в дистальной части –эктопические колоски.		
VSS (vertical sessile spikelets)	Вертикальные сидячие колоски. Парные или вертикальные колоски развиваются один над другим.		
SCR (screwed spike rachis)	Колос со спиральным расположением колосков на колосовом стержне.		
RS (ramified spike)	Ветвистый колос. На уступах колосового стержня развиваются не только дополнительные колоски, но и вторичные колосковые оси ("веточки"). Синонимы – GB (genuine branching) и "turgidum type of spike".		
SHR (sham ramification)	Ложное ветвление колоса. Формирование колоска с удлиненной колосковой осью, на которой расположены цветки.		
FRS (four rowed spike)	Четырёхрядный колос. На уступах колосового стержня развивается пара сидячих колосков, расположенных рядом по горизонтали. Синонимы – HS (horizontal spikelets) и <i>'tetrastichon</i> sessile spikelets'.		

Таблица 3 – COS-SSCP маркеры, использованные для сравнительного картирования геномов пшеницы и риса и установления гена-кандидата на роль гена *mrs1* (Quraishi et al., 2009; Dobrovolskaya et al., 2015)

EST пшеницы	Локализация в делеционном бине	Группы хромосом	Название COS-маркера
	7DS 7DS4-0.61-1.00 2AS C-2AS5-0.78 2BS C-2BS1-0.53 2DS C-		BE406923_I1
BE406923	2DS1-0.33	7, 2	BE406923_I3
BE406808	2DS_2DS5-0.47-1.00 2AS_C-2AS5-0.78 2BS_C-2BS1-0.53	2	BE406808_I
			BE442655_I1
			BE442655_I2
BE442655	2AS_C-2AS5-0.78 2BS_C-2BS1-0.53 2DS_C-2DS1-0.33	2	BE442655_I3
			BE403166_5P
BE403166	2BS_C-2BS1-0.53	2	BE403166_3P
			BG605024_3P
			BG605024_I
BG605024	2BS_2BS 2DS_C-2DS1-0.33	2	BG605024_5P
			BF473259_I2
BF473259	2AS_C-2AS5-0.78 2BS_C-2BS1-0.53 2DS_C-2DS1-0.33	2	BF473259_5P
	2AS_2AS 2DS_2DS _4A 4DL_4DL9-0.31-0.56 5AL_5AL10-0.57-		DE (25005 12
	0.78		BE637885_12
BE637885	5BL_5BL16-0.79-1.00 5DL_5DL5-0.76-1.00 2BS_C-2BS1-0.53	2, 5	BE637885_I2
BF483010	2AS_C-2AS5-0.78 2BS_C-2BS1-0.53 2DS_C-2DS1-0.33	2	BF483010_I2
BG607805	2AL_2AL1-0.85-1.00 2AS_C-2AS5-0.78 2BS_C-2BS1-0.53	2	BG607805_I1

EST пшеницы	Локализация в делеционном бине	Группы хромосом	Название COS-маркера
			BG263521_I3
			BG263521_5P
BG263521	2DS_2DS1-0.33-0.47 2AS_C-2AS5-0.78 2BS_C-2BS1-0.53	2	BG263521_i1
			BE404332_I2
BE404332	2DS_2DS 2AS_C-2AS5-0.78 2BS_C-2BS4-0.75	2	BE404332_I1
			BE444378_I2
			BE444378_I3
	2AS C-2AS5-078/2BS C-2BS1-053/2DS C-2DS1-033/4DS C-		BE444378_I4
BE444378	4DS1-0.53	2, 4	BE444378_i1
			BE499115_I1
			BE499115_I2
BE499115	2AS_C-2AS5-0.78 2BS_C-2BS1-0.53	2	BE499115_I4
			BE494907_I2
BE494907	2BS_2BS 2AS_C-2AS5-0.78 2DS_C-2DS1-0.33	2	BE494907_I3
BF483083	2BS_2BS 2DS_2DS 2AS_C-2AS5-0.78	2	BF483083_I
			BF201328_I1
			BF201328_i3
BF201328	2AS_C-2AS5-0.78 2BS_C-2BS1-0.53 2DS_C-2DS1-0.33	2	BF201328_i2
BE404630	2AL_C-2AL1-0.85 2BS_C-2BS1-0.53 2DL_C-2DL3-0.49	2	BE404630_I2
			BF428792_i2

EST пшеницы	Локализация в делеционном бине	Группы хромосом	Название COS-маркера
BG606092			BG606092_3P
	2DS_2DS1-0.33-0.47 2BS_C-2BS1-0.53	2	BG606092_I1
			BF291674_I3
			BF291674_I1-I2
BF291674	2AS_C-2AS5-0.78 2BS_C-2BS1-0.53 2DS_C-2DS1-0.33	2	BF291674_I4-I5
			BG274976_I2
			BG274976_3P
BG274976	2AS_C-2AS5-0.78 2BS_C-2BS1-0.53	2	BG274976_i1
			BE425942_5P
BE425942	2BS_C-2BS1-0.53 2DS_C-2DS1-0.33	2	BE425942_I1
	1AL_1AL1-0.17-0.61 1BL_C-1BL6-0.32 2AS_C-2AS5-0.78 2BS_C-		
BE403404	2BS1-0.53 2DS_C-2DS1-0.33	1, 2	BE403404_I
BF482919	2AS_2AS 2BS_2BS 2DS_2DS5-0.47-1.00 2BS_C-2BS4- 0.75 6BL_C-6BL5-0.40	2,6	BF482919_5P
			BE497494_i1
BE497494	2AS_2AS5-0.78-1.00 2BS_2BS1-0.53-0.75 2DS_2DS5-0.47-1.00	2	BE497494_i2
			BG275030_i1
BG275030	2AS_2AS5-0.78-1.00 2BS_2BS4-0.75-0.84 2DS_2DS5-0.47-1.00	2	BG275030_i3
			BE499478_i1
BE499478	2AS_2AS5-0.78-1.00 2BS_2BS1-0.53-0.75 2DS_2DS5-0.47-1.00	2	BE499478_5P
			BF202287_5P
BF202287	2AS_C-2AS5-0.78 2BS_C-2BS1-0.53	2	BF202287_3P

EST пшеницы	Локализация в делеционном бине	Группы хромосом	Название COS-маркера
			BF478936_i3
BF478936	2BS_2BS _2D	2	BF478936_i4
			BF428792_i1
BF428792	2BS_2BS1-0.53-0.75 2DS_2DS5-0.47-1.00	2	BF428792_i2

Таблица 4 – Полиморфные COS-SSCP маркеры, использованные для сравнительного картирования геномов пшеницы и риса с целью установления гена-кандидата на роль гена *mrs1* (Quraishi et al., 2009; Dobrovolskaya et al., 2015)

COS-SSCP маркер	Структура праймеров			изм [*]	Попу- ляции	Тип наследова- ния	Хромо- сомная локализа- ция
		18 ⁰ C	25°C	35°C			
BF482919_5p	F:CACGACGTTGTAAAACGACCGACATTTCTTCGGCTTCG R:CAGGAAACAGCTATGACCAAGAGTTGCCGAGCGTGG	+	+	+	II	-	-
BG263521_5p	F:CACGACGTTGTAAAACGACCGCCATCCTCCGCAAGTC R:CAGGAAACAGCTATGACCGATCTGCACCGGGTACGAGC	+	-	-	I, II	c	-
BE499478_i1	F:ACGACGTTGTAAAACGACCGGGGGCAGTATTTTACAGATC R: CAGGAAACAGCTATGACCGTCCAACTTGACAGTGTGGTC	-	+		I, II	d	-
BF201328_i2	F:CACGACGTTGTAAAACGACCACAGGATCGAATCCACCG CAGGAAACAGCTATGACCATGCGCTCTTCAACTGTGTCC	+	+	+	II	d	nd
BF201328_i3	F:CACGACGTTGTAAAACGACAGGACACAGTTGAAGAGCG R: CAGGAAACAGCTATGACCTAGTCAATATGCGAGGCAAG	-	+	-	I, II	c	2A
BF291674_i1	F:CACGACGTTGTAAAACGACTGATGGCGAAACATATGCTTC R:AGGAAACAGCTATGACCATGATCCCTTTCTCAACCCAC	-	+	-	I, II	c	2B
BG606092_i1	F:CACGACGTTGTAAAACGACTCGTGGCTTTAGCTTTTGGG R:CAGGAAACAGCTATGACCGGGAAAAGATCAGGGCGAG	-	+	-	II	-	-
BG274976_i1	F:CACGACGTTGTAAAACGACTGGGGATGATGCTACAGAG R:CAGGAAACAGCTATGACCCAGAGCAGCATCAATACCTG	+	+	-	I	c	28
BE497494_i2	F:CACGACGTTGTAAAACGACCAATGAATAGGATAGGTGGG R:CAGGAAACAGCTATGACCCAACATCTGTAAGGGGACTC	-	+	+	Ι	d	2B
BG275030_i1	F:CACGACGTTGTAAAACGACCGAGCAAAGGACAACATTC R:CAGGAAACAGCTATGACCTAACAGTTCGCATGAACAGC	-	+	-	Ι	-	-

Примечание: * – SSCP-полиморфизм между родителями картирующих популяций, выявляемый в разных температурных условиях (18/25/35⁰C). І и ІІ – картирующие популяции F₂ Ruc163 x So149 и Ruc167 x So149, соответственно. с – кодоминантный и d – доминантный маркеры, соответственно, nd – хромосомная локализация не определена; - нет данных

_							
Название маркера	cos	O. sativa [chr7]	<i>B.distachyon</i> [chr1]	S. bicolor [chr2]	Z. mays [ch2]	Z. mays [ch7]	Функции (<i>O. sativa</i>)
CDO405	BE499478	LOC_Os07g45064	Bradi1g19650.1chr0	1Sb02g041160			АТМ-подобный белок, предоп., экспр.
		LOC_Os07g45080		Sb02g041170	ZmEvi110931-2		экспр. белок
							митохондриальный предшественник субъединицы 51 kDa NADH-
		LOC_Os07g45090		Sb02g041180	ZmEvi110933-2	ZmEvi068263-7	убихинон-оксидоредуктазы, , предп., экспр.
		LOC_0s07g45260		Sb02g041310			трансфераза, переносящая гликозильные группы, предп., экспр.
		LOC_Os07g45280	Bradi1g19570.1chr0	1Sb02g041320			белок Мо25, предп., экспр.
		LOC_0s07g45290		Sb02g041330			цитохром Р450 72А1, предп., экспр.
		LOC_0s07g45320	Bradi1g19530.1chr0	1Sb02g041360		ZmEvi039280-7	COX VIIa-подобный белок, предп., экспр.
		LOC_0s07g45350	Bradi1g19510.1chr0	Sb02g041380		ZmEvi039308-7	ZCF61, предп., экспр.
		LOC_Os07g45360	Bradi1g19500.1chr0	1Sb02g041390		ZmEvi093709-7	АТФ-зависимая РНК хеликаза DDX52, предп., экспр.
		LOC_Os07g46160	Bradi1g19390.1chr0	1Sb02g041470		ZmEvi093725-7	белок спекл типа РОΖ, предп., экспр.
		LOC_Os07g46170	Bradi1g19380.1chr0	Sb02g041460	ZmEvi120564-2		трансмембранный белок 115, предп., экспр.
		LOC_Os07g46180	Bradi1g19370.1chr0	1_pseudomolecule	brac version0 154	95039-15483590 B	РWWP-домен содержащий белок, экспр.
		LOC_0s07g46220	Bradi1g19340.1chr0	1Sb02g041420	ZmEvi024687-2	ZmEvi093711-7	экспр. белок
		LOC_Os07g46240	Bradi1g19300.1chr0	1Sb02g041530	ZmEvi120572-2		экспр. белок
		LOC_Os07g46280	Bradi1g19270.1chr0	1Sb02g041550		ZmEvi093724-7	предшественник нецианогенной бета-глюкозидазы, предп., экспр.
		LOC_Os07g46300	Bradi1g19260.1chr0	Sb02g041570			экспр. белок
		LOC Os07q46310	Bradi1g19220.1chr0	1 pseudomolecule	brac version0 153	96067-15401935 B	субъединица Н магний-хелатазы, предп.
		LOC Os07q46340	-	Sb02q041600			метилаза, предп., экспр.
		LOC 0s07q46350	Bradi1g19230.1chr0	1 pseudomolecule	brac version0 154	09996-15413928 B	предшественник серин карбоксипептидазы 1, предп., экспр.
		LOC 0s07q46360	-	Sb02q041630			лактоилглютатион лиаза, предп., экспр.
		LOC Os07a46370	Bradi1o19210.1chr0	1Sb02a041640			белок ЕМВ2221, предполагаемый, экспр.
		LOC 0s07a46380		Sb02q041650			гликозилтрансфераза, предп., экспр.
							бифункциональная тиоредоксинредуктаза/тиоредоксин, предп.,
		LOC_Os07g46410	Bradi1g19140.1chr0	1_pseudomolecule	brac version0 153	ZmEvi120118-7	экспр.
		LOC_Os07g46450	Bradi1g19100.1chr0	1Sb02g041730			Активатор rho ГТФазы, предп., экспр.
							хлоропластный предшественник ферредоксинзависимой
		LOC_Os07g46460	Bradi1g19080.1chr0	1_pseudomolecule	brac version0 152	84037-15301108 B	глутаматной синтазы, предп., экспр.
		LOC Os07q46480		Sb02q041760			предшественник аспарагиновой протеиназы непентезин-1, предп., экспр.
		LOC 0s07g46490	Bradi1o19050 1chr0	1Sb020041770			фосфатилилинозитол-4-фосфат 5-киназа 4, прелл. экслр.
	1	LOC 0s07q46500	Bradi1019030.1chr0	1Sb02q041780		ZmEvi128244-7	танкираза 2. предп., экспр.

Таблица 5 – Список генов-кандидатов на роль *mrs1* (Dobrovolskaya et al., 2015)

łазвание ларкера	COS	O. sativa [chr7]	<i>B.distachyon</i> [chr1]	S. bicolor [chr2]	Z. mays [ch2]	Z. mays [ch7]	Функции (<i>O. sativa</i>)	
		LOC_0s07g46520	Bradi1g19010.1chr01	Sb02g041820			ритмично экспрессирующийся ген 2,предп., экспр.	
		LOC Os07g46540	Bradi1g19000.1chr01	pseudomolecule	brac version0 1520	3222-15211438 B	субъединица 1 конденсинового комплекса, предп., экспр.	
		LOC Os07q46560	Bradi1g18970.1chr01	Sb02q041870		ZmEvi131694-7	убиквитин-лигаза SINAT5, предп., экспр.	
		LOC Os07q46570		Sb02q041880			транспортер электронов, предп., экспр.	
		LOC Os07q46590	Bradi1g18910.1chr01	Sb02g041910			ДНК-связывающий белок хромодомен-хеликазы, предп., экспр.	
		LOC Os07a46600	Bradi1018900.1chr01	Sb02q041930			белок семейства РНК псевдоуридилатсинтазы, экспр.	
		LOC 0s07a46610		Sb02q041935			цис-зеатин О-глюкозилтрансфераза, предп., экспр.	
		LOC 0s07q46630	Bradi1o18810.1chr01	Sb02q041950			дезаминаза, предп., экспр.	
							UDP-N-ацетилглюкозамин-долицилфосфат N-	
		LOC_0s07g46640	Bradi1g18800.1chr01	Sb02g041960			ацетилглюкозаминфосфотрансфераза, предп., экспр.	
		LOC_Os07g46700	Bradi1g18760.1chr01	Sb02g042010			РНК-связывающий белок, предп., экспр.	
		LOC_0s07g46710	Bradi1g18740.1chr01	pseudomolecule	brac version0 1500	9973-15011923 B	экспр. белок	
		LOC Os07g46720	Bradi1g18730.1chr01	Sb02q042030			ядерный белок Nop56, предп., экспр.	
		LOC Os07q46750	Bradi1g18690.1chr01	Sb02q042050			фактор элонгации 1-бета, предп., экспр.	
		LOC Os07q46760		Sb02q042060			активатор основной транскрипции 1, предп., экспр.	
					pseudomolecule brac version0 14968812-14967178 Be		белок PPR868-14 с повторяющимся пентатрикопептидом, предп	
		LOC_0s07g46770	Bradi1g18670.1chr01	1_pseudomolecule			экспр.	
		LOC_0s07g46780	Bradi1g18660.1chr01	Sb02g042070			тирозин-специфический транспортный белок, предп., экспр.	
		LOC_Os07g46790	Bradi1g18650.1chr01	Sb02g042100			4-альфа-глюканотрансфераза, предп., экспр.	
		LOC_0s07g46980		Sb02g042150			белок определяющий пол tasselseed-2, предп., экспр.	
		LOC_Os07g46990	Bradi1g18340.1chr01	Sb02g042170			супероксиддисмутаза 2, предп., экспр.	
		LOC Os07q47100	Bradi1g18360.1chr01	Sb02q042190			белок натрий / водородного обмена 2, предп., экспр.	
		LOC_0s07g47110	Bradi1g18380.1chr01	Sb02g042210			гидролаза фосфорного эфира/ транскрипционный фактор, предл., экспр.	
		LOC_0s07g47120	Bradi1g18390.1chr01	Sb02g042220			бета-амилаза, предп., экспр.	
		LOC_Os07g47150	Bradi1g18420.1chr01	Sb02g042240	ZmEvi106880-2		экспр. белок	
		LOC Os07q47201	Bradi1g18460.1chr01	pseudomolecule	brac version0 1482	2704-14816849 B	аденилциклаза, предп., экспр.	
		LOC 0s07q47210	Bradi1g18470.1chr01	Sb02q042280		ZmEvi127679-7	пыльце-специфический пролин-богатый белок АРС, предп., экспр	
		LOC 0s07047250	Bradi1o18490.1chr01	Sb020042310		ZmEvi131619-7	предшественник липазы, предп., экспр.	
							хлоропластный предшественник протеинкиназы АРК1В, предп.,	
		LOC_0s07g47270	Bradi1g18500.1chr01	Sb02g042320		ZmEvi131624-7	экспр.	
		LOC_0s07g47280	Bradi1g18510.1chr01	Sb02g042330			каталитическая субъединица ДНК-полимеразы зета, предп. эксп	
		LOC_0s07g47284		Sb02g042330			каталитическая субъединица ДНК-полимеразы зета, предп. эког	
		LOC_0s07g47290	Bradi1g18550.1chr01	1_pseudomolecule	brac version0 1488	ZmEvi131630-7	ксилоза-изомераза, предп., экспр.	
	fzpF4R2	LOC_0s07g47330	Bradi1g18580.1	Sb02g042400	ZmEvi005249-2	ZmEvi123374-7	branched silkless1, предл, экспр.	
		LOC Os07q47350	Bradi1g18600.1chr01	Sb02g042430		ZmEvi123380-7	Транспортер калия 7, предп., экспр.	
		LOC 0s07q47360		Sb02q042440			белок с «цинковыми пальцами» СW-типа, экспр.	
		LOC_0s07o47370	Bradi1o18310 1chr01	Sb02n042450			белок с повтором пентаточколептила PPR1108-17 преда экспл	

Название маркера	cos	O. sativa [chr7]	B.distachyon [chr1]	S. bicolor [chr2]	Z. mays [ch2]	Z. mays [ch7]	Функции (<i>O. sativa</i>)
		1.0.0.0.07.17.000					белок NIP7 биогенеза рибосомальной субъединицы 60S, предп.,
		LOC_0s0/g4/420	Bradi1g18250.1chr0	pseudomolecule	brac version0 146	84818-14682607 B	еэкспр.
		LOC_0s0/g4/450	Bradi1g18240.1chr0	Sb02g042480	ZmEvi041656-2	ZmEvi131818-7	аналог фактора способствующего цветению 1, предп., экспр.
		LOC_Os07g47470	Bradi1g18220.1chr0	Sb02g042500			гомолог восстановителя фертильности А, предп.
		1.00.0007047400	Bradita19200 1 abr0		brac version0 146	7mEui121020 7	индолил-3-ацетоамидосинтаза GH3.11, индолил-3-
		LOC_0507g47490	Drading 16200, TChro Deadid a 48480, 4 abro	pseudomolecule	brac versiono 146	ZIIIEVI131020-1	ацетоамидосинтаза, экспр.
		LOC_0s07g47500	Dradiig16160.1chr0	S002g042540			гистон-аргинин метилтрансфераза САКМ1, предп., экспр.
		LOC_0s0/g4/510	Brading18170.1chru	S002g042550			белок, связанный со стрессом, предп., экспр.
		LOC_0s0/g4/530	Bradi1g18160.1chr0	Sb02g042560			АТФ связывающий белок, предп., экспр.
		LOC_0s07g47570	Bradi1g18130.1chr0	Sb02g042590			экспр. белок
		LOC 0s07o47580	Bradi1o18120 1chr0	Sb02a042600	ZmEvi044907-2		ядерный белок 1, индуцируемый бета-TGF, проедполагаемый, акспо
		LOC 0s07047590	Bradi1g18090.1chr0	Sb02g042630	2.1121101100112		экспр. белок
		LOC_0s07g47620	2. adding to controlled	cool go i zooo			Универсальный белок стресса преля, экспр
		LOC_0s07g47630	Bradi1o18070 1chr0	1 nseudomolecule	brac version0 145	79020-14583908 B	от на вересителани селок отресска, предл., околр.
		200_0301941000	Bradingroore.reme			0020-14000000 0	белок, содержащий консервативный район, индуцируемый
		LOC Os07q47670	Bradi1q18030.1chr0	Sb02q042700			гипоксией, экспр.
		LOC_Os07g47710	Bradi1g18010.1chr0	Sb02g042710		ZmEvi118863-7	60S рибосомный белок L22-2, предп., экспр.
		LOC_Os07g47750	Bradi1g17980.1chr0	Sb02g042730	ZmEvi022861-2		экспр. белок
		LOC Os07q47760		Sb02q042740			предшественник филлопланина, предп., экспр.
		LOC Os07q47780	Bradi1o17970.1chr0	Sb02q042750		ZmEvi118865-7	рибосомный белок L18, предп., экспр.
		LOC Os07q47820	Bradi1o17950.1chr0	Sb02q042770	ZmEvi044923-2		белок acad10, предп., экспр.
		LOC Os07q47830	-	Sb02q042780		ZmEvi118871-7	предшественник пектинэстеразы-1, предп., экспр.
		LOC 0s07047990		Sb02q042840			предшественник пероксидазы 2. предп., экспр.
		LOC 0s07048010	Bradi1o17870.1chr0	Sb02q042850		ZmEvi127371-7	предшественник пероксидазы 2. предп., экспр.
		LOC 0s07g48020	Bradi1o17860 1chr0	1 pseudomolecule	brac version0 144	ZmEvi127371-7	предшественник перохохидазы 2 предп. аколо
		LOC 0s07048030	Bradi1o17840.1chr0	Sb02q042870			предшественник пероксидазы 2, предп., экспр.
		LOC_0s07g48050	Dradingrio Iorromo	00029012010			преднественник пероксидазы, предп. экспр.
		LOC_0s07g48060		Sb02a042880		ZmEvi127373-7	предшественник катионной пероксилазы 1 преля эксло
		200_0001910000		00029012000		LILLINEIOIO	СВL-взаимодействующая серин-треониновая протеинкиназа 11
		LOC_Os07g48090					предп., экспр.
							СВL-взаимодействующая серин-треониновые протеинкиназа 1
		LOC_0s07g48100	Bradi1g17820.1chr0	Sb02g042920		ZmEvi127366-7	предп., экспр.
		LOC_0s07g48130	Bradi1g17830.1chr0	Sb02g042930		ZmEvi127382-7	транспортер калия 9, предп., экспр.
		LOC_Os07g48160	Bradi1g17730.1chr0	Sb02g042960		ZmEvi122228-7	предшественник а-галактозидазы, предп., экспр.
		LOC_Os07g48180		Sb02g042990	ZmEvi100331-2		фактор транскрипции RF-2, предп., экспр.
:DO1479		LOC Os07q48200	Bradi1g17680.1chr0	Sb02g043000	ZmEvi100329-2	ZmEvi122220-7	белок, содержащий ДНК-связывающий домен ВЗ, экспр.

Таблица 6 – Комбинации праймеров, использованных для изучения геновгомеологов *WFZP-A-B-D* (Dobrovolskaya et al., 2015)

Название	Структура (5' – 3')	Локализация ампликона
скрининг ВАС-	библиотеки	
FZP_F1	CACTGGCTCGGCACCTTC	CDS
FZP_R1	CTCAGGTACCCGGAGTTGTCG	
FZP_F1	CACTGGCTCGGCACCTTC	CDS
FZP_R2	AGGTCGTCCACGTCCTCCC	
Секвенирование	ампликонов	
Геном А		
WFZP_2A_F1	CATGGGCAAATCGGTTAATG	5' район
WFZP_2A_R1	TGGATGAGATGGCGAGGTAG	
WFZP_F2	TCTTGTCAGTGGCAGGCATC	5' район
WFZP_2A_R2	TGGCAGAAGTGAAGTGAGGT	
WFZP_F3	GCTCACAGTCTCAGCAACCA	5'-UTR -CDS
WFZP_2A_R3	CACTGGGCACCGGCATGGAA	
WFZP_2AD_F4	CAGCCAACCTCACTTCACT	CDS
WFZP_2A_R4	GCTAGGGCACCGAAACAAC	
WFZP_F5	ACGACATGGTCGCCTCGT	CDS-3' район
WFZP_2A_R5	GGATCGGGGTGGATAGATTG	
WFZP_2AD_F5	CTCAGAGCCTCAGACCCATT	3' район
WFZP_2A_R5	GGATCGGGGTGGATAGATTG	
геном В		
WFZP_2B_F1	TGGGCTCTGCCTTCACAATCAG	5' район
WFZP_2B_R1	GATGAGATGGCGACCTTGG	
WFZP_2B_F2	GGCACACAAATCCAAACACA	5'район -CDS
WFZP_2B_R2	GCCGT GATCC GCGGC ATTGA	
WFZP_2B_F3	ACAGTGCTCTCAGCCTCTCA	5'-UTR -CDS
WFZP_2B_R3	CGGTGCATTTGCTTCAGTGT	
WFZP_F3	GCTCACAGTCTCAGCAACCA	5'-UTR -CDS
WFZP_2B_R2	GCCGT GATCC GCGGC ATTGA	
WFZP_2B_F4	GAGTGCTCCATGCCG GTGCT	CDS-3' район
WFZP_2B_R4	GCCACTTTAATTCCGCAGGACT	
WFZP_F5	ACGACATGGTCGCCTCGT	3' район
WFZP_2B_R5	GCATTGCTTAATTGGGTGAT	
WFZP_2B_F5	GAAGATCGTGAAGAAGAGTGG	3' район
WFZP_2B_R5	GCATTGCTTAATTGGGTGAT	

Названио	$C_{\text{TDMETMDA}}(5^2 3^2)$	Локализация ампликона				
Пазвание	C I pykrypa (3 - 3)	ампликона				
I CHOM D		-				
WFZP_2D_F1	TGTGCGCGCCGCAAAATCTT	5' район				
WFZP_2D_R1	GGATTTGTGTGCCCTAACCTA					
WFZP_F6	TCTTGGCAGGGGCTTCAAT	5' район				
WFZP_2D_R2	GCCCT GCTGG TGGTA GCCGA					
WFZP_2D_F2	CTCCTCATCTCTTTGGTCCT	5'-CDS				
WFZP_2D_R2	GCCCT GCTGG TGGTA GCCGA					
WFZP_2D_F3	TCAGTTCTGCCATGAGCATC	5' UTR-CDS				
WFZP_2D_R2	GCCCT GCTGG TGGTA GCCGA					
WFZP_2D_F2	CTCCTCATCTCTTTGGTCCT	CDS-3' UTR				
WFZP_2D_R3	GCCACTCTTCTTCTTCGTCG					
WFZP_F5	ACGACATGGTCGCCTCGT	3' район				
WFZP_2D_R4	ACGAAGTCACTACAAGCACA					
Количественная	а ОТ-ПЦР					
WFZP-A						
WFZP_F3	GCTCACAGTCTCAGCAACCA	5'-UTR-CDS				
WFZP_2A_R2	TGGCAGAAGTGAAGTGAGGT					
WFZP-B						
WFZP_F5	ACGACATGGTCGCCTCGT	CDS-3'UTR				
WFZP_2B_R3	CGGTGCATTTGCTTCAGTGT					
WFZP-D						
WFZP_F5	ACGACATGGTCGCCTCGT	CDS-3'UTR				
WFZP_2D_R5	CTGGCTGGTGCATTTGTTG					
Идентификация	н аллеля <i>wfzp-D.1</i>					
WFZP_2D_F3	TCAGTTCTGCCATGAGCATC	CDS				
wfzp-D.1_R*	TGGTCGGGTCGCGTATCTC					
Идентификация	н аллеля <i>wfzp-A.1</i>	-				
WFZP-F7	ATGGCCTTCTCGGAGCATTC	CDS				
WFZP-R3	TGGTCGGGTCGCGTATCTT					

Примечание: * – аллель-специфичный праймер; CDS – кодирующий район гена, 5'(3') - UTR (5'(3') – untranslated region) – 5'(3')-нетранслируемый район гена

Таблица 7 – Гомология предсказанных аминокислотных последовательностей (%) гомеологов WFZP-A-B-D пшеницы, FZP риса и Bradi1g18580.1 Brachypodium (Разработана автором)

	WFZP-A	WFZP-B	WFZP-D	FZP	Bradi1g18580.1
WFZP-A	100	90.65	87.15	63.08	61.77
WFZP-B	90.65	100	92.41	64.62	56.35
WFZP-D	87.15	92.41	100	67.78	57.53
FZP	63.08	64.62	67.78	100	55.59
Bradi1g18580.1	61.77	56.35	57.53	55.59	100

Таблица 8 – Тип и локализация микросателлитных повторов в *WFZP*локусах хромосом 2AS, 2BS и 2DS (Добровольская и др., 2015)

Мотив	SSR-локус	Локализация	SRR-маркер
2AS (CS248B13)			
AG/GA/CT	(GA)6	na	
	(GA)20 ^a	G (5'-район)	*
	$(GA)4(GA)6^{\mathbf{b}}$	na	
	(AG)6	TE (I)	
	(AG)16 ^c	na	CS248B13-1
	(CT)6	G (3'-район)	
AT/TA	(AT)11	na	CS248B13-2
	(AT)7	na	
	(TA)8	TE (II)	
	(TA)19	TE (I)	
	(TA)6 ¹	G (интрон)	
TG/GT	(TG)6	TE (I)	
AGG/GGA	(AGG)6	TE (I)	
	(GGA)5	TE (II)	
TGA	(TGA)7	TE (I)	
	(TGA)2(TGA)4	TE (I)	
СТТ	(CTT)5	TE (I)	
ACA	(ACA)5	TE (I)	
GCC, GCG	(GCC)4(GCG)4 ^d	G (CDS)	CS248B13-3
AGCC	(AGCC)4 ¹	na	CS248B13-4
AAGAA	(AAGAA)4	na	
2BS (CS184F24)			
AG/GA/TC	(AG)7	na	
	(AG)7	TE (I)	
	(GA)7	TE (I)	
	(GA)10	TE (I)	
	(GA)34	na	*
	(TC)6 ^a	G (5'-район)	*
	$(\mathrm{TC})5\text{-}\mathrm{CA}\text{-}(\mathrm{TC})10^{\mathrm{D}}$	na	CS184F24-1
GGC/CGG/GCG	(GGC)5	TE (I)	
	(GGC)19 imp	TE (I)	
	(CGG)5	TE (I)	
	(CGG)5(CGG)4	TE (I)	
075	(GCG)4(GCG)4	TE (I)	
GTG	(GTG)5	TE (I)	
ТТТА	(TTTA)4(TTTA)2		

Мотив	SSR-локус	Локализация	SRR-маркер			
2DS (CS305H5)						
AG/GA/TC	(GA)9 ^c	na				
	$(GA)7(GA)3^{b}$	na				
	(AG)8-G-(GA)12	TE (I)				
	(TC)12 ^a	G (5'-район)	*			
AT/TA	(TA)20	G (5'-район)	CS305H5-1			
	(TA)7	TE (II)				
GC	(GC)6	G (5'-район)				
TCC	(TCC)5	TE (II)				
GAG	(GAG)8	na	CS305H5-2			
GCC, GCG	$(GCC)5, (GCG)4^d$	G (CDS)				
TTAT	(TTAT)4	na				

Примечание: Жирным шрифтом выделены микросателлитные локусы класса I (длина ≥ 20 п.н.). Одинаковая буква в верхнем индексе (^{a,b,c} или ^d) обозначает гомеологичые микросателлитные локусы. ¹ – для данного локуса идентифицирован гомеологичный локус с меньшим числом повторов, чем в заданных критериях поиска; G – ген, TE – мобильный элемент класса I или II, na – не аннотированные последовательности ДНК; 5'-район 3'-район _ И некодирующие последовательности ДНК протяженностью до 1800 п.н., примыкающие к стартовому и терминальному кодонам гена, соответственно; CDS - кодирующий район гена; imp – несовершенный повтор; * – локус расположен на границе контига

Таблица 9 – Микросателлитные маркеры к локусам *WFZP* (Добровольская и др., 2015)

			Полиморфизм
Маркер	Мотив	Структура праймеров	(аллели, п.н.)
		F: 5'-CTCCAAGAAGATCGAGGTGAACAT-3'	
CS248B13-1	(AG)16	R: 5'-TTGTTACCCTACCGATGATGTGTG-3'	163, 167, 171
		F: 5'-GTGCACTTTTGACCTCCCTACACT-3'	
CS248B13-2	(AT)11	R: 5'-ATTTTGGGTTAAGTGGACGTAGCA-3'	432 NP
		F: 5'-CGCTGACTCTACACCTTACCTCGT-3'	
CS248B13-4	(AGCC)4	R: 5'-ACTTTTAATCGAATCGCACACG-3'	406 NP
		F: 5'-CGAGCTACATTTAGTGCATCTGGA-3'	
CS248B13-3	(GCC)4(GCG)4	R: 5'-TGACCGCTTTAGAGCCTTG-3'	427 NP
		F: 5'-CCATGGTGATGTGTGAGTAGTTCC-3'	
CS184F24-1	(TC)15	R: 5'-GTCGTAGAGTAAGGACACCGCAAT-3'	367, 371
		F: 5'-AACAATGATGCAATGAAGGAACAA-3'	
CS305H5-1	(TA)20	R: 5'-CGGGTTTGATTCCTGATGAGTTAG-3'	301, 325, 334
		F: 5'-ACTACACCGACACCAACGTCTTC-3'	
CS305H5-2	(GAG)8	R: 5'-GAAGACTAAGGCATGACTTGGAGG-3'	351 NP

Примечание: NP – неполиморфный фрагмент указанного размера; цифры верхнего индекса обозначают линии и сорта мягкой пшеницы, у которых данные аллели были обнаружены: ^{1, 2, 3, 4, 5} – линии Ruc163, Ruc167, So149, Ruc204, Skle128 (Dobrovolskaya et al., 2009; Dobrovolskaya et al., 2015); ^{6, 7, 8, 9} – сорта Саратовская 29, Скала, Чайниз Спринг и Ренан соответственно (Добровольская и др., 2015)

	Страна	WFZP-A			
Название сорта	происхождения	аллель			
AURORE	AUS	WFZP-A			
BALKAN	YUG	WFZP-A			
SHORTANDINKA	KAZ	WFZP-A			
CHYAMTANG	NPL	WFZP-A			
COPPADRA	TUR	WFZP-A			
COTIPORA	BRA	wfzp-A.1			
CTIPORA	BRA	WFZP-A			
FRUMENTO CUPO	ITA	WFZP-A			
GLENLEA-CAN	CAN	WFZP-A			
GODOLLOI 15	HUN	WFZP-A			
MISKAAGANI	LIB	WFZP-A			
MOCHO DE ESPIGA					
BIANCA	PRT	WFZP-A			
NP120	IND	WFZP-A			
NYU BAY	JPN	wfzp-A.1			
OPAL	DEU	WFZP-A			
PITIC 62	MEX	WFZP-A			
SEU SEUN 27	KOR	WFZP-A			
HOPEA	FIN	WFZP-A			
XERES	ESP	WFZP-A			
ZANDA	BEL	WFZP-A			
ORNICAR	FRA	WFZP-A			
APACHE	FRA	WFZP-A			
CHINESE SPRING	CHN	WFZP-A			
RENAN	FRA	WFZP-A			
SO149	CZE	wfzp-A.1			
САРАТОВСКАЯ 29	RUS	WFZP-A			
НОВОСИБИРСКА 67	RUS	WFZP-A			
СКАЛА	RUS	WFZP-A			
БИЙСКАЯ ОЗИМАЯ	RUS	WFZP-A			
ОМСКАЯ 23	RUS	WFZP-A			
ЧЕЛЯБА 75	RUS	WFZP-A			
BACCA	RUS	WFZP-A			
PACCBET	BLR	WFZP-A			
ФЕСТИВАЛЬ	BLR	WFZP-A			
ПАМЯТИ ВАВЕНКОВА	RUS	WFZP-A			
ТУЛАЙКОВА 100	RUS	WFZP-A			
ФИЛАТОВКА	RUS	WFZP-A			
НОВОСИБИРСКАЯ 40	RUS	WFZP-A			

Таблица 10 – Аллели гена *WFZP-A*, представленные в сортах мягкой пшеницы (Dobrovolskaya et al., 2015)

	Страна	WFZP-A
Название сорта	происхождения	аллель
БЕЗЕНЧУКСКАЯ 98	RUS	WFZP-A
НОВОСИБИРСКАЯ 32	RUS	WFZP-A
ФИШ	RUS	WFZP-A
ТАНЯ	RUS	WFZP-A
КУЛУНДИНКА	RUS	WFZP-A
НОВОСИБИОСКАЯ 31	RUS	WFZP-A
НОВОСИБИРСКАЯ 44	RUS	WFZP-A
НОВОСИБИРСКАЯ 9	RUS	WFZP-A
БАГРАТИОН	RUS	WFZP-A
НОВОСИБИРСКАЯ 15	RUS	WFZP-A

Примечание: WFZP-А – аллель дикого типа, wfzp-A.1 – мутантный аллель

Таблица 11 – Расщепление в популяциях от скрещиваний многоколосковых линий (SS) и линий со стандартным фенотипом колоса (NS) (Dobrovolskaya et al., 2009, 2015)

		F ₁	F ₂ /BC1								
Родители гибридных популяций (аллели WFZP)	Тип скрещивания		Всего		Наблюдае расщепле	~?	р				
			Deero	NS	SS	NS K SS	χ2	1			
Ruc167 (<i>wfzp</i> -A.1 <i>wfzp</i> -D.1)	F ₂	NS	106	80	26	3к1	0.01	0.90–0.95			
x											
So149 (wfzp-A.1 WFZP-D)											
Ruc163 (<i>wfzp-A.1 wfzp-D.1</i>)	F ₂	NS	100	78	22	3к1	0.48	0.50-0.75			
x											
So149 (<i>wfzp-A.1</i> WFZP-D)											
NIL-mrs1 (wfzp-A.1 wfzp-D.1)	F ₂	SS	140	-	140	-	-	-			
X											
Skle128 (<i>wfzp-A.1 wfzp-D.1</i>)											
NIL-mrs1 (wfzp-A.1 wfzp-D.1)	\mathbf{F}_2	SS	140	-	140	-	-	-			
X											
Ruc204 (<i>wfzp-A.1 wfzp-D.1</i>)											
NIL-mrs1 (wfzp-A.1 wfzp-D.1)	F ₂	SS	142	26	116	1к3	4.20	-			
X											
MC1611 (WFZP-A wfzp-D.2)											

		F ₁	F ₂ /BC1									
Родители гибридных популяций (аллели WFZP)	Тип скрещивания		Всего		Наблюдае расщепле	мое ние	χ2	Р				
				NS	SS	NS ĸ SS						
MC1611 (<i>WFZP-A wfzp-D.2</i>) x	F ₂	NS	158	121	37	3к1	0.21	0.50–0.75				
C29 (WFZP-A WFZP-D)												
MC1611 (WFZP-A wfzp-D.2) x C29 (WFZP-A WFZP-D)	BC ₁ (MC1611/S29//MC16 11)	NS	155	77	78	1к1	0.01	0.90–0.95				
$\frac{O29}{MC1611} (WFZP-A wfzp-D.2)$ x $C20 (WFZP A WFZP D)$	BC ₁ (MC1611/S29//S29)	NS	140	140	-	-	-	-				
	F.	NS	135	116	10	3 r 1	86	_				
MC1611 (<i>WFZP-A wjzp-D.2</i>) x	L' 2	110	155	110	17	JKI	0.0	-				
Скала (WFZP-A WFZP-D)						15 к 1	14.2					
Skle128 (<i>wfzp-A.1 wfzp-D.1</i>) x	\mathbf{F}_2	NS	134	124	10	15 к 1	0.34	0.50-0.75				
C29 (WFZP-A WFZP-D)												
Ruc204(<i>wfzp-A.1 wfzp-D.1</i>) x	F ₂	NS	149	128	21	3к1	9.5	-				
C29 (WFZP-A WFZP-D)						15 к 1	15.6					

Примечание: Красным цветом отмечены мутантные аллели, зленым цветом – аллели дикого типа; NS – колос стандартного типа; SS (supernumerary spikelets) – многоколосковый колос

Таблица 12 – Описание SS-морфотипов и мутаций гена *WFZP-D* (Dobrovolskaya et al., 2009, 2015)

Линия	Фенотип	Происхождение	Мутация	WFZP-D
	(морфотип)		в WFZP-D	аллель
NIL-mrs1	MRS			
Ruc163 (mrs1)	MRS	химический	несинонимичная	wfzp-D.1
Ruc167 (<i>mrs1</i>)	MRS	мутагенез	замена в AP2/ERF	
десять V3- линий* (<i>mrs1</i>)	MRS			
Ruc204	HS-GB	не известно	делеция локуса	null-
				аллель
Skle128	HS (TTSW)	спонтанно	делеция локуса	null-
				аллель
So164	HS	скрещивание с вет-		
		вистоколосой фор-	делеция локуса	null-
		мой тетраплоидной		
		пшеницы		аллель
MC1611	HS	химический	нонсенс-мутация	wfzp-D.2
	(слабо выражен)	мутагенез	в AP2/ERF	

Примечание: *линии V3-79-08, V3-82-08, V3-83-08, V3-84-08, V3-85-08, V3-86-08, V3-87-08, V3-88-08, V3-89-08 и V3-90-08. GB (genuine branching) – истинное ветвление; HS (horizontal spikelets) – горизонтальные колоски; MRS (multirow spike) – многорядный колос; TTSW (Tibetan triple spikelet wheat) – Тибетская трехколосковая пшеница



Рисунок 1 – Стратегия разработки COS маркеров пшеницы на основе синтении геномов пшеницы и риса. Слева – графическое изображение хромосомы 2D пшеницы с обозначением делеционных бинов, рядом с хромосомой 2D показаны синтенные блоки хромосом риса 4, 7 и 3 (http://wheat.pw.usda.gov/wEST/binmaps/). Локализация гена *Mrs1* в делеционном бине обозначена красной рамкой (Разработан автором)



Рисунок 2 – (А) Схематическое изображение структуры гена *FZP*, содержащего консервативный домен AP2/ERF и кислый домен C. (Б) Выравнивание нуклеотидных последовательностей генов риса *FZP* (LOC_OS07G47330), кукурузы *BD1* (ZMEVI123374-7) и Brachypodium (BRADI1G18580.1) (частично) Сайты отжига праймеров, разработанных для скрининга BAC-библиотеки пшеницы, отмечены стрелками (Разработан автором)



Рисунок 3 – Принцип создания 2D (двухмерных) пулов BAC-библиотек https://cnrgv.toulouse.inra.fr/en/Services/Screening-services/DNA-Pool-production

	1	2	3	4	- 5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	CS	CS	0	0	IC7	IXC7	IC8	IXC8	IIL7	XL7	IIL8	XL8	CS	CS	0	0	IIIC7	XIC7	IIIC8	XIC8	IVL7	0	IVL8	0
в	CS	0	0	0	VC7	0	VC8	0	VIL7	0	VIL8	0	CS	0	0	0	VIIC7	0	VIIC8	0	VIIIL7	0	VIIIL8	0
С	IL1	IXL1	IL2	IXL2	IC9	IXC9	IC10	IXC10	IIC1	XC1	IIC2	XC2	IIIL1	XIL1	IIIL2	XIL2	IIIC9	0	IIIC10	0	IVC1	0	IVC2	0
D	VL1	0	VL2	0	VC9	0	VC10	0	VIC1	0	VIC2	0	VIIL1	0	VIIL2	0	VIIC9	0	VIIC10	0	VIIIC1	0	VIIIC2	0
E	IL3	IXL3	IL4	IXL4	IC11	IXC11	IC12	IXC12	IIC3	XC3	IIC4	XC4	IIIL3	XIL3	IIIL4	XIL4	IIIC11	0	IIIC12	0	IVC3	0	IVC4	0
F	VL3	0	VL4	0	VC11	0	VC12	0	VIC3	0	VIC4	0	VIIL3	0	VIIL4	0	VIIC11	0	VIIC12	0	VIIIC3	0	VIIIC4	0
G	IL5	IXL5	IL6	IXL6	0	0	0	0	IIC5	XC5	IIC6	XC6	IIIL5	XIL5	IIIL6	XIL6	0	0	0	0	IVC5	0	IVC6	0
н	VL5	0	VL6	0	0	0	0	0	VIC5	0	VIC6	0	VIIL5	0	VIIL6	0	0	0	0	0	VIIIC5	0	VIIIC6	0
	IL7	IXL7	IL8	IXL8	0	0	0	0	IIC7	XC7	IIC8	XC8	IIIL7	XIL7	IIIL8	XIL8	0	0	0	0	IVC7	0	IVC8	0
J	VL7	0	VL8	0	0	0	0	0	VIC7	0	VIC8	0	VIIL7	0	VIIL8	0	0	0	0	0	VIIIC7	0	VIIIC8	0
ĸ	IC1	IXC1	IC2	IXC2	IIL1	XL1	IIL2	XL2	IIC9	XC9	IIC10	XC10	IIIC1	XIC1	IIIC2	XIC2	IVL1	0	IVL2	0	IVC9	0	IVC10	0
L	VC1	0	VC2	0	VIL1	0	VIL2	0	VIC9	0	VIC10	0	VIIC1	0	VIIC2	0	VIIIL1	0	VIIIL2	0	VIIIC9	0	VIIIC10	0
м	IC3	IXC3	IC4	IXC4	IIL3	XL3	IIL4	XL4	IIC11	XC11	IIC12	XC12	IIIC3	XIC3	IIIC4	XIC4	IVL3	0	IVL4	0	IVC11	0	IVC12	0
Ν	VC3	0	VC4	0	VIL3	0	VIL4	0	VIC11	0	VIC12	0	VIIC3	0	VIIC4	0	VIIIL3	0	VIIIL4	0	VIIIC11	0	VIIIC12	0
0	IC5	IXC5	IC6	IXC6	IIL5	XL5	IIL6	XL6	0	0	H2O	H20	IIIC5	XIC5	IIIC6	XIC6	IVL5	0	IVL6	0	0	0	H2O	H2O
P	VC5	0	VC6	0	VIL5	0	VIL6	0	0	0	CS	0	VIIC5	0	VIIC6	0	VIIIL5	0	VIIIL6	0	0	0	CS	0

Рисунок 4 – Расположение ДНК суперпулов ВАС-библиотеки мягкой пшеницы сорта Чайниз Спринг "Tae-B-Chinese Spring" в одном 384-луночном планшете. СS – образцы ДНК сорта пшеницы Чайниз Спринг (позитивный контроль), H2O – вода (негативный контроль), 0 – пустые лунки



Рисунок 5 – Скрининг суперпулов BAC-библиотеки мягкой пшеницы сорта Чайниз Спринг "Tae-B-Chinese Spring". Результаты амплификации с использованием комбинации праймеров FZPF1 FZPR2 на образцах ДНК суперпулов "Tae-B-Chinese Spring" (показаны результаты, полученные на образцах левой половины 384-луночного планшета). Сверху обозначены координаты расположения образца (лунки) в планшете, желтым цветом отмечены «позитивные» лунки (представляют пулы рядов или строк, собранных из пулов 384-луночных планшетов), амплифицирующие фрагменты ожидаемой длины, зеленым цветом обозначен контроль (образец ДНК сорта Чайниз Спринг)

Matrice II												
	IIC1	IIC2	IIC3	IIC4	IIC5	IIC6	IIC7	IIC8	IIC9	IIC10	IIC11	IIC12
IIL1		104	112	120	128	136	144	152	160	168	176	184
IIL2	97	105	113	121	129	137	145	153	161	169	177	185
IIL3	98	106	114	122	130	138	146	154	162	170	178	186
IIL4	99	107	115	123	131	139	147	155	163	171	179	187
IIL5	100	108	116	124	132	140	148	156	164	172	180	188
IIL6	101	109	117	125	133	141	149	157	165	173	181	189
IIL7	102	110	118	126	134	142	150	158	166	174	182	190
IIL8	103	111	119	127	135	143	151	159	167	175	183	191
Matrice IV												
	IVC1	IVC2	IVC3	IVC4	IVC5	IVC6	IVC7	IVC8	IVC9	IVC10	IVC11	IVC12
IVL1		294	302	310	318	326	334	342	350	358	366	374
IVL2	287	295	303	311	319	327	335	343	351	359	367	375
IVL3	288	296	304	312	320	328	336	344	352	360	368	376
IVL4	289	297	305	313	321	329	337	345	353	361	369	377
IVL5	290	298	306	314	322	330	338	346	354	362	370	378
IVL6	291	299	307	315	323	331	339	347	355	363	371	379
IVL7	292	300	308	316	324	332	340	348	356	364	372	380
IVL8	293	301	309	317	325	333	341	349	357	365	373	381
Matrice III												
	IIIC1	IIIC2	IIIC3	IIIC4	IIIC5	IIIC6	IIIC7	IIIC8	IIIC9	IIIC10	IIIC11	IIIC12
IIIL1		199	207	215	223	231	239	247	255	263	271	279
IIIL2	192	200	208	216	224	232	240	248	256	264	272	280
IIIL3	193	201	209	217	225	233	241	249	257	265	273	281
IIIL4	194	202	210	218	226	234	242	250	258	266	274	282
IIIL5	195	203	211	219	227	235	243	251	259	267	275	283
IIIL6	196	204	212	220	228	236	244	252	260	268	276	284
IIIL7	197	205	213	221	229	237	245	253	261	269	277	285
IIIL8	198	206	214	222	230	238	246	254	262	270	278	286

Рисунок 6 – Определение «позитивного» планшета по координатам «позитивных» лунок (суперпулов "Tae-B-Chinese Spring"). Название рядов и строк соответствует положению (координатам) в 384-луночного планшете ДНК суперпула "Tae-B-Chinese Spring". На пересечении рядов и строк находятся номера «позитивных» 384-луночных планшетов: 184, 305 и 248



Рисунок 7 – Выравнивание предсказанных аминокислотных последовательностей гомеологов пшеницы WFZP-A-B-D, риса FZP и кукурузы BD1. AP2/ERF-домен подчеркнут (Разработан автором)


б

а



Рисунок 8 – Определение локализации генов-гомеологов *WFZP* в делеционных бинах и на молекулярно-генетических картах хромосом 2AS, 2BS и 2DS. (а) Черные стрелки показывают точки разрыва делеций, красные – ограничивают делеционные бины, содержащие гомеологи *WFZP*. (б) Частичные молекулярно-генетические карты хромосом 2AS, 2BS и 2D, содержащие *WFZP* локусы. Локализация *WFZP-A* и *WFZP-D* определена при помощи генотипирования с использованием SSR-маркеров *ssrCS248B13-1* и *ssrCS305H5-1*, разработанных к локусам *WFZP* (Dobrovolskaya et al., 2015; Добровольская и др., 2015)



Рисунок 9 – Выравнивание нуклеотидных последовательностей генов-гомеологов *WFZP-A-B-D* с указанием мутаций в мутантных аллелях (Dobrovolskaya et al., 2015)

290



Продолжение рисунка 9



Рисунок 10 – Генетические карты хромосомы 2D, содержащие ген *mrs1* (**a**, **b**), локусы количественных признаков qSS - D (**d**-**f**) и *WFZP-D* (**a**, **b**, **d**-**f**), полученные с использованием картирующих популяций Ruc163 x So149 (**a**), Ruc167 x So149 (**b**), MC1611 x Скала (**d**), Ruc204 x C29 (**e**) Skle128 x C29 (**f**). Графическое изображение хромосомы 2D почти изогенной линии NIL - *mrs1* (**c**), где синим прямоугольником изображена область интрогрессии. Светло красные прямоугольники ограничивают области хромосом с показателями величин LOD, обозначенными под картами хромосом (Dobrovolskaya et al., 2015)



Рисунок 11 – Результаты амплификации 5' районов генов *WFZP-B*, -*G* и гена *FZP* (*Ae. speltoides*) с использованием *WFZP-B*-специфичных праймеров WFZP_2B_F2 и WFZP_2B_R2 на образцах ДНК (1) *Ae. speltoides* 37, (2) *T. militinae* TRI 17488, (3) *T. timopheevii* K-38555, (4, 5) *T. dicoccoides* образцы ERGE33769 и ERGE33780, соответственно, (6) *T. durum* ERGE33795, (7) *T. turgidum* ERGE33819, (8) *T. aestivum* сорт Чайниз Спринг. М – маркер молекулярного веса



2S

Рисунок 12 – Молекулярно-генетическая карта хромосомы 2S Ae. speltoides (картирующая популяция F_2 8 x 37), содержащая микросателитные маркеры и ген *FZP*. Справа – названия маркеров, слева – генетические расстояния в сМ (Dobrovolskaya et al., 2011)