

На правах рукописи

Добровольская Оксана Борисовна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
МОРФОГЕНЕЗА СОЦВЕТИЯ ПШЕНИЦЫ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Новосибирск – 2018

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Научный доктор биологических наук, профессор

консультант: **Салина Елена Артемовна**

Официальные **Лутова Людмила Алексеевна**

оппоненты: доктор биологических наук, профессор, зам. декана по научной работе Биологического факультета ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург

Потокина Елена Кирилловна

доктор биологических наук, и.о. заместителя директора по научной работе, г.н.с. лаборатории мониторинга генетической эрозии растительных ресурсов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» г. Санкт-Петербург

Осипова Светлана Владимировна

доктор биологических наук, в.н.с. лаборатории физиолого-биохимической адаптации растений ФГБНУ «Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН», г. Иркутск

Ведущая ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
организация: Российской академии наук, г. Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 2018 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» в конференц-зале по адресу: 630090 г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 10, тел. (383) 363-49-06, факс: (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <http://www.bionet.nsc.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности проблемы. Пшеница, включая два наиболее широко возделываемых вида, мягкую (*Triticum aestivum* L., $2n=42$, ВВААDD) и твердую (*Triticum durum* Desf., $2n=28$, ВВАА), принадлежит к наиболее важным сельскохозяйственным культурам, являясь основным продуктом питания для 30% населения земного шара (Shewry, 2009). Решение практических задач невозможно без получения новых фундаментальных знаний о структурно-функциональной организации генома растений, без понимания молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе формирования хозяйственно-ценных признаков. К числу таких признаков относятся качественные и количественные характеристики соцветия, непосредственно связанные с продуктивностью растений. Особенности развития соцветия определяют его архитектуру, поэтому фундаментальное значение и очевидную практическую значимость представляют исследования, направленные на идентификацию генов, контролирующих развитие соцветия; изучение структуры, функций и особенностей экспрессии этих генов, а также выявление взаимодействий и идентификация генных сетей.

Генетическая регуляция процессов развития 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 результате проведения работ на модельных видах растений были разработаны методы и предложены стратегии исследований генетической регуляции процессов развития. Однако их применение для изучения важных сельскохозяйственных культур со сложными геномами таких, как мягкая пшеница, не всегда представляется возможным. В частности, позиционное клонирование было затруднено отсутствием референсного генома пшеницы, который стал доступен в 2017 г. (IWGSC Reference Sequence v1.0, <http://www.wheatgenome.org/>). Вместе с тем, пользуясь подходами сравнительной геномики, в основе которых лежит синтения (сходство групп сцепления у организмов, относящихся к разным таксономическим группам), с помощью позиционного клонирования были выделены и детально охарактеризованы отдельные гены пшеницы. Среди них наиболее полно изучены основной ген доместикации – *Q* (Simons et al., 2006; Debernardi et al., 2017), ген, контролирующий реакцию на фотопериод *PHOTOPERIOD-1* (Beales et al., 2007; Boden et al., 2015), гены, определяющие тип развития *VERNALIZATION 1, 2, 3* (Yan et al., 2004, 2006; Shimada et al., 2009). 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). Генетическая регуляция

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, изучена в меньшей степени. Было установлено, что наряду с высоко консервативными путями регуляции развития соцветий злаков, существуют блоки или отдельные гены в их составе, регулирующие развитие специфических для некоторых таксонов структур соцветия (Tanaka et al., 2013). Изучение таких генов и 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 предполагают наличие особенностей и в генетической регуляции его развития.

Исследование генетического контроля формирования многоцветкового колоска пшеницы, определение консервативных и специфических 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.

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. Данная работа является первым комплексным исследованием генетических механизмов, управляющих развитием соцветия пшеницы на стадии формирования колоска с применением методов световой и электронной микроскопии, классической генетики, методов анализа кариотипов, современных подходов молекулярной генетики и геномики, выполненном на уникальной коллекции генетических моделей – линий пшеницы с нарушениями морфогенеза соцветия.

В настоящей работе получен ряд новых приоритетных результатов исследований генетических механизмов, регулирующих развитие соцветия 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, определена 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 принадлежат разным генетическим путям регуляции развития. Впервые экспериментально доказано наличие генов *RS (Ramified Spike)*, участвующих в контроле развития колоска пшеницы, и показано их взаимодействие с геном *SHR2*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Предложена стратегия изучения морфогенеза соцветия растений со сложными аллополиплоидными геномами, которая включает в себя комплекс экспериментальных исследований, выполненных на уникальных моделях – коллекциях мутантов различного происхождения со сходными нарушениями морфогенеза соцветия, принадлежащих как одному виду, так и различным видам в пределах одного

полиплоидного ряда рода *Triticum* L. Разработанная в данной работе стратегия 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 является ценным генетическим материалом для дальнейших всесторонних исследований по генетике пшеницы: идентификации новых генов, управляющих развитием соцветия, установления их локализации в геноме, изучения их структурно-функциональной организации.

Разработанные в ходе выполнения исследований новые молекулярные ДНК маркеры (COS, SSR) используются в фундаментальных и прикладных исследованиях по генетике пшеницы.

Разработанный в данной работе метод определения функциональной роли генов на основе использования мутантов разного происхождения с однотипными изменениями морфогенеза соцветия будет востребован для изучения функций различных генов пшеницы и других видов растений, в особенности тех видов, у которых функциональная оценка генов затруднена. 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 работ фондом РФФИ (гранты №№ 10-04-01458а, 12-04-00897а, 13-04-90932, 15-04-05371а, 18-04-00483а).

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

Методология и методы диссертационного исследования. При выполнении диссертационного исследования использован комплексный подход, сочетающий методы световой и электронной микроскопии, методы классической генетики и современные подходы молекулярной генетики и геномики растений. 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 проявления 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. 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 геномики позволили определить гены-кандидаты на роль генов, управляющих процессами развития соцветия пшеницы. Для выделения генов в аллополиплоидном геноме мягкой пшеницы был использован метод позиционного клонирования.

Уникальность используемых экспериментальных моделей, которые включают коллекцию линий пшеницы с аномалиями морфогенеза соцветия, наряду с применением современных методов анализа генома растений и методов микроскопии сделали работу полностью оригинальной.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Изменения ранних этапов развития соцветия пшеницы, связанные с нарушением установления идентичности флоральных меристем, приводят к формированию соцветий 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 соцветий семейства Злаки. Вклад гомеологичных копий гена *WFZP* в контроль 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 разных генетических моделей (мутанты разного происхождения, изогенные линии, делеционные линии, серии 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 с использованием серии мутантов 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: Первой, Второй, Третьей и Четвертой Международных конференциях «Генетика, геномика и биотехнология растений» (г. Новосибирск, Россия, 2010, 2015; г. Иркутск, Россия, 2012; г. Алма-Аты, Казахстан, 2017); Пятнадцатой международной конференции Европейского объединения по генетике злаков (EWAC) (г. Нови-Сад, Сербия, 2011 г.); международной конференции «Генетические ресурсы и геномика пшеницы» (г. Новосибирск, Россия, 2011); Европейском заседании по геномике растений (г. Стамбул, Турция, 2011); Восьмой и Девятой Международных конференциях по биоинформатике геномной регуляции и структурной/системной биологии (BGRS) (г. Новосибирск, Россия, 2014, 2016); VI съезде ВОГиС (г. Ростов-на-Дону, Россия, 2014); Международной конференции «Беляевские чтения», посвященной 100-летию академика АН СССР Д.К. Беляева (г. Новосибирск, Россия, 2017); Второй Всероссийской конференции с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (г. Новосибирск, Россия, 2017).

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

Объем и структура работы. 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 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. Обработка результатов секвенирования последовательностей ДНК в составе ВАС-клонов выполнена в сотрудничестве с коллегами из INRA (г. Клермон-Ферран, Франция). Анализ кариотипов был проведен в сотрудничестве с д.б.н. Е.Д. Бадаевой (Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва) и к.б.н. И.Г. Адониной (ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 является литературным обзором, в котором представлены сведения об основном объекте исследований – мягкой пшенице *T. aestivum*. Рассматриваются эволюционные аспекты происхождения злаков и особенности организации их геномов. Отдельный раздел посвящен анализу литературы о генетической регуляции развития соцветия злаков, обобщены результаты современных работ и представлений о морфогенезе соцветий различных представителей злаков. Представлена ретроспектива научных исследований, посвященных созданию и изучению многоколосковых форм пшеницы.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Растительный материал. Объектом исследований послужили линии пшеницы с нестандартными морфологическими типами (морфотипами) колоса (Таблица 1). В работе использовались тринадцать линий мягкой пшеницы *T. aestivum* (BBAADD) морфотипа MRS (multirow spike, многорядный колос); многоколосковые линии *T. aestivum* разного происхождения: Skle128, Ruc204, So164, Ruc130, MC1611, Ruc57, Ruc62, MC1611, представляющие различные морфотипы колоса (Таблица 1); ветвистоколосые линии КТ 3–24 *T. monococcum* L. (A^mA^m), R-107 *T. durum* Desf. var. *ramosoobscurum* Jakubz. (BBAA), К-40750 *T. turgidum* L. (BBAA); многоколосковая линия морфотипа f-tR (false-true ramification, ложно-истинное ветвление) PI 67339 *T. turgidum*; линии *T. aestivum* со спиральным расположением колосков на колосовом стержне Ruc 30-11 и Ruc 34-11. Кроме того, в исследованиях использовались линии и сорта пшеницы со стандартным фенотипом колоса *T. aestivum*: Новосибирская 67 (Н67), Саратовская 29 (С29), Скала и линия So 149-1-02 (So149); *T. durum* – Langdon 222 (LD222); *T. sinskajae* A. Filat. et Kurk. (A^mA^m) – PI 418587. Использовали сорт Чайниз Спринг *T. aestivum* и полученные на его основе нулли-тетрасомные линии N2AT2B, N2BT2D, N2DT2B, делеционные линии, несущие терминальные делеции хромосом 2-й гомеологичной группы (Sears, 1954). Делеционные линии были любезно предоставлены д-ром А. Бёрнером (Dr. A. Börner, IPK, Гатерслебен, Германия).

Для изучения особенностей наследования признаков, проведения тестов на аллелизм и молекулярно-генетического картирования в рамках диссертационной работы были получены следующие популяции гибридов: популяции F₂ Ruc163/So149 и Ruc167/So149 для изучения особенностей наследования признака MRS и молекулярно-генетического картирования гена *mrs1*; популяции F₂ Ruc204/C29 и Skle128/C29 для оценки вклада делеций хромосомы 2DS в определение признака «многоколосковость»; популяция F₂ MC1611/Скала для картирования QTL, определяющих многоколосковость линии MC1611; популяции BC₁ MC1611/S29//MC1611 и MC1611/C29//C29 для изучения особенностей наследования признака и определения аллельных вариантов гена *WFZP-D*; популяции F₂ от скрещиваний линии NIL-*mrs1* и многоколосковых линий

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

Вид	Линия	Морфотип	Особенности фенотипа колоса	Происхождение
<i>T. aestivum</i>	Ruc163 ¹	MRS	Кластер из множественных сидячих колосков (до 10-и) на уступах колосового стержня.	<p>Донор признака MRS – ветвистоколосая форма мягкой пшеницы Ra1², полученная в результате химического мутагенеза.</p> <p>Маркирующий признак почти изогенной линии NIL-<i>mrs1</i> перенесен от линии KM240 (донор MRS-признака этой линии – Ra1), рекуррентным родителем являлась линия сорта мягкой яровой пшеницы Новосибирская 67.</p>
	Ruc167 ¹			
	V3-79-08 ¹			
	V3-82-08 ¹			
	V3-83-08 ¹			
	V3-84-08 ¹			
	V3-85-08 ¹			
	V3-86-08 ¹			
	V3-87-08 ¹			
	V3-88-08 ¹			
	V3-89-08 ¹			
	V3-90-08 ¹			
	NIL- <i>mrs1</i> 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.	

Продолжение Таблицы 1

Вид	Линия	Морфотип	Особенности фенотипа колоса	Происхождение
<i>T. aestivum</i>	MC1611 ⁴	HS	По паре сидячих колосков на уступах нижней части колоса.	Индукцированный мутант (НММ-мутагенез), исходный сорт Саратовская 29
	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.
<i>T. monococcum</i>	КТ 3–24 ³	GB	Ветвистый колос.	Индукцированный мутант.
<i>T. durum</i>	R-107 ³	HS-GB	Дополнительные сидячие колоски на уступах или ветвистый колос.	Ветвистоколосый образец, Дагестан.
<i>T. turgidum</i>	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.
<i>S. cereale</i>	D40 ⁵	<i>monstrosum</i>	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. НММ – нитрозометилмочевина. NSGC USDA-ARS – National Small Grain Collection, United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service

Ruc204, Skle128 и MC1611 для выполнения теста на аллелизм; гибриды F₂ Ruc 30-11/H67 для изучения типа наследования признака SCR; популяции F₂ PI 67339/R-107 и PI 67339/K-40750 для изучения возможного взаимодействия между генами *WFZP* и *SHR2*; популяция F₂ R107/K-40750 для выполнения теста на аллелизм. Изучение особенностей наследования и молекулярно-генетическое картирование гена, детерминирующего признак *monstrosum* (колос с многочисленными дополнительными колосками на уступах, монстрозный колос) ржи посевной *Secale cereale* L., проводились на популяции F₂, 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, гибридов F₁ и F₂ были любезно предоставлены д.б.н. А.В. Войлоковым (Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Санкт-Петербург).

Растения выращивали в условиях тепличного комплекса и в полевых условиях на базе селекционно-генетического комплекса ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск. Оценку фенотипов колоса проводили после полного созревания растений. Многоколосковость описывали либо как качественный признак, учитывая наличие/отсутствие дополнительных колосков на уступах колосового стержня, либо как количественный признак, разделяя популяции гибридов на фенотипические классы в зависимости от степени проявления признака. Фенотипы линий со спиральным расположением колосков на колосовом стержне и полученных на их основе гибридов оценивали по наличию/отсутствию спирального скручивания колосового стержня. Соответствие фактического расщепления теоретически ожидаемому в популяциях гибридов оценивали по критерию χ^2 (Рокицкий, 1973).

Световая и сканирующая электронная микроскопия (Scanning Electron Microscopy, SEM). 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 Co. Hitachi, Ltd, Япония) при постоянном ускоряющем напряжении 15 кВ и степени разрядки 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 Hitachi TM-1000. Каждая стадия развития соцветия была изучена не менее, чем на 5–7 образцах каждой линии. Анализ развивающихся соцветий выполнен автором на базе ЦКП микроскопического анализа биологических объектов Центрального сибирского ботанического сада СО РАН (г. Новосибирск).

Геномную ДНК выделяли из проростков или листьев растений согласно методу Plaschke и соавт. (1995). РНК выделяли из развивающихся соцветий, листьев и корней растений сорта Чайниз Спринг. Выделение и очистку РНК проводили с использованием наборов реагентов «ZR Plant RNA MiniPrep™» (Zymo Research Corp., США), «RNase-free DNase set» и «RNeasy MinElute Cleanup Kit» (Qiagen, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. кДНК синтезировали из 0,5 мг суммарной РНК с помощью обратной транскрипции, используя олигонуклеотидную заправку (dT)₁₅ и набор реагентов «Transcriptor first strand cDNA synthesis kit» (Roche Diagnostics, Германия). Количественная ОТ-ПЦР проводилась в трех повторностях на кДНК с использованием набора реагентов «LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master» (Roche Diagnostics) и системы LightCycler® 480 (Roche Diagnostics) согласно инструкциям производителя. Анализ данных ПЦР в реальном времени осуществлялся с использованием программного обеспечения LightCycler®480 версии 1.5.0 с помощью порогового метода сравнения графиков накопления ДНК; эффективность ПЦР для каждого гена определялась по последовательным разбавлениям образца. Для стандартизации количества кДНК матрицы проводилась количественная ОТ-ПЦР с праймерами к референсному гену Ta.304.3 пшеницы.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили по стандартному протоколу. Специфические праймеры конструировали с помощью программы Primer3 (Untergasser et al., 2012). Электрофоретический анализ геномной ДНК и ПЦР-продуктов проводили согласно Maniatis и соавт. (1982). Реакцию секвенирования проводили с помощью набора для секвенирования «ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing ready reaction kit» (Perkin Elmer). Продукты секвенирующих реакций анализировали на приборе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer). Поиск гомологии нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с использованием алгоритмов FASTA и BLAST (Altschul et al., 1990) в базах данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/Database/), GRAINGENE (<http://wheat.pw.usda.gov/>), TREP (<http://wheat.pw.usda.gov/>) и REPBASE (www.girinst.org). Множественное выравнивание последовательностей и их кластерный анализ выполнялись с помощью программ Clustal W (version 1.7; Thompson et al., 1994).

Скрининг ВАС-библиотеки «Tae-B-Chinese Spring», полученной на основе сорта Чайниз Спринг *T. aestivum* в INRA – CNRGV (г. Тулуза, Франция) (<http://cnrgv.toulouse.inra.fr/>), проводили по протоколу Dibarі с соавт. (2012). Секвенирование ВАС-клонов проводили на пиросеквенаторе GS Junior (Roche) в соответствии с протоколом производителя, на платформе GENTYANE (UMR-1095 GDEC, Клермон-Ферран, Франция). Ре-секвенирование генов-гомеологов *WFZP* многоколосковых линий пшеницы и линий со стандартной морфологией колоса проводили методом Сэнгера.

Для молекулярного-генетического картирования и установления геномного состава изучаемых линий использовали микросателлитные (Simple Sequences Repeats, SSR) маркеры *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), *Xrms*, *Xscm* (Korzun et al., 2001), а также маркеры, разработанные нами к локусам *WFZP-A, -B, -D* (Добровольская и др., 2015). SSR-анализ проводился согласно протоколам Röder с соавт. (1998) и Nicot с соавт. (2004). При разработке новых SSR-маркеров использовались программы «SSR locator» для идентификации SSR-повторов (Maia et al., 2008) и «Primer3» для разработки праймеров к SSR-локусам (Untergasser et al., 2012). Сравнительное картирование проводилось с использованием COS (Conserved Ortholog Set) - SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) маркеров по протоколу Quraishi с соавт. (2009). Построение молекулярно-генетических карт проводилось с помощью компьютерной программы MAPMAKER 2.0 (Lander et al., 1987). Консенсусные молекулярно-генетические карты хромосом конструировали с помощью программы BioMercator версии 2.1 (Arcade et al., 2004). Картирование локусов количественных признаков (QTL) проводили с применением программы MapQTL 5 (van Ooijen, 2004).

C-дифференциальное окрашивание проводили по ранее 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). Флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с зондами на основе клонированных последовательностей ДНК (pSc119.2 и pAs1) проводили в соответствии с опубликованной методикой (Salina et al., 2006).

Глава 3. Изучение особенностей развития соцветия линий пшеницы с нестандартными морфотипами колоса

3.1 Особенности строения колоса многоколосковых линий пшеницы. Соцветие пшеницы представляет собой сложный колос, на уступах колосового стержня которого расположено по одному сидячему колоску – элементарному соцветию злаков, содержащему цветки (Цвелев, 1976). Наличие колоска является характерной особенностью соцветия всех злаков, исключение составляют несколько рано дивергировавших эволюционных линий (Malcomber et al., 2006). Число колосков на уступе колосового стержня является важной таксономической характеристикой (Muramatsu, 2009). В норме у пшеницы *Triticum* L. на уступах колосового стержня закладывается по одному колоску и развитие дополнительных колосков встречается редко (Дорофеев, 1979). Многоколосковые/SS (supernumerary spikelet, SS) линии характеризуются формированием сверхчисленных сидячих колосков на уступах колосового стержня или на расположенных на

уступах «веточках».

В зависимости от особенностей расположения дополнительных колосков на уступах и их взаимной ориентации выделяют различные морфотипы колоса (Martinek, 1998). На начальном этапе работы была сформирована фенотипическая коллекция линий пшеницы с нестандартными морфотипами колоса (Таблица 1). Визуальная оценка колоса многоколосковых SS (supernumerary spikelets)-линий ди-, тетра- и гексаплоидных видов пшеницы выявила группы, обозначенные в соответствии с предложенной д-ром П. Мартинекком номенклатурой (Таблица 1). Основные отличительные особенности групп касались числа дополнительных колосков на уступах, их ориентацией относительно оси колоса, а также наличия/отсутствия удлиненных вторичных осей колоса («веточек»), которые у линий различались по длине (Таблица 1, Рисунок 1).

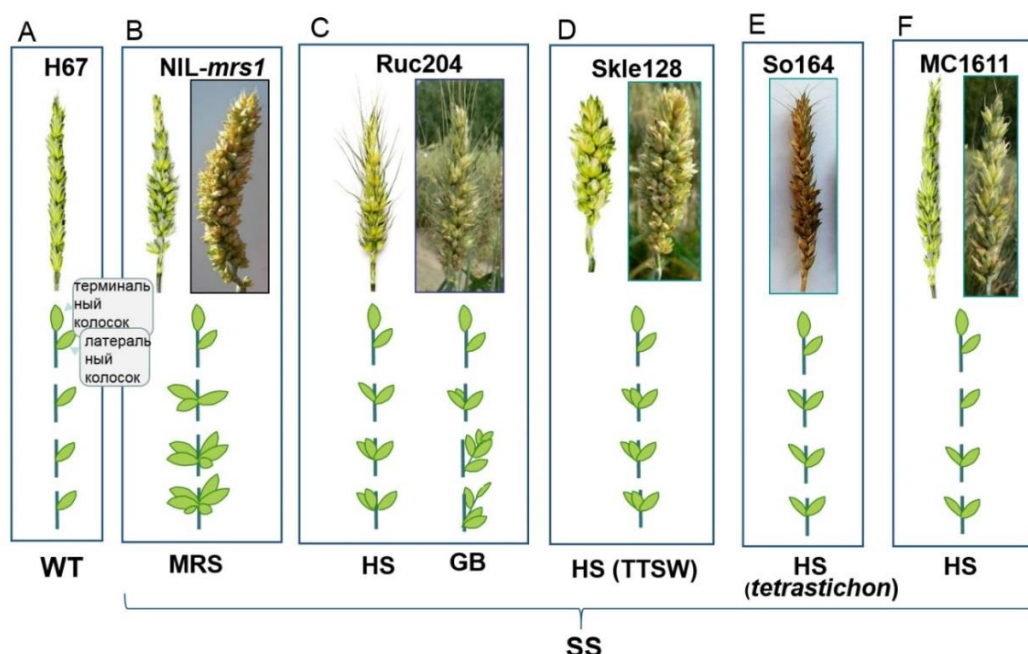


Рисунок 1 – Фенотипы колоса линий мягкой пшеницы стандартного типа (A) и морфотипов MRS (B), HS-GB (C), HS (TTSW) (D), HS (E, F). B-D, F – колосья линий, выращенных в полевых условиях (справа) и условиях теплицы (слева). H67 (Новосибирская 67), NIL-*mrs1*, Ruc204, Skle128, So164, MC1611 – линии мягкой пшеницы. 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 трехколосковая пшеница, WT – дикий тип (Dobrovolskaya et al., 2015)

3.2. Изучение особенностей развития соцветий многоколосковых линий пшеницы с применением методов микроскопии. Детальный анализ особенностей развития соцветий многоколосковых линий мягкой пшеницы *T. aestivum* с использованием световой и сканирующей электронной микроскопии проводился на моделях: (1) почти изогнутая линия NIL-*mrs1* (морфотип MRS, multirow spike) – рекуррентный родитель H67 (стандартный колос) и (2) мутант MC1611 (HS, horizontal spikelets) – линия исходного сорта C29. Кроме того, изучали особенности развития

соцветий многоколосковых линий Skle128, Ruc204, Ruc62, Ruc57.

Было обнаружено, что изменения в развитии соцветия NIL-*mrs1* 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 90° по отношению к меристемам первичного колоска (Рисунок 2). Изменения затрагивают вторичные аксиальные меристемы либо всего колоска, либо только его базальной части (Рисунок 2). Колосковые чешуи первичного колоска различимы только на ранних этапах развития колоска. Развитие соцветий линий MC1611, Skle128 (HS, horizontal spikelets) и Ruc204 (GB, genuine branching) характеризовалось сходными изменениями, которые 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. Различия в развитии соцветий между морфотипами MRS, HS и GB носили количественный характер и были связаны с разным числом цветковых меристем, замещенных на эктопические колосовые меристемы, и неодинаковой степенью удлинения оси колоска. Анализ развивающихся соцветий мутанта КТ 3–24 *T. monococcum*, линий R-107 *T. durum* и K-40750 *T. turgidum*, отнесенных к морфотипу GB (genuine branching), показал характер изменений идентичный обнаруженным у линий морфотипов MRS/HS/GB мягкой пшеницы (Добровольская и др., 2014б; Dobrovolskaya et al., 2015, 2017). На основании полученных результатов все линии морфотипов MRS/HS/GB были отнесены к одной группе с нарушениями морфогенеза соцветия (далее – группа I). Таким образом, впервые было показано, что в основе формирования многоколосковых морфотипов с сидячими дополнительными колосками (MRS, HS) и ветвистостью колоса (GB) лежат однотипные изменения морфогенеза соцветия (Dobrovolskaya et al., 2015).

Изучение особенностей развития соцветия линии PI 67339 *T. turgidum* морфотипа «ложно-истинное ветвление» (false-true ramification, f-tR) показало характер изменений отличный от обнаруженных у линий группы I. Изменения затрагивали установление идентичности вторичных аксиальных меристем соцветия (в норме развиваются как флоральные), но не на начальной стадии развития колоска, как это происходило у линий морфотипов MRS/HS/GB, а на более поздних этапах его развития, когда закладывается и дифференцируются 3-я и последующие аксиальные меристемы второго порядка. Кроме того, наблюдались изменения характера развития колосковой меристемы, в результате которых она становится детерминированной и закладывается терминальный эктопический колосок. Нарушения установления идентичности цветковых меристем дистальной части колоска сопровождались сменой филлотаксиса (Dobrovolskaya et al.,

2017). Учитывая особенности развития соцветия, линия PI 67339 морфотипа f-tR была отнесена ко второй группе (II) линий с нарушениями морфогенеза.

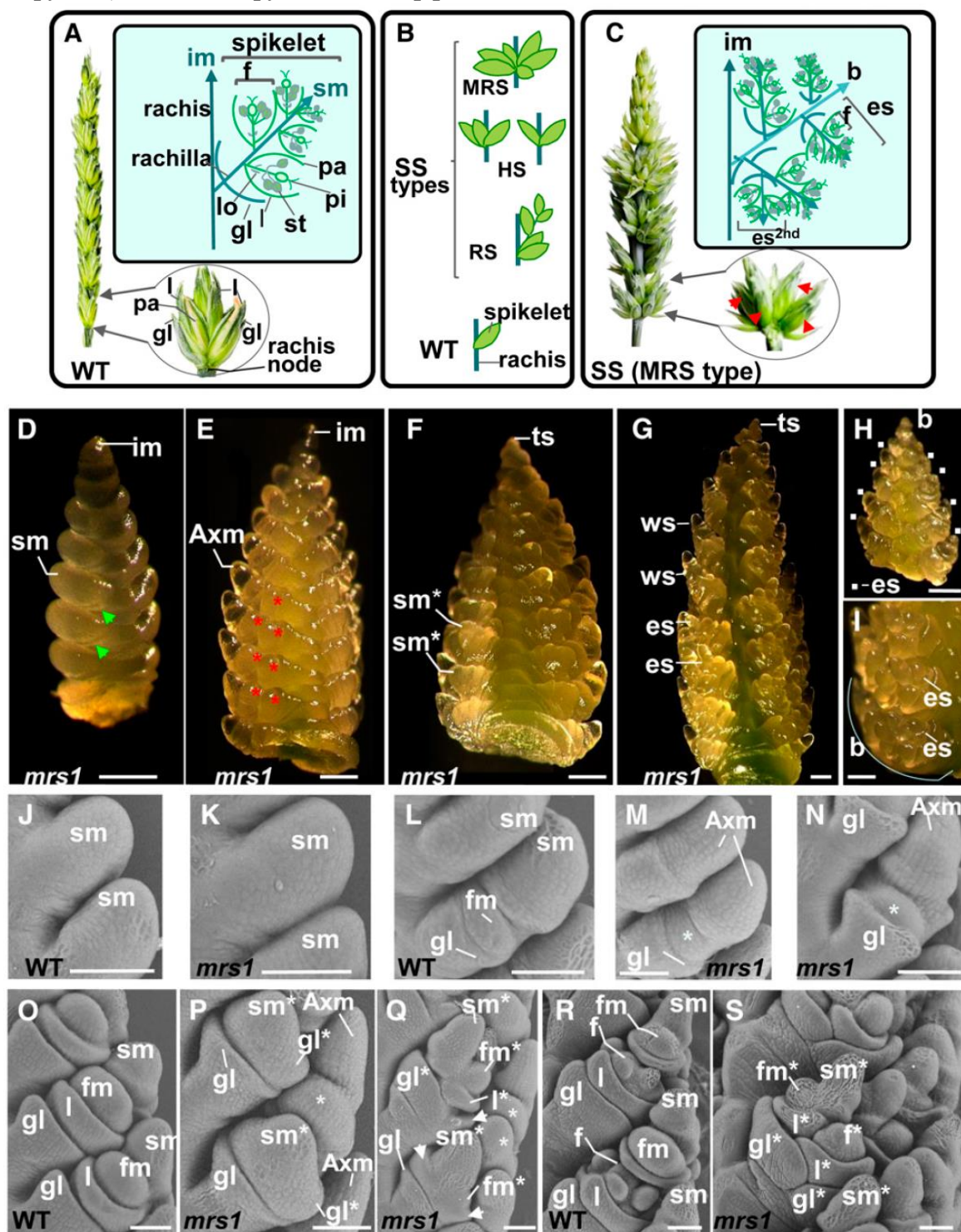


Рисунок 2 – Многоколосковый фенотип колоса пшеницы. (A) Колос (слева), колосок (справа) стандартного типа линии Новосибирская 67 (Н67) и схематическое изображение строения колоска дикого типа (в верхней части). (B) Схематическое изображение различных многоколосковых морфотипов пшеницы: MRS – многорядный колос; HS – горизонтальные колоски, RS – ветвистый колос. WT (wild-type) – дикий тип (spikelet – колосок; rachis – ось колоса, rachilla – ось колоска). (C) Колос линии NIL-*mrs1* с кластером колосков на уступах колосового стержня (дополнительные колоски отмечены красными стрелками), и схематическое изображение строения колоска морфотипа MRS линии NIL-*mrs1*. (D–G) Изучение особенностей развития

соцветия линии *NIL-mrs1* при помощи световой микроскопии. (D) Стадия дифференцировки колоска, стрелками обозначены примордии колосковых чешуй. (E и F) Ранняя стадия дифференцировки цветка (вторичные аксиальные меристемы, дающие начало эктопическим колоскам (es, ectopic spikelet) отмечены 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 (b), отделенная от колосового стержня соцветия *NIL-mrs1*. (I) Расположение эктопических колосков на уступе колоска *NIL-mrs1*. Масштаб: 0.25 мм. (J–S) SEM-анализ соцветий H67 (WT) и *NIL-mrs1* (MRS) на различных стадиях развития. (J и K) Стадия дифференцировки колоска соцветий (J) дикого типа H67 и (K) MRS-типа. (L) Ранняя стадия дифференцировки цветка, закладка цветковых меристем в соцветии H67. (M и N) Дифференцировка вторичных аксиальных меристем (AxM), обозначенных звездочками, у линии *NIL-mrs1*. (O) Ранняя стадия развития цветка H67 (WT). (P и Q) Развитие эктопических колосковых чешуй (gl* и обозначены стрелками), цветковых чешуй колоска линии *NIL-mrs1*. (R) соцветие H67 на стадии дифференцировки цветка. (S) развитие эктопических колосков в составе первичного колоска *NIL-mrs1*. Масштаб: 100 мкм. Обозначения: es^{2nd} – эктопический колосок второго порядка, f (floret) – цветок, fm (floral meristem) – флоральная (цветковая) меристема, gl (glume) – колосковая чешуя, im (inflorescence meristem) – апикальная меристема соцветия, l (lemma) – нижняя цветковая чешуя, lo (lodicules) – лодиккулы, pa (palea) верхняя цветковая чешуя, pi (pistil) – пестик, ts (terminal spikelet) – терминальный колосок, sm (spikelet meristem) – колосковая меристема, st (stamen) – тычинка. Все обозначения органов эктопического колоска отмечены звездочкой (*) (Dobrovolskaya et al., 2015)

Особенности в развитии соцветий линий *Ruc57* и *Ruc62* морфотипа VSS (vertical sessile spikelets) принципиально отличались от описанных выше (группы I-II) и не затрагивали развитие первичного колоска, при котором дополнительные колоски развиваются в составе (как часть) первичного колоска, а были связаны с закладкой и развитием дополнительных колосков, расположенных под первичными колосками. Развитие дополнительных колосков не сопровождалось сменой филлотаксиса. Линии были выделены в отдельную группу линий с нарушениями морфогенеза соцветия (группа III).

3.3 Изучение ранних этапов развития соцветия и особенности наследования признака SCR линий мягкой пшеницы. В норме у пшеницы колоски располагаются двумя параллельными рядами вдоль оси колоса, формируя двурядный колос. Линии *Ruc 30-11* и *Ruc 34-11* морфотипа SCR (screwed spike rachis) мягкой пшеницы характеризуются спиральным расположением колосков вдоль оси колосового стержня. Анализ развивающегося соцветия SCR-линий не обнаружил изменений начальных этапов развития. Закладывающиеся первичные аксиальные (колосковые) меристемы располагались поочередно и формировали два параллельных ряда, что характерно для *T. aestivum* и для представителей *Pooidea* в целом. 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. Мы показали, что SCR наследуется как доминантный

моногенный признак (Добровольская и др., 2017).

Анализ развивающихся соцветий многоколосковых линий, принадлежащих различным морфотипам, позволил выделить три основные группы с однотипными изменениями в развитии соцветий. В первых двух группах (I, II) дополнительные колоски развивались в составе изменённого первичного колоска и обнаруженные изменения в развитии касались установления идентичности флоральных меристем базальной части или всего колоска (I), или только дистальной части колоска (II), и сопровождалась сменой филлотаксиса.

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 линии с однотипными нарушениями морфогенеза (Добровольская и др., 2014б, 2017; Dobrovolskaya et al., 2015, 2017). Выявленные различия развития соцветий предполагают различные нарушения генетической регуляции развития соцветия представителей отдельных групп (I, II, III) с нарушениями морфогенеза соцветия, а также линии морфотипа SCR. Охарактеризованные линии представляют модели 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, 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 SSR маркеров. Для сравнительного картирования использовали COS - SSCP маркеры пшеницы, которые характеризует высокая консервативность в геномах злаков. При построении консенсусных карт хромосом пшеницы использовали информацию о положении на картах хромосом SSR, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) и COS-маркеров. Методы картирования генов и локусов количественных признаков, включая модифицированный балк-анализ, были апробированы и адаптированы для решения задач диссертационной работы (Castro et al., 2005, 2008; Dobrovolskaya et al., 2007, 2008, 2011; Добровольская и др., 2009).

4.1. Молекулярно-генетическое картирование гена *mrs1*, детерминирующего признак MRS. Признак MRS находится под моногенным рецессивным контролем. Мутантный аллель, детерминирующий MRS (обозначен *mrs1*) картирован в хромосоме 2DS. *Mrs1* тесно сцеплен с

SSR-маркерами *Xgwm988*, *Xgwm484* и ко-сегрегирует с *Xwmc453* (Рисунки 3а, 3б).

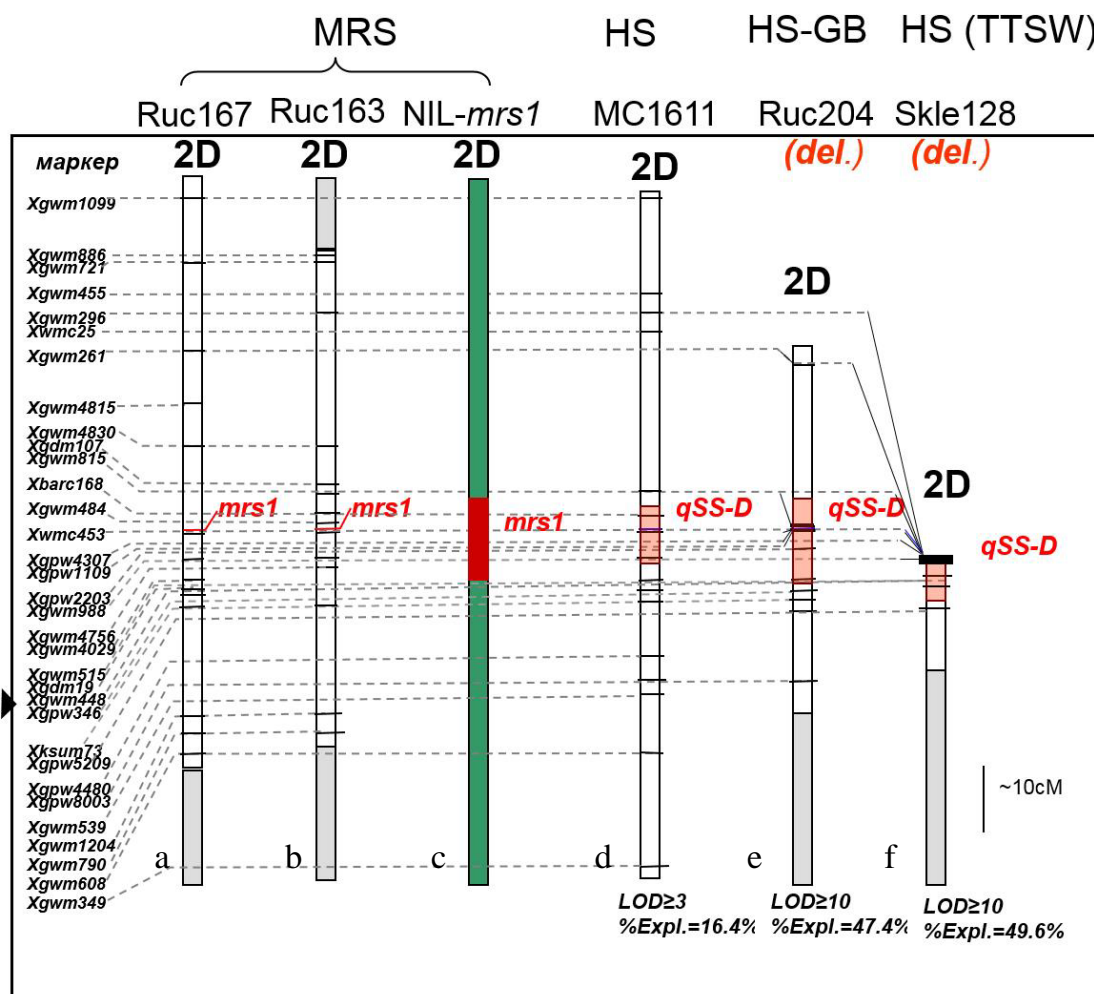


Рисунок 3 – Молекулярно-генетические карты хромосом 2D, содержащие ген *mrs1* (а, б) и локусы количественных признаков *qSS-D*, определяющие многоколосковые фенотипы пшеницы (d-f). Графическое изображение хромосомы 2D почти изогенной линии *NIL-mrs1* (с), красным прямоугольником обозначена область интрогрессии. Родители картирующих популяций с многоколосковыми фенотипами (Ruc 137, 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) приведены над обозначениями родителей картирующих популяций. Светло-красные прямоугольники ограничивают области хромосом с показателями величин LOD, обозначенными под картами хромосом. ► – центмера (Dobrovolskaya et al., 2015)

С использованием делеционных линий сорта пшеницы Чайниз Спринг была определена локализация гена *Mrs1* в делеционном бине (участке хромосомы, ограниченном точками разрыва и воссоединения делеций) 2DS-5 (FL 0.47–1.0), занимающем 53% дистального района короткого плеча хромосомы 2DS (Dobrovolskaya et al., 2008, 2009). На сконструированной частичной консенсусной молекулярно-генетической карте хромосомы 2D, содержащей локус *Mrs1*, SSR и RFLP маркеры, фланкирующие ген RFLP-локусы были ранее отнесены к богатому генами району 2S0.8, следовательно, *Mrs1* также принадлежит району 2S0.8 (Erayman et al., 2004; Dobrovolskaya et

al., 2009). Генотипирование почти изогенной линии NIL-*mrs1*, несущей маркерный ген *mrs1*, с использованием SSR маркеров хромосомы 2D позволило определить интрогрессированный сегмент хромосомы 2DS: *Xgwm815* – *Xgwm515*, что подтвердило результаты молекулярно-генетического картирования (Dobrovolskaya et al., 2009, 2015). Наряду с родителями картирующих популяций (Ruc163, Ruc167) и почти изогенной линией NIL-*mrs1*, девять линий морфотипа MRS были генотипированы с применением SSR-маркеров, фланкирующих *mrs1*: *Xgwm484* и *Xgwm988*, и ко-сегрегирующего с *mrs1* маркера – *Xwmc453*. Было обнаружено, что все MRS-линии несли одинаковый аллель 194 п.н. локуса *Xwmc453*, что подтверждает единое происхождение признака MRS под контролем *mrs1* этих линий. Маркер *Xwmc453*-194 п.н. может служить диагностическим маркером признака MRS.

Изучение генетического контроля многоколосковости морфотипа HS (horizontal spikelets) линии MC1611 мягкой пшеницы показало, что фенотип колоса этой линии обусловлен рецессивной мутацией, возникшей в одном гене в результате мутагенеза (Добровольская и др., 2014б). Наряду с главным геном, картированным в хромосоме 2DS (Рисунок 3д), на признак оказывают влияние гены с минорными эффектами (Добровольская и др., 2014б; Dobrovolskaya et al., 2015).

Таким образом, впервые было определено положение генетических локусов, определяющих многоколосковые фенотипы мягкой пшеницы (MRS и HS), на молекулярно-генетических картах хромосом 2DS (Добровольская и др., 2014б; Dobrovolskaya et al., 2009, 2015).

4.2. Влияние перестроек хромосомы 2D на фенотип колоса мягкой пшеницы. Изучение кариотипов многоколосковых линий с использованием С-дифференциального окрашивания и флуоресцентной *in situ* гибридизации FISH в сочетании с микросателлитным анализом проводили по апробированной методике (Арбузова и др., 2012; Tikhenko et al., 2010). Полученные результаты показали, что линии So164, Skle128 и Ruc204 несут хромосомные перестройки, затрагивающие хромосому 2D: замещение пары хромосом 2D гомеологичной парой хромосом 2A (So164), терминальную (Skle128) и интерстициальную (Ruc204) делеции хромосомы 2DS (Добровольская и др., 2014б; Dobrovolskaya et al., 2015). Ген *mrs1*, детерминирующий MRS-фенотип, ко-локализуется на молекулярно-генетической карте 2DS с SSR-маркером *Xwmc453*, который попадает в области делеций хромосом 2DS линий Skle128 и Ruc204. Для того, чтобы оценить генетический вклад обнаруженных делеций 2DS в формирование многоколосковых фенотипов линий Ruc204 и Skle128 было проведено генетическое картирование на популяциях F₂ Ruc204/C29 и Skle128/C29. Результаты картирования показали, что наличие делеций хромосомы 2D линий Skle128 и Ruc204 определяет до 49,6% изменчивости (вариабельности) изучаемого признака (Рисунки 3е, 3ф; Dobrovolskaya et al., 2015). Наряду с локусом хромосомы 2D развитие дополнительных колосков на

уступах контролирует QTL хромосомы 2AS (*qSS-A*), определяя 16% вариабельности признака «многоколосковость». Следовательно, основной вклад в контроль изучаемого признака вносит локус хромосомы 2DS (Dobrovolskaya et al., 2015).

Таким образом, 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. Появление многоколосковых/ветвистоколосых 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 гомеологической группы.

4.3. Изучение генетической регуляции формирования колоса фенотипа *monstrosum* ржи посевной *S. cereale*. Изучение генетического контроля многоколоскового фенотипа колоса ржи проводили на материале самонесовместимой формы ржи D40 (*monstrosum*) и инбредной линии S11 (стандартный колос) из Петергофской генетической коллекции ржи. Колос ржи формы D40 имел многоколосковый фенотип *monstrosum*, сходный с морфотипом MRS мягкой пшеницы, на уступах колосового стержня развивалось множество дополнительных колосков. Результаты генетического анализа и молекулярно-генетического картирования показали, что признак *monstrosum* находится под моногенным рецессивным контролем, детерминирующий его ген *mo1* был впервые картирован в хромосоме 2RS с использованием микросателлитных маркеров (Dobrovolskaya et al., 2009). Мутанты *mo1* ржи и *SS/mrs1* пшеницы имеют сходные фенотипы, а детерминирующие их гены *mo1* и *mrs1* (*qSS-D*, *qSS-A*) расположены в областях консервативной синтении хромосом 2-й гомеологической группы, на основании чего можно предположить, что они принадлежат ортологической серии генов злаков, участвующих в регуляции морфогенеза соцветия.

Таким образом, результаты генетического анализа, молекулярно-генетического картирования и цитогенетических исследований, выполненных на многоколосковых линиях мягкой пшеницы разного происхождения (группы I), впервые показали наличие гена (генов) хромосомы 2DS, рецессивные аллели и делеции которого (которых) вызывают формирование дополнительных колосков на уступах колосового стержня. Сравнительный анализ обнаружил ко-локализацию генетических локусов, определяющих многоколосковые морфотипы линий с нарушениями морфогенеза группы I, на картах хромосом 2DS (Рисунок 3; Dobrovolskaya et al., 2009, 2015). По результатам исследований, наряду с геном (генами) хромосомы 2DS на проявление признака многоколосковость оказывает влияние локус(ы) хромосомы 2AS, однако основной вклад в проявление признака «многоколосковость» линий мягкой пшеницы вносит генетический локус 2DS (Dobrovolskaya et al., 2015).

Глава 5. Определение структурно-функциональной организации гена *mrs1*, контролирующего многоколосковый фенотип колоса мягкой пшеницы

5.1. Определение гена-кандидата на роль гена *mrs1*. 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 серий консервативных ортологичных генов (COS) злаков и COS-SSCP анализа. В молекулярно-генетические карты хромосом были интегрированы COS-маркеры. На полученной карте (Рисунок 4а) локус *mrs1* фланкируют COS-маркеры, представляющие серии консервативных ортологичных генов злаков: COS1 (LOC0s07g38530-Bradi1g23970-Sb02g037070 риса, *B. distachyon* и сорго, соответственно), COS2 (LOC0s07g45064 риса) и COS3 (LOC0s07g48200-Bradi1g17680-Sb02g043000, риса, *B. distachyon* и сорго, соответственно). 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*. 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). Мутации гена *fzp* риса и его ортолога *Bd1* кукурузы *Z. mays* имеют фенотипические проявления, сходные с мутациями *mrs1* пшеницы, функции генов в развитии соцветий, установленные на основе мутантных фенотипов, также сходны (Chuck et al., 2002; Komatsu et al., 2003; Dobrovolskaya et al., 2015). Учитывая синтению хромосом злаков в области расположения локуса *Mrs1*, сходство изменений в схемах развития соцветий и сходство фенотипических проявлений мутаций *mrs1* пшеницы (Dobrovolskaya et al., 2009, 2015), *fzp* риса (Komatsu et al., 2003) и *bdl* кукурузы (Chuck et al., 2002), ортолог пшеницы гена *FZP*, обозначенный *WFZP (Wheat FZP)*, был выбран в качестве наиболее вероятного гена-кандидата на роль *Mrs1* (Dobrovolskaya et al., 2015).

5.2. Установление структурно-функциональной организации локуса *WFZP* в геноме мягкой пшеницы. 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 был проведен скрининг ВАС-библиотеки «Tae-B-Chinese Spring» мягкой пшеницы сорта Чайниз Спринг с использованием пар праймеров, подобранных к консервативным областям гена *BRADIIG18580.1 B. distachyon* (предполагаемого ортолога *FZP*), так как *B. distachyon* – наиболее генетически близкий пшенице модельный вид злаков. В результате проведения скрининга были идентифицированы ВАС-клоны с целевыми нуклеотидными последовательностями ДНК,

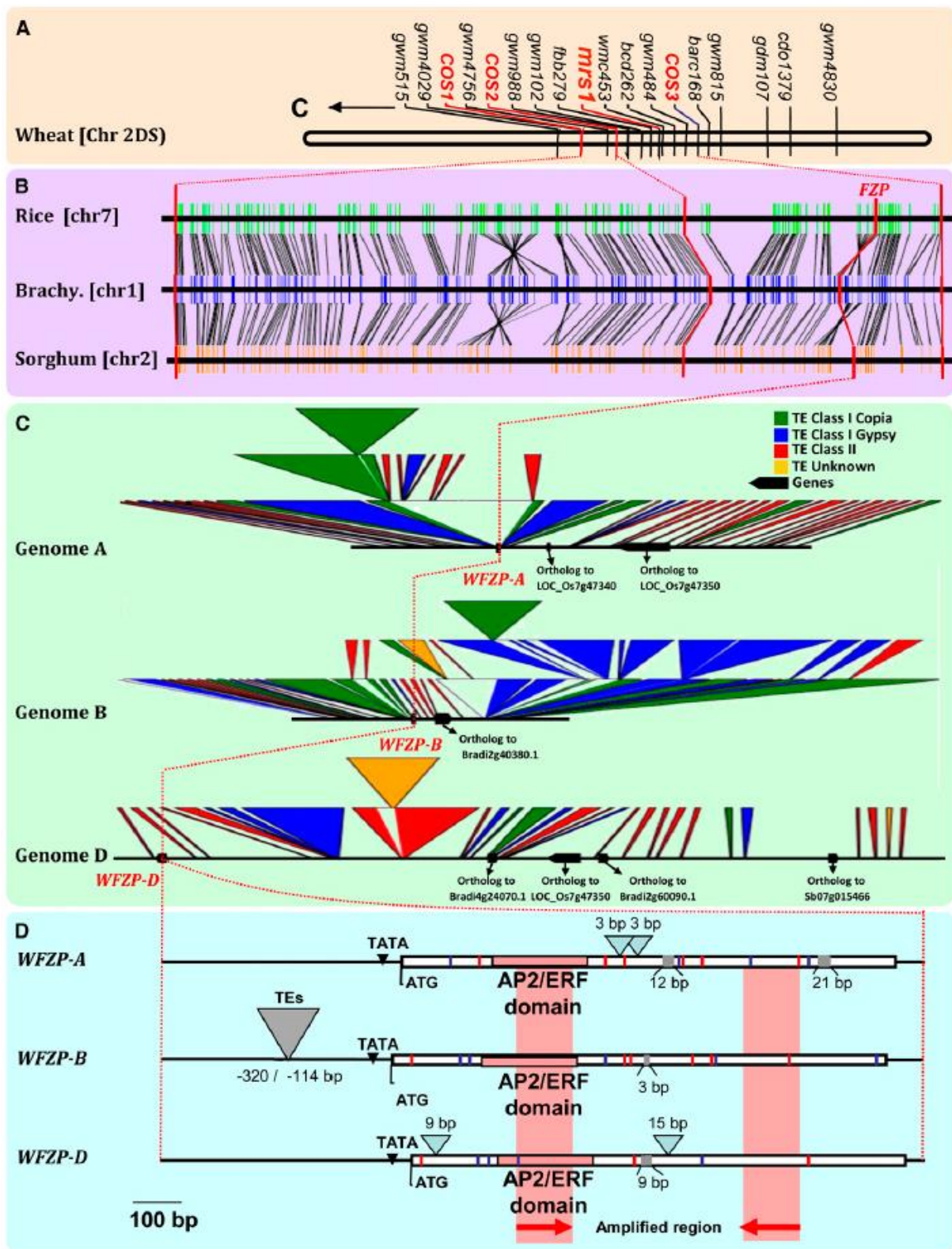


Рисунок 4 – Ген *WFZP* мягкой пшеницы. (A) Консенсусная карта хромосомы пшеницы 2D, включающая локус *mrs1* и фланкирующие его COS-маркеры. (B) Районы консервативной синтении хромосом риса (Chr7), сорго (Chr2) и *B. distachyon* (Brachy, Chr1), предполагаемые гены-ортологи соединены черными линиями. (C) Аннотированные ВАС-клоны представлены генами (черные прямоугольники), мобильными элементами (transposable elements, TE) различных классов – Copia (зеленый), Gypsy (голубой), не охарактеризованные (желтый) и класс II (красный), обозначенными треугольниками. (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 синонимичные однонуклеотидные полиморфизмы, соответственно. Красные стрелки обозначают сайты отжига праймеров, использованных для скрининга ВАС-библиотеки. (Dobrovolskaya et al., 2015)

гомологичными гену *FZP*. Используя технологию высокопроизводительного секвенирования, определены нуклеотидные последовательности трех отобранных ВАС-клонов CS248B13, CS184F24 и CS305H5, установлена первичная структура районов ДНК, содержащих локусы гомеологичных генов *WFZP* геномов А, В и D протяженностью до 62000 п.н.

Локализация последовательностей в геномах А, В или D была определена с использованием специфических праймеров на материале нулли-тетрасомных линий сорта пшеницы Чайниз Спринг. Схематическое изображение локусов, содержащих гены *WFZP*, приведено на Рисунке 4d. Сравнительный анализ первичной структуры ДНК генов-гомеологов *WFZP* показал, что все кодирующие последовательности гомеологичных генов предположительно содержат один экзон, в состав которого входит AP2/ERF домен, консервативный у ортологов *FZP* всех представителей злаков. Промоторный район гомеолога генома В, *WFZP-B*, содержит 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, соответственно (Рисунок 4).

Анализ транскрипционной активности генов-гомеологов *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 показал, что гены-гомеологи *WFZP* экспрессируются только в соцветии с максимальным уровнем экспрессии на ранней стадии дифференцировки органов цветка (Dobrovolskaya et al., 2015). Таким образом, для экспрессии *WFZP* характерна органоспецифичность и стадийспецифичность. Был обнаружен различный уровень экспрессии трех гомеологичных копий гена *WFZP-A*, *WFZP-B* и *WFZP-D*. 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, вероятно, является следствием изменения структуры промоторного района гена в результате инсерции мобильных элементов (Dobrovolskaya et al., 2015).

Последовательности ДНК ВАС-клонов CS248B13, CS184F24 и CS305H5, содержащие гомеологичные гены *WFZP*, послужили основой для идентификации и локализации микросателлитных локусов в богатых генами районах хромосом 2AS, 2BS и 2DS (Добровольская и др., 2015). К семи микросателлитным локусам были разработаны пары праймеров и протестированы на линиях и сортах мягкой пшеницы. Полиморфные микросателлитные маркеры были локализованы на молекулярно-генетических картах хромосом 2AS, 2BS и 2DS. Было

обнаружено, что микросателлитный маркер *ssrCS305H5-1* ко-локализуется с маркером *Xwmc453* на карте 2DS (Добровольская и др., 2015).

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

WFZP-D. Было обнаружено, что все изучаемые многоколосковые линии являются либо нуль-мутантами *wfzp-D.null* (So164, Skle128, Ruc204), либо несут мутации в функциональном домене AP2/ERF гена *WFZP-D* (мутантные аллели *wfzp-D.1* и *wfzp-D.2*). Сравнительный анализ генетических карт хромосомы 2D, содержащих гены *WFZP-D* и *mrs1/qSS*, показал их ко-локализацию (Dobrovolskaya et al., 2009, 2015).

WFZP-B. Обнаружено, что независимо от морфологии колоса, все изучаемые линии несут одинаковые структурные изменения в промоторном районе гена: инсерцию двух мобильных элементов MITE в позициях -114 пн и -320 пн от стартового кодона (Dobrovolskaya et al., 2015). Анализ структурной организации промоторного района генов *WFZP-B/G* видов пшеницы разного уровня плоидности, принадлежащих эволюционным линиям Emmer и Timophevi, а также *Ae. speltoides* (предка геномов В и G) и изучение транскрипционной активности генов-гомеологов *WFZP-A-B-D* мягкой пшеницы показали, что инсерция мобильных элементов произошла в процессе эволюции при формировании тетраплоидного генома в эволюционной линии Emmer и, вероятно, привела к потере функциональной активности этого гена (Dobrovolskaya et al., 2015).

WFZP-A. Анализ нуклеотидных последовательностей гена *WFZP-A* обнаружил, что у шести из семи изучаемых многоколосковых линий пшеницы (исключение – MC1611) и одной линии с колосом дикого типа (So149) была обнаружена делеция 14 п.н. в кодирующем районе гена *WFZP-A*, вызывающая сдвиг рамки считывания. Анализ 48 сортов мягкой пшеницы со стандартным типом колоса с использованием пары праймеров, выявляющих инсерционно-делеционный полиморфизм, обнаружил, что данную делецию несут 6,3% проанализированных сортов пшеницы со стандартной морфологией колоса. Следовательно, делеция (аллель *wfzp-A.1*) распространена среди сортов мягкой пшеницы со стандартным фенотипом колоса и ее наличие может не вызывать изменений фенотипа колоса. Вместе с тем, обнаружено, что сочетание аллеля *wfzp-A.1* с мутантными аллелями *wfzp-D.1* и *wfzp-D.null* приводит к выраженным проявлениям многоколоскового фенотипа. Типы расщеплений в гибридных популяциях от скрещиваний многоколосковых мутантов и линий со стандартным фенотипом колоса соответствуют

обнаруженным аллельным комбинациям генов-гомеологов *WFZP-A* и *WFZP-D*.

Обобщая результаты молекулярно-генетического картирования и анализа нуклеотидных последовательностей *WFZP*, можно заключить, что *WFZP-D* и *Mrs1* являются синонимами (Dobrovolskaya et al., 2015), а аллели *wfzp-D.1* и *wfzp-D.2* ассоциированы с мутантными многоколосковыми фенотипами MRS/HS/GB мягкой пшеницы.

Таким образом, применение основанного на синтении сравнительного картирования и использование детально охарактеризованных генетических моделей позволили впервые выделить ген *WFZP*, изменения первичной структуры которого вызывают формирование дополнительных колосков на уступах колосового стержня пшеницы (Dobrovolskaya et al., 2015). Фенотипы развивающихся соцветий мутантов *wfzp* предполагают следующую основную функциональную роль *WFZP*: генетический контроль установления идентичности цветковых меристем соцветия. Структурная организация локусов и функции генов-ортологов *FZP* злаков: риса, кукурузы и пшеницы высоко консервативны. Анализ мутантов показал ключевую роль ортологов *FZP* (включая *WFZP*) в определении архитектуры соцветия злаков и функциональную значимость домена AP2/ERF этого гена (Chuck et al., 2002; Komatsu et al., 2003; Dobrovolskaya et al., 2015). На основании сходства паттернов экспрессии генов *WFZP-A* и *WFZP-D* и особенностей мутантных фенотипов мы предположили, что функции генов *WFZP-A* и *WFZP-D* сходны, но фенотипические проявления мутаций *wfzp-A* могут маскироваться при нормальном функционировании гена *WFZP-D*, который вносит большой вклад в определение признака (Dobrovolskaya et al., 2015).

Глава 6. Изучение структурно-функциональной организации гена *WFZP*

у диплоидных и тетраплоидных видов пшеницы

Ветвистоколосые формы не распространены среди диплоидных видов пшеницы (Гончаров, 2012), но показано, что они могут появляться в результате мутагенеза. Amagai с соавт. (2014) обнаружили, что фенотип ветвистоколосого индуцированного мутанта К 3-24 *T. monosocum* ($A^m A^m$) обусловлен рецессивной мутацией гена *bh^m*, локализованного в хромосоме 2A^m. Учитывая сходство фенотипов и особенностей развития соцветий КТ 3-24 *T. monosocum* и *wfzp*-мутантов мягкой пшеницы (Dobrovolskaya et al., 2015, 2017), а также локализацию генов *bh^m* и *WFZP-A* в областях консервативной синтении, *WFZP-A* был выбран в качестве гена-кандидата на роль гена *bh^m* и выделен впервые в геноме *T. monosocum*. Было обнаружено, что ветвистоколосый фенотип линии К 3-24 – следствие мутации (TGC (Cys) → TAC (Thr)) в функциональном домене AP2/ERF гена *WFZP*, мутантный аллель обозначен *wfzp-A.2*. По результатам молекулярно-генетического картирования положение генов *wfzp-A.2* и *bh^m* на карте хромосомы 2A^m совпадает (Dobrovolskaya et al., 2017). Анализ особенностей развития соцветия мутанта К 3-24 показал, что функции генов *WFZP-A T. monosocum* и *WFZP-D* мягкой пшеницы совпадают (Dobrovolskaya et al., 2015, 2017).

Ветвистоколосые формы тетраплоидной пшеницы *T. turgidum* (ВБАА) широко распространены и хорошо известны уже около 2000 лет (Дорофеев, 1979). Poursarebani с соавт. (2015) показали, что фенотип 30 ветвистоколосых образцов *T. turgidum* ассоциирован с одним и тем же мутантным аллелем *TiBH-A1* локуса *WFZP-A*, что предполагает его монофилетическое происхождение. Среди образцов другого тетраплоидного вида пшеницы *T. durum* (ВБАА) ветвистоколосые формы встречаются редко (Дорофеев, 1979). Мы охарактеризовали спонтанный ветвистоколосый мутант R-107 *T. durum*, обнаруженный в Дагестане, с использованием методов микроскопии и молекулярной генетики и обнаружили, что за формирование мутантного фенотипа R-107 отвечает та же мутация – *wfzp-A/TiBH-A1*, которая вызывает формирование ветвистого колоса у образцов *T. turgidum* (Dobrovolskaya et al., 2017). Наши результаты подтвердили предположение В.Ф. Дорофеева (1968) о том, что ветвистоколосые формы *T. durum* могли произойти в результате спонтанной гибридизации между растениями *T. durum* со стандартной морфологией колоса и ветвистоколосыми формами *T. turgidum* в местах их совместного произрастания. Следует отметить, что фенотип колоса линии R-107 *T. durum* имеет большее сходство с фенотипом FRS (four rowed spike) с сидячими дополнительными колосками, чем с типичным тургидным типом колоса. Следовательно, генотипическая среда оказывает существенное влияние на фенотипические проявления мутантного аллеля *wfzp-A/TiBH-A1*.

Роль генов *WFZP* и *SHR2* в регуляции морфогенеза соцветия пшеницы

Анализ особенностей развития соцветия *wfzp*-мутантов диплоидных, тетраплоидных и гексаплоидных видов пшеницы позволил выявить общие закономерности и уточнить функциональную роль *WFZP*: в процессе развития многоцветкового колоска пшеницы ген *WFZP* контролирует переход к установлению идентичности флоральных меристем базальной части колоска.

В настоящее время мутанты *wfzp* являются наиболее изученными среди многоколосковых форм пшеницы (Добровольская и др., 2014а, 2014б; 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., 2014, 2017; Dobrovolskaya et al., 2017). С использованием SEM-анализа нами было впервые показано, что развитие соцветия линии PI 67339 морфотипа «ложно-истинное ветвление колоса» 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 предполагает 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 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 развития мутантных соцветий могут означать наличие общих функций генов *WFZP* и *SHR2*. Для изучения возможного взаимодействия генов *WFZP* и *SHR2* был выполнен классический генетический анализ – проанализированы фенотипы колоса у гибридов F₁ и F₂ от скрещиваний линий, несущих аллель *wfzp-A/TiBH-A1* в генотипической среде видов *T. turgidum* и *T. durum*, и линии *T. turgidum*, несущей аллель *shr2*. Результаты показали, что гены *WFZP* и *SHR2* действуют независимо и принадлежат разным генетическим путям регуляции развития соцветия (Dobrovolskaya et al., 2017).

Таким образом, было впервые показано, что в установлении идентичности флоральных меристем многоцветкового колоска злаков на разных стадиях развития колоска участвуют гены, принадлежащие разным генетическим путям регуляции: при установлении идентичности первых флоральных меристем – гены-гомеологи *WFZP*, а начиная с 3-го цветка – *SHR2* (Dobrovolskaya et al., 2015, 2017). Вместе с тем, обнаружено, что ген *SHR2* взаимодействует с другими, ранее не охарактеризованными генами, обозначенными *RS* (*Ramified Spike*), действие которых проявляется только в определённой генотипической среде (Dobrovolskaya et al., 2017). Мы полагаем, что обнаруженные нами гены *RS* являются теми генетическими факторами, которые определяют развитие колоска с удлинённой колосковой осью у ветвистокосых образцов *T. turgidum*, но на настоящий момент они остаются практически неизученными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мутанты с изменённой морфологией соцветия являются важными генетическими ресурсами для идентификации генов, регулирующих процессы развития высших растений (Meyerowitz, 1994; Komatsu et al., 2003a; Taguchi-Shiobara et al., 2001; Pourkheirandish, Komatsuda, 2007). В наших исследованиях на основе фенотипических коллекций линий пшеницы были сформированы и охарактеризованы, с применением комплекса методов микроскопии, классической генетики и современных подходов анализа генома растений, коллекции линий пшеницы с изменениями морфогенеза. Впервые детально изучена 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 положении относительно колосовой оси. Охарактеризованные линии пшеницы с нарушениями морфогенеза соцветия являются моделями для изучения генетической регуляции морфогенеза и послужили основой для идентификации генов, регулирующих развитие соцветия пшеницы на стадии формирования колоска и определения их функциональной роли в развитии соцветия.

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. 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 будут варьировать в зависимости от влияния генотипической среды на действие главных генов, ключевых регуляторов развития.

Было впервые обнаружено, что в основе формирования многоколосковых и ветвистоколосых форм пшеницы разного уровня ploидности (диплоидных, тетраплоидных и гексаплоидных видов пшеницы) лежат мутации генов-гомеологов *WFZP*, и показана ключевая роль ортологов гена *FZP*, включая *WFZP*, в определении архитектуры колоса злаков. Было обнаружено, что вклад гомеологичных копий гена *WFZP-A* (*qSS-A*), *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. Обнаружено, что различный уровень экспрессии генов-гомеологов (уровень транскриптов генов) полиплоидного генома мягкой пшеницы может приводить к неодинаковому вкладу отдельных гомеологичных копий генов в формирование фенотипа растений, и результаты однотипных мутаций в таких генах будут иметь разную степень фенотипического проявления. В целом, обнаруженный нами феномен отражает ко-адаптацию субгеномов в составе единого аллополиплоидного генома в ходе эволюции. 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.

Наши исследования впервые показали, что в формировании многоцветкового колоска пшеницы на стадии закладки и дифференцировки цветковых меристем его дистальной части принимает участие ген *SHR2*, мутации которого вызывают нарушение установления идентичности цветковых меристем и изменение детерминированности колосковой меристемы. 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. 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 (Komatsu et al., 2003), ячменя (Poursarebani et al., 2015)), и с многоцветковыми колосками (например, у *B. distachyon* (Derbyshire, Byrne, 2013), пшеницы (Добровольская и др., 2014б; Dobrovolskaya et al., 2015, 2017)). Ген *SHR2* участвует в регуляции установления идентичности цветковых меристем на более поздних стадиях развития многоцветкового колоска пшеницы, и 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 специфические модули или гены в их составе, регулирующие развитие многоцветкового колоска, к которым принадлежит *SHR2*.

ВЫВОДЫ

1. 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 эктопических колосков на укороченной (у 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 более поздних этапах роста соцветия и находится под моногенным доминантным 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 пшеницы с однотипными нарушениями морфогенеза 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.

4. 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 многоколосковых/ветвистоколосых фенотипов видов пшеницы разного уровня ploидности *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 ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в печатных изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ

1. **Dobrovolskaya, O.V.** Genes *WHEAT FRIZZY PANICLE* and *SHAM RAMIFICATION 2* independently regulate differentiation of floral meristems in wheat / O.V. 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.
2. **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 селекции*. – 2017. – Т. 21, № 2. – С. 222–226.
3. Арбузова, В.С. Наследование признака «многоцветковость» у мягкой пшеницы и оценка продуктивности колоса гибридов F₂ / В.С. Арбузова, **О.Б. Добровольская**, П. Мартинек, Е.В. Чуманова, Т.Т. Ефремова // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2016. – Т. 20. – № 3. – С. 355–363.
4. **Dobrovolskaya, 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.
5. **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.
6. **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*. – 2014. – Т. 18. – № 4/1. – С. 672–680.
7. **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*. – 2014. – Т. 45. – С. 434–414.
8. 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. Трубочеева, **О.Б. Добровольская** // *Генетика*. – 2012. – Т. 48. – С. 926–933.
9. **Dobrovolskaya, 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.
10. 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. Voylovkov, **O. Dobrovolskaya**, K. Zaynali Nezhad, M.S. Röder, A Börner // *Euphytica*. – 2010. – V. 176. – 191-198.
11. **Dobrovolskaya, O.** Microsatellite mapping of genes that determine supernumerary spikelets in wheat (*T. aestivum*) and rye (*S. cereale*) / O. Dobrovolskaya, P. Martinek, A.V. Voylovkov, V. Korzun, M.S. Röder, A. Börner // *Theor Appl Genet.* – 2009. – V. 119. – P. 867–874.
12. **Добровольская, О.Б.** Синтения хромосом генома А двух эволюционных линий пшеницы / О.Б. Добровольская, П. Сурдий, М. Бернхард, Е.А. Салина // *Генетика*. – 2009. – Т. 45. – № 11. – С. 1548–1555.
13. 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.
14. **Dobrovolskaya, 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. Börner // *Euphytica*. – 2007. – V. 155. – P. 285–293.

15. **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. Börner // *Euphytica*. – 2006. – V. 150. – P. 355–364.

16. 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.

17. **Dobrovolskaya, O.** Rationalising germplasm collections – a case study for wheat / O. Dobrovolskaya, U. Saleh, L. Malysheva-Otto, M.S. Röder, A. Börner // *Theor. Appl. Genet.* – 2005. – V. 111. – P. 1322–1329.

Статьи в других изданиях

18. 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 // *Acta Naturae*. – 2017. – Т. 9, спецвыпуск 1. – С. 59.

19. 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.

20. Martinek, P. Gene resources of wheat (*Triticum aestivum* L.) with changed spike morphology and their utilization / P. Martinek, O.B. Dobrovolskaya, P. Pokorová, M. Váňová // *Agriculture - Scientia – Prosperitas*. – 2011. – P. 62–69.

21. Martinek, P. Formation of yield components in winter wheat lines with different spike morphology / P. Martinek, O.B. Dobrovolskaya, P. Pokorová, M. Váňová // *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*. – 2011. – V. 57, Annex., - P. 7.

Статьи в сборниках научных трудов

22. Dobrovolskaya, O.B. Study on genetic control of early inflorescence development in bread wheat (*T. aestivum*) that determines inflorescence architecture and yield / O.B. Dobrovolskaya, K.I. Popova, Yu.L. Orlov, A.A. Krasnikov, P. Martinek // *Proceedings of the 4th International Conference “Plant genetics, genomics, bioinformatics and biotechnology (PlantGen2017).”* – Almaty, Kazakhstan, 2017. – P. 103.

23. Dobrovolskaya, O.B. Genes for wheat inflorescence architecture: structure, function and evolution / O.B. Dobrovolskaya, P. Martinek, M.P. Ponomarenko, A.F. Muterko, Y. Amagai, A.A. Krasnikov, E.D. Badaeva, K.I. Popova, Y.L. Orlov, J. Salse, N. Watanabe // *Abstracts of the Belyaev conference: A triumph event in commemoration of the centenary of the birth of academician Dmitri Belyaev*. – Novosibirsk, Russia, 2017. – P. 213.

24. Dobrovolskaya, O.B. Genetics and physiology of wheat inflorescence development / O.B. Dobrovolskaya, P. Martinek, Yu.L. Orlov, A.A. Krasnikov, E.D. Badaeva, K.I. Popova, J. Salse, N. Watanabe // *Proceedings of the 10th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2016)*. – Novosibirsk, Russia, 2016. – P. 69.

25. Dobrovolskaya, O. Genetic control of wheat inflorescence development / O. Dobrovolskaya, P. Martinek, C. Pont, Y. Amagai, A.A. Krasnikov, E.D. Badaeva, I.G. Adonina, Y.L. Orlov, E.A. Salina, N. Watanabe, J. Salse // *Abstract book of the 3rd International Conference “Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology (PlantGen 2015)”*. – Novosibirsk, Russia, 2015. – P. 11–12.

26. Dobrovolskaya, O. Genetic dissection of the inflorescence branching trait in diploid, tetraploid and hexaploid wheats / O. Dobrovolskaya, Y. Amagai, C. Pont, P. Martinek, A.A. Krasnikov, Y.L. Orlov, E.A. Salina, J. Salse, N. Watanabe // *Abstracts of the 9th International Conference of Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2014)*. – Novosibirsk, Russia, 2014. – P. 42.

27. Добровольская, О.Б. Выявление и изучение генов, контролирующих развитие соцветия пшеницы / О.Б. Добровольская, П. Мартинек, О.М. Попова, Ж. Сальс,

- А.А. Красников, Л.И. Лайкова, Е.А. Салина. // Тезисы докладов VI съезда ВОГиС и ассоциированных генетических симпозиумов. – Ростов-на-Дону, Россия, 2014. – С. 71.
28. Добровольская, О.Б. Изучение генетической регуляции развития соцветия мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.) на примере гомеологичных генов *WFZP* / О.Б. Добровольская, Ж. Сальс, О.М. Попова, Ю.Л. Орлов, П. Мартинек, Л.И. Лайкова, Е.А. Салина // Инновационные направления современной физиологии растений. Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием. – Москва, Россия, 2013. – С. 51–52.
29. Добровольская, О.Б. Изучение структурно-функциональной организации генов, участвующих в регуляции развития соцветия мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.) и ее сородичей на примере гена *WFZP* / О.Б. Добровольская, Ж. Сальс, О.М. Попова, Ю.Л. Орлов, П. Мартинек, Л.И. Лайкова, Е.А. Салина // Идеи Н.И. Вавилова в современном мире. Сборник материалов III Вавиловской международной конференции. – Санкт-Петербург, Россия, 2012. – С. 23.
30. Dobrovolskaya, O.B. Characterization of the *WFZP* homoeologous genes in bread wheat / O.B. Dobrovolskaya, C. Pont, P. Martinek, Yu.L. Orlov, O.M. Popova, L.I. Laikova, J. Salse, E.A. Salina // Proceedings of the 2nd International Conference “Plant genetics, Genomics, and Biotechnology”. – Irkutsk, Russia, 2012. – P. 19.
31. Martinek, P. Influence of the spike morphologic structure of wheat on yield formation and relevant genetic resources / P. Martinek, O. Dobrovolskaya N. Watanabe, Z.-S. Peng, Vyhnánek // The International Conference of the project REVERSE-INTERREG IVC. “Biodiversity in farmland country and in the ecosystem.” – Piest’any, Slovakia, 2012. – P. 35–43 (на чешском).
32. Dobrovolskaya, O. Characterization of genes that are involved in control of spike development in wheat and its relatives / O. Dobrovolskaya, J. Salse, P. Martinek, V.S. Arbusova, O.M. Popova, A. Börner, E.A. Salina, L.I. Laykova // Abstract book of the International Conference “Wheat genetic resources and genomics (WGRG)”. – Novosibirsk, Russia, 2011. – С. 28.
33. Dobrovolskaya, O. Identification and characterization of genes that are involved in regulation of the cereal inflorescence development in bread wheat (*T. aestivum*) and its close relatives / O. Dobrovolskaya, P. Martinek, L.I. Laikova, V.S. Arbusova, J. Salse, A. Börner, E.A. Salina // Proceedings of the 15th International EWAC Conference. – Novi Sad, Serbia, 2011. – P. 52.
34. Dobrovolskaya, O.B. Molecular-genetic and physical mapping of mutant genes involved in the inflorescence development in bread wheat and its close relatives / O.B., Dobrovolskaya, P. Martinek, O.M. Popova, V.S. Arbusova, J. Salse, C. Pont, M.S. Röder, A. Börner, L.I. Laykova // Abstracts of the International Conference «Plant Genetics, Genomics, and Biotechnology». – Novosibirsk, Russia, 2010. – P. 38.
35. Dobrovolskaya, O. Identification, molecular-genetic and physical mapping of genes that control the inflorescence development in bread wheat (*T. aestivum* L.) / O. Dobrovolskaya, P. Martinek, L.I. Laykova, V.S. Arbusova, J. Salse, C. Pont, M.S. Röder, A. Börner, E.A. Salina // Abstracts of the 2nd International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources. – Bologna, Italy, 2010. – P. 180.
36. Dobrovolskaya, O. Microsatellite mapping of genes for inflorescence architecture in wheat (*T. aestivum*) and rye (*S. cereale*) / O. Dobrovolskaya, P. Martinek, M.S. Röder, A. Börner // Proceedings of the German-Russian forum Biotechnology GRFB’09, Novosibirsk, Russia, 2009. – P. 15.
37. 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 // Proceedings of the International Conference “Conventional and molecular breeding of field and vegetable crops.” – Novi Sad, Serbia, 2008. – P. 133–136.