

На правах рукописи

Киселёва Антонина Андреевна

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ В-ГЕНОМА
МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ, ИНДУЦИРУЮЩИХ КОЛОШЕНИЕ**

Генетика – 03.02.07

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики растений, г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Салина Елена Артемовна**
доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией молекулярной генетики и
цитогенетики растений ФГБНУ ФИЦ ИЦиГ СО РАН,
г. Новосибирск

Официальные
оппоненты: **Кочиева Елена Зауровна,**
доктор биологических наук, профессор, руководитель
группы молекулярных методов анализа генома,
ведущий научный сотрудник лаборатории системной
биологии растений, ФГУ ФИЦ «Фундаментальные
основы биотехнологии» РАН, г. Москва

Анисимова Ирина Николаевна,
доктор биологических наук, ведущий научный
сотрудник отдела генетики ФГБНУ «Федеральный
Исследовательский Центр Всероссийский Институт
Генетических ресурсов растений им. Н.И.Вавилова"
ВИР), г. Санкт-Петербург

Ведущее учреждение: ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук

Защита диссертации состоится «__» _____ 2018г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в конференц-зале Института по адресу:
пр. ак. Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090,
тел +7 (383) 3634906, факс +7(383) 3331278.
e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

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

Автореферат разослан «__» _____ 2018г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень разработанности темы

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) – важная сельскохозяйственная культура, адаптированная к возделыванию в различных экологических условиях. Длительная доместикация пшеницы позволила приспособить данную культуру к широкому спектру климатических условий. Во многом это стало возможно благодаря варьированию такого важного адаптивного признака, как время колошения.

Обобщая известную информацию о путях инициации колошения у пшеницы, можно сказать, что данный признак формируется потребностью растения в яровизации, чувствительностью к фотопериоду, циркадными ритмами, рецепторами света, фитогормонами, и другими факторами. Функцию интегральной молекулы, воспринимающей сигналы от различных молекулярных путей выполняет TaFT1, транспортирующийся из вегетативных тканей в апикальную меристему и иницирующий гены флоральных меристем при участии экспрессирующегося в апикальной меристеме *VRN-1*. Несмотря на значительное разнообразие факторов, влияющих на время инициации цветения пшеницы, основными регуляторами, оказывающими наиболее сильное влияние на признак, являются потребность в яровизации, определяемая, в первую очередь, генами *VRN-1*, и чувствительность к фотопериоду, определяемая генами *PPD-1*. Известны аллели этих генов, влияющие на фенотип растения в различной степени. Так, например, различные доминантные аллели *PPD-1* генов сокращают время колошения на разное число дней. Такое разнообразие дает возможность подбирать подходящие сорта к конкретным климатическим условиям.

Говоря о генах, влияющих на время колошения *Triticum aestivum* ($2n = 42$, геном ВВААDD), важно заметить, что многие ключевые гомеологичные гены, располагающиеся на хромосомах А, В и D геномов, экспрессируются с разной интенсивностью, и, следовательно, вносят различный вклад в формирование признака. Так, например, такие важные гены как *PPD-1* и *TaFT1*, *GI*, *CO2* наиболее сильно экспрессируются в составе В-генома (Shaw, Turner & D. a Laurie, 2012). Нечувствительные к фотопериоду аллели *Ppd-B1a* отличаются такими мутациями, как увеличение числа копий гена или инсерция, в то время как для гомеологичных *Ppd-A1a* и *Ppd-D1a* типичны делеции в промоторной области. Кроме того, известно значительное число локусов, в том числе в В-геноме, связанных со временем колошения, гены для которых еще не идентифицированы (Milec et al., 2014).

Таким образом, исследование генов В-генома мягкой пшеницы, связанных с колошением, механизмов их регуляции и взаимодействий, представляет собой значительный интерес как с точки зрения изучения механизмов формирования данного признака, так и с сельскохозяйственной точки зрения – подбор и выведение сортов с подходящими локусами и генами, модулирующими время колошения.

Лаборатория располагает двумя генетическим моделями, контрастными по времени колошения и подходящими для изучения генов, контролирующих этот признак. Первая модель – почти изогенные линии мягкой пшеницы (*Ppd-m* и *Ppd-w*) и их сестринские линии (*Ppd-0^m* и *Ppd-0^w*), различающиеся по срокам колошения на коротком дне, полученные от скрещивания рано переходящего к колошению сорта *Sonora* (донор) и линии ФЧЛ2 (реципиент), поздно переходящей к колошению. Линии предположительно отличались по хромосоме 2В. Данные линии были разработаны проф. Кошкиным В. А. и проф. Мережко А. Ф. во ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР). Вторая модель – популяция рекомбинантных инбредных хромосомных линий (RICL), полученных от скрещивания сорта *Chinese Spring* (CS) и линии сорта *Chinese Spring* (CS-5Bdic) с замещенной хромосомой 5В, переходящей к колошению на две недели позже первого родителя.

Цель и задачи исследования

Целью данного исследования является идентификация и характеристика генов, локализованных на хромосомах 2В и 5В мягкой пшеницы, индуцирующих переход от вегетативной к генеративной фазе, и изучение их вклада в формировании времени колошения.

Для реализации этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявление генов, определяющих различия по чувствительности к фотопериоду у почти изогенных линий *Ppd-m* и *Ppd-w*;
2. Анализ структурной организации гена *Ppd-B1*, локализованного на хромосоме 2В, у почти изогенных линий *Ppd-m* и *Ppd-w*;
3. Идентификация генов на хромосоме 5В, детерминирующих различия по времени колошения между линиями популяции RICL от скрещивания CS x CS-5Bdic;
4. Характеристика суточной экспрессии генов, ассоциированных со временем колошения на материале почти изогенных линий и их родительских сортов;
5. Анализ возможных межгенных взаимодействий, происходящих при участии *Ppd-B1a* и генов, выявленных на хромосоме 5В.

Научная новизна работы

В ходе данной работы проведена идентификация локусов, ассоциированных с временем колошения, на хромосомах 2 и 5 В-генома мягкой пшеницы. Показано, что причиной различия почти изогенных линий по времени колошения является область на коротком плече хромосомы 2В между маркерами *Xgwm148* и *Xgwm388*. В данной области располагается ген *PPD-B1*. Анализ последовательности данного гена позволил выявить инсерцию/делецию и несколько SNP, отличающих исследуемый аллель от других доминантных *Ppd-B1a* аллелей, в том числе, с увеличенным числом копий гена, и от рецессивных аллелей *Ppd-B1b* в сестринских линиях. Показано, что причиной раннего колошения линий является увеличение числа копий данного гена. В результате биоинформатического анализа промоторов генов *PPD-1* выявлены

специфичные для *PPD-B1* транскрипционные факторы, среди которых гены *MADS-box* являются наиболее вероятными, специфичными для *PPD-B1*, регуляторами экспрессии. Таким образом, впервые предложен механизм модуляции экспрессии аллеля *Ppd-B1a* с увеличенным числом копий гена.

Анализ популяции рекомбинантных инбредных хромосомных линий методом высокопроизводительного генотипирования с последующим QTL-анализом, позволил выявить локус в прицентромерной области хромосомы 5B, ассоциированный с изменением времени колошения. В результате сравнения последовательностей SNP из данного локуса с кодирующими последовательностями риса, брахиподиума, ячменя, пшеницы урарту, эгилопса и мягкой пшеницы из баз данных, были выявлены гены, ассоциированные с маркерами из исследуемого локуса. Проанализированы консервативные домены этих генов с использованием ресурсов базы данных UniProt и впервые предложены гены – кандидаты для данного локуса, *WRKY*, *ERF/AP2*, *FHY3/FAR1* и *ELF4*, которые могут быть ассоциированы с различиями по времени колошения. Ранее было показано, что эти гены (*WRKY*, *ERF/AP2*, *FHY3/FAR1* и *ELF4*) участвуют в регуляции времени цветения у многих растений, но данных об их участии в модуляции цветения пшеницы пока не было.

Для анализа взаимодействия генов, контролирующих время колошения, с использованием модели почти изогенных линий и их родительских форм, был проведен анализ паттернов суточной экспрессии генов *PPD-1* вместе с генами, вовлеченными в восприятие света (*PHYA*, *PHYB*, *PHYC*), и переход к цветению (*VRN-1*, *TaFT1*) и рассмотрены их взаимодействия. По результатам осуществленных в данной работе анализа корреляций паттернов экспрессии, и анализа промоторов *in silico*, впервые сделано предположение о возможном позитивном влиянии нечувствительного к фотопериоду *Ppd-B1a* на экспрессию *PHYC* в ночное время. Эту гипотезу подтверждают данные об увеличении количества белка фитохрома у линий с доминантными *PPD-1* аллелями (Кошкин и др., 2004). Также было сделано предположение, что транскрипционный фактор *FHY3/FAR1*, локализованный в прицентромерной части хромосомы 5B, может быть вовлечен во взаимодействие данных генов.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные результаты могут быть использованы в дальнейшем для фундаментальных исследований, направленных на изучение взаимодействия генов, участвующих в формировании времени цветения мягкой пшеницы. Так, в ходе работы выявлены транскрипционные факторы, дополняющие известные механизмы цветения пшениц, установлены новые взаимодействия генов, всесторонне изучена структурно-функциональная организация одного из основных генов, контролирующих цветение, *PPD-B1*.

Полученные результаты имеют практическое значение: изученные линии *Ppd-m* и *Ppd-w* являются донорами доминантного аллеля гена *PPD-B1* для создания сортов с ранним колошением, хорошо адаптированных к широкому спектру

климатических условий. Знания о новом локусе на хромосоме 5В также могут быть применены для направленной селекции высокоадаптивных сортов мягкой пшеницы.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Локусы на хромосомах В-генома мягкой пшеницы, связанные с индукцией колошения, расположены на коротком плече хромосомы 2В и в прицентромерной области хромосомы 5В.
- 2) Локус на коротком плече хромосомы 2В содержит аллель *Ppd-B1a^{cnv}*, увеличенное число копий которого положительно влияет на время колошения.
- 3) Локус в прицентромерной области хромосомы 5В включает в себя гены *WRKY*, *ERF/AP2*, *FHY3/FAR1* и *ELF4* – регуляторы времени цветения, описанные для модельных объектов.
- 4) Аллель *Ppd-B1a^{cnv}* детерминирует нечувствительность к фотопериоду и в ночной период положительно регулирует экспрессию *PHYC*, гена рецептора красного света.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в выполнении основного объема теоретических и экспериментальных исследований по теме данной работы, включая обширный анализ литературных источников, планирование и осуществление экспериментальных работ, фенотипирование растений, анализ и обработку полученных данных.

SSR-анализ почти изогенных линий был осуществлен совместно с Потокиной Е.К., Эгги Э.Э. и Ситниковым М.Н. Фенотипический анализ RICL линий проведен совместно с Леоновой И.Н.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, описания используемых материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 160 страницах печатного текста, содержит 31 рисунок и 4 таблицы, 6 приложений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал и анализ фенотипа. В данное исследование были отобраны две генетические модели. Первая модель – ранние почти изогенные линии (NILs) *Ppd-m* и *Ppd-w* и их поздние сестринские линии *Ppd-0^m* и *Ppd-0^w*, полученные от скрещивания рано переходящего к колошению сорта *Sonora* и поздно переходящего к колошению ФЧЛ2. Вторая модель – популяция 116 рекомбинантных инбредных хромосомных линий (рекомбинантные инбредные хромосомные линии, RICL), полученных от скрещивания сорта *Chinese Spring (CS)* и линии сорта *Chinese Spring* с замещенной 5В хромосомой (*CS-5Bdic*), переходящей к колошению на две недели позже первого родителя. Также в ходе работы, для уточнения локализации маркеров на хромосомах и проверки специфичности разработанных праймеров,

использовали нулли-тетрасомные, дителосомные и линии с частичными хромосомными делециями сорта CS.

Экстракция ДНК, амплификация и разделение фрагментов. Для выделения ДНК из растений использовали СТАВ метод и метод с пиросульфитом натрия. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 12 – 25 мкл реакционной смеси с оптимизированным содержанием и концентрацией рабочих компонентов на амплификаторах Bio-Rad T100 и БИС. Разделение фрагментов осуществляли в 1 – 5 % агарозном геле.

Клонирование и секвенирование фрагментов ПЦР. Для последующего клонирования, целевые ампликоны были выделены из 1% агарозного геля и очищены с использованием «Набора для элюции ДНК из агарозного геля» (БиоСилика). Очищенные фрагменты лигировали в линейризованный вектор pAL-TA (Evrogen). Химически компетентные клетки получали с использованием протокола ССМВ 80 (Hanahan et al., 1991). Клетки трансформировали методом теплового шока. Колонии отбирали в ходе "бело-голубой" селекции на питательной среде содержащей ампицилин, X-Gal, и IPTG. Плазмидную ДНК экстрагировали с помощью «Набора для выделения плазмидной ДНК» (БиоСилика). Секвенирование осуществляли на приборе ABI 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems) с использованием BigDye Terminator v3.1.

Биоинформатический анализ промоторов. Были проанализированы области протяженностью 2000 п.н. выше старта транскрипции, первый интрон и первый экзон генов с использованием базы данных PlantPAN 2.0.

Количественная экспрессия генов. Растения выращивали в течении 21 дня после прорастания в сосудах с керамзитом в контролируемых условиях климатической камеры «Rubarth Apparate» (RUMED GmbH) в условиях короткого дня (9 часов света, 20° C). РНК выделяли набором «Plant RNA MiniPrep» (Zymo Research) с ДНКазной обработкой набором «RNase-Free DNase set» (QIAGEN). кДНК синтезировали из 2 µg тотальной РНК с помощью «RevertAid First Strand cDNA Synthesis» (Thermo Scientific) с Oligo(dT)₁₈ в качестве праймеров. Данные по флуоресценции получали на приборе Applied Biosystems 7500fast с использованием SYBR Green I (Syntol). Измерения проводили в трёх технических повторностях. Относительный уровень экспрессии рассчитывали по методу Пфаффл (Pfaffl, 2001). Уровень экспрессии целевых генов нормировали относительно 18S rRNA.

SNP генотипирование. Очистку ДНК осуществляли с использованием набора «Bio-Silica kit for DNA purification from reaction mixtures». На материале 116 RICL, CS и CS-5Bdic проводили генотипирование с использованием Illumina Infinium 15 k Wheat platform в компании TraitGenetics GmbH.

Разработка генетической карты и QTL анализ. Генетическую карту хромосомы 5B конструировали с использованием программы MultiPoint версия «UltraDense» (Ronin et al., 2013), для расчета генетических расстояний использовали функцию Косамби. Для выявления QTL времени колошения использовали данные об этом признаке, полученные на яровизированных и неяровизированных растениях,

выращенных в гидропонной теплице ИЦиГ СО РАН. Для проведения QTL анализа использовали программу MultiQTL (Korol et al., 2009), с использованием которой осуществляли интервальное картирование по одному признаку.

BLAST анализ. SNP-маркеры из области QTL были проанализированы с использованием BLASTN. Полученные результаты были суммированы и аннотированы с использованием базы данных UniProt.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

1. Оценка аллельного состояния известных генов, ассоциированных с временем колошения, у NILs и их родительских линий

Основными детерминантами раннего колошения у мягкой пшеницы являются гены потребности яровизации и гены чувствительности к фотопериоду (длине дня). Поэтому у исследуемых почти изогенных линий Ppd-m и Ppd-w, их сестринских линий Ppd-0^m и Ppd-0^w и их родительских сортов Sonora (раннее колошение) и ФЧЛ2 (позднее колошение) был определен аллельный состав данных генов. Между изогенными и их сестринскими линиями не было выявлено различий по генам *VRN-1*. Все три гомеологичных гена присутствовали в линиях в доминантном состоянии. Из этого можно сделать вывод, что гены чувствительности к яровизации не влияют на время колошения исследуемых линий на коротком дне. Анализ также показал, что сорта и линии не содержат доминантных аллелей генов *PPD-1*, характеризующихся структурными изменениями последовательности в промоторной области (делеции или инсерции). Таким образом, изменения в промоторной области данных генов не могли быть причиной различий исследуемых линий по времени колошения.

2. SSR-генотипирование для определения локуса, ассоциированного с временем колошения у NILs

SSR-генотипирование позволило установить, что различия по времени колошения у почти изогенных линий, полученных от скрещивания сорта Sonora и ФЧЛ2, ассоциированы с интрогрессией на хромосоме 2В между маркерами *Xgwm148* и *Xgwm388* (рис. 1, 2), унаследованной от нечувствительного к фотопериоду сорта Sonora.

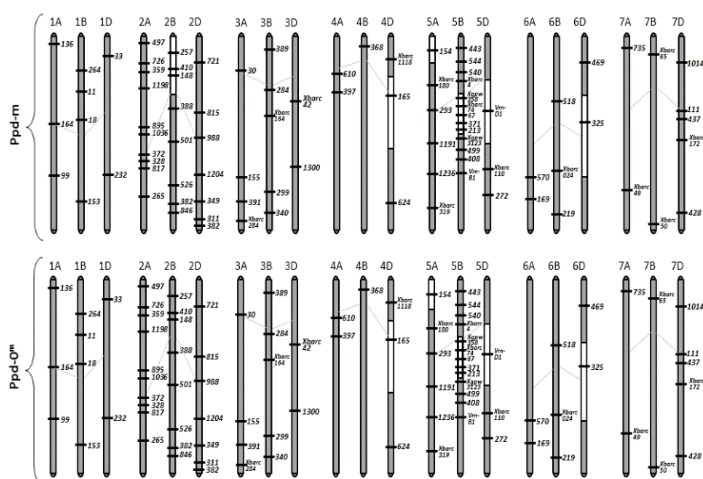


Рис. 1. Генотипы почти изогенной линии Ppd-m и её сестринской линии Ppd-0^m с интрогрессированными аллелями сорта Sonora (белый цвет) в генетическую среду реципентного родителя ФЧЛ2 (серый цвет).

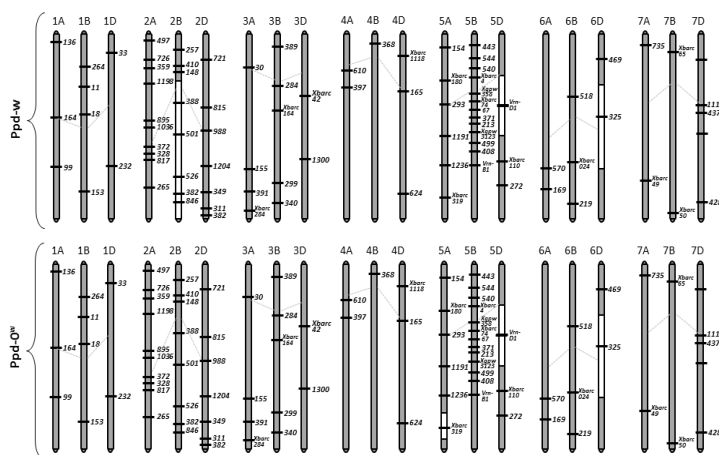


Рис. 2. Генотипы почти изогенной линии Ppd-w и её сестринской линии Ppd-0^w с интрогрессированными аллелями сорта Sonora (белый цвет) в генетическую среду реципиентного родителя ФЧЛ2 (серый цвет).

Таким образом, в результате SSR генотипирования было установлено, что почти изогенные линии и их сестринские линии имеют практически идентичный геном, за исключением хромосомы 2В. В данной области локализован ген *PPD-B1* (Mohler et al., 2004).

3. Характеристика локуса, локализованного на коротком плече хромосомы 2В почти изогенных линий и ускоряющего время колошения на коротком дне

3.1 Анализ последовательностей нечувствительного к фотопериоду аллеля *Ppd-B1a*

Поскольку было установлено, что ген *PPD-B1* рано переходящих к колошению на коротком дне линий Ppd-m, Ppd-w и родительского сорта Sonora не содержал инсерции 308 п.н., характерной для доминантного аллеля, описанного Nishida et al. (Nishida et al., 2013), было сделано предположение, что другой аллель *Ppd-B1a* может быть причиной раннего колошения. Для изучения возможного полиморфизма, ампликоны, перекрывающие последовательность гена и его промоторную область, были вставлены в вектор pAL-TA с последующей трансформацией *E.coli*, и отдельные колонии, были секвенированы и проанализированы.

Результаты представлены на рис. 3. Каждая из исследуемых линий отличалась однонуклеотидной делецией в промоторной области (-2373 п.н.) от нечувствительного к фотопериоду аллеля *Ppd-B1a* сортов Sonora 64, Timstein, C591 и Renan. В третьем экзоне (+546 п.н.) был обнаружен SNP, отличающий исследуемый аллель от другого аллеля с увеличенным числом копий, характерного для сорта Chinese Spring. Другая однонуклеотидная замена (-630 п.н.) позволяла различать чувствительные и нечувствительные к фотопериоду линии между собой.

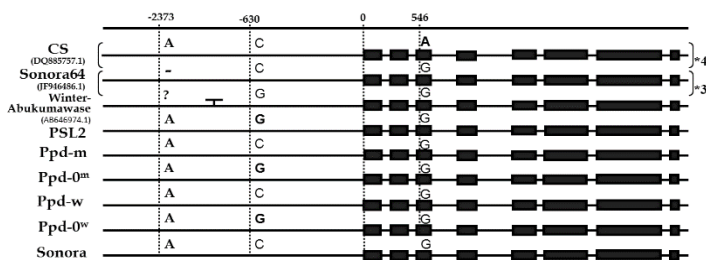


Рис. 3. Схема гена *PPD-B1* с обозначением характерных особенностей. Расстояния представлены в п.н. от TSS (точки старта транскрипции). Черные прямоугольники обозначают экзоны.

Таким образом, последовательности копий между собой не отличались, а выявленные SNP и инсерция/делеция, позволяли отличать изучаемый аллель *Ppd-B1a* от других доминантных аллелей.

3.2 Измерение копийности гена *PPD-B1* и анализ межкопийного района

Díaz с соавторами (Díaz et al., 2012) показали, что чувствительность к длине дня может быть обусловлена не только нуклеотидным полиморфизмом гена *PPD-B1*, но и изменением числа копий гена. Сорта с увеличенным числом копий гена *PPD-B1* характеризуются слабой чувствительностью к фотопериоду, в то время как сорта с базовым числом копий данного гена чувствительны к длине дня. Увеличение числа копий гена влечет за собой усиление экспрессии в ночной период, влияя тем самым на чувствительность к фотопериоду и раннее колошение. С использованием ПЦР в реальном времени, было показано, что линии Ppd-m, Ppd-w и Sonora характеризуются увеличенным числом копий гена *Ppd-B1* (рис. 4А). Данный аллель был обозначен нами как *Ppd-B1a^{cnv}*. Межкопийная область данного аллеля характеризуется той же последовательностью, что и у сортов Sonora 64, Timstein и C591 (рис. 4В).

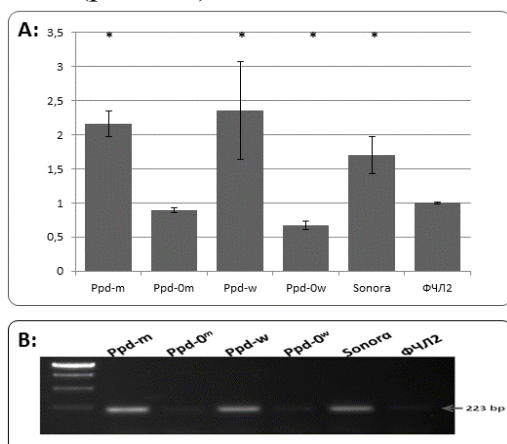


Рис. 4. А: Оценка копийности гена *PPD-B1* у исследуемых линий методом ПЦР в реальном времени. **В:** Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с использованием праймеров к межкопийному району гена *PPD-B1*, характерному для сортов Sonora 64, Timstein, C591 на материале почти изогенных линий и их родительских форм, отличающихся по чувствительности к фотопериоду.

Принимая во внимание результаты секвенирования последовательностей гена *PPD-B1*, можно сказать, что никаких различий между копиями выявлено не было и аллель *Ppd-B1a^{cnv}* линий Ppd-m и Ppd-w отличается от аллеля сортов Sonora 64, Timstein и C591 однонуклеотидной делецией в промоторной области.

Таким образом, мы показали, что причиной нечувствительности к фотопериоду, и, как следствие, раннего колошения линий Ppd-m и Ppd-w является доминантный аллель *Ppd-B1a^{cnv}* с увеличенным числом копий, а не изменения в структуре гена. Данный аллель впервые обнаружен у линий, культивируемых на территории России.

3.3 Биоинформатический анализ промоторов генов *PPD-1*

PPD-B1 является единственным геном семейства *PPD-1*, для которого описаны нечувствительные к фотопериоду аллели, обусловленные увеличением числа копий. Тем не менее, мало что известно о механизмах, лежащих в основе изменения экспрессии данного аллеля.

Ранее было сделано предположение, что делеции в промоторных областях нечувствительных к фотопериоду аллелей *Ppd-A1a* и *Ppd-D1a* обуславливают

изменение экспрессии соответствующих генов из-за исчезновения сайта связывания репрессора CHE (CCA1 NIKING EXPEDITION) (Wilhelm et al., 2009). Можно предположить, что нарушение экспрессии аллеля *Ppd-B1a* с увеличенным числом копий является результатом того, что число копий гена увеличивается, а количество репрессора остается неизменным. Но в таком случае наблюдалось бы изменение экспрессии всех генов *PPD-1*. Было показано, что нарушенная экспрессия *Ppd-B1a* с увеличенным числом копий не влияет на экспрессию *Ppd-A1b* и *Ppd-D1b* (Shaw et al., 2012). Таким образом, предположение о роли числа копий *PPD-B1* против количества репрессора можно отвергнуть.

Для того, чтобы выявить возможные факторы, вовлеченные в регуляцию *PPD-B1*, но не *PPD-A1* и *PPD-D1*, были проанализированы промоторные области данных генов. Сайты связывания выявленных транскрипционных факторов, ассоциированных с временем колошения или циркадными ритмами и специфичные для *PPD-B1* гена представлены на рис. 5.

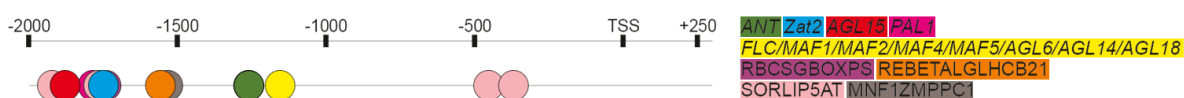


Рис. 5. Сайты связывания транскрипционных факторов, специфичных для *PPD-B1* гена. TSS обозначает сайт старта транскрипции, расстояния представлены в парах нуклеотидов.

Среди транскрипционных факторов, ассоциированных со временем цветения, были гены из семейств *MADS-box* и *MYC*. Некоторые из них являются активаторами цветения, другие – негативно регулируют переход от вегетативной к генеративной фазе развития (Michaels & Amasino, 2001; Scortecci et al., 2003; Adamczyk et al., 2007).

Сопоставляя данные о регуляторных элементах в промоторе гена *PPD-B1* с данными об общих транскрипционных факторах гомеологичных *PPD-1* генах, можно предположить, что основную роль в нарушении экспрессии *Ppd-B1* с увеличенным числом копий выполняют *MADS*-гены. Возможно, *Ppd-B1a* с увеличенным числом копий продолжает экспрессироваться в темновой период из-за того, что количество специфичного для данного гена репрессора уменьшается в пересчете на одну копию гена.

4. Анализ времени колошения линий популяции RICL от скрещивания CS и CS-5Bdic

По данным предварительного анализа, разница во времени колошения Chinese Spring (CS) и линии сорта Chinese Spring, у которой 5В хромосома замещена на 5В хромосому *T. dicoccoides* (CS-5Bdic), составляла около 15 дней. Был проведен фенотипический анализ времени колошения в различных условиях 116 линий популяции RICL (рекомбинантных инбредных хромосомных линий), полученных от скрещивания CS и CS-5Bdic.

Оценка времени колошения яровизированных и неяровизированных растений проводилась в контролируемых условиях теплицы (осенняя вегетация). Различия по времени колошения у неяровизированных родительских сортов составляло 16 дней,

в то время как между растениями, подвергнутыми яровизации, значимых различий не наблюдалось.

Распределение линий по времени перехода к колошению (рис. 6) может говорить о количественном характере признака. Поскольку различия по времени колошения наблюдались только у неяровизированных растений, можно предположить, что они могут быть связаны с генами системы ответа на яровизацию.

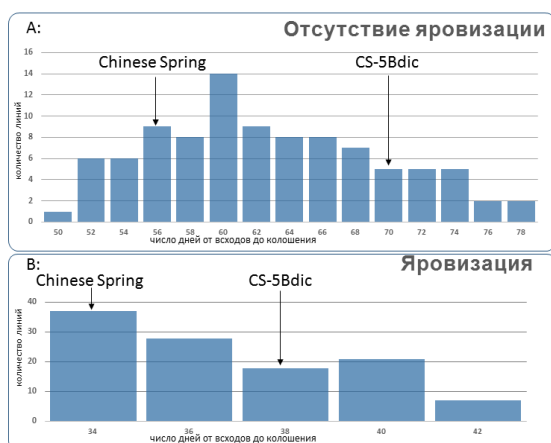


Рис. 6. Распределение перешедших к колошению линий популяции RICL и их родительских сортов CS и CS-5Bdic по дням от всходов до колошения. А: распределение линий, не подвергнутым воздействию яровизации; В: распределение яровизированных линий (30 дней при +3 °С).

5. SNP-генотипирование для определения локуса, ассоциированного со временем колошения у RICL

Для выявления локуса, ассоциированного с различием линий по времени колошения, RICL были генотипированы с использованием 13007 SNP маркеров чипа Illumina Infinium 15k Wheat, из которых 418 маркеров были полиморфны между родительскими линиями.

5.1 Генетическая карта хромосомы 5В

Генетическая карта была разработана с использованием данных генотипирования 116 рекомбинантных инбредных линий с 418 полиморфными SNP маркерами с помощью программы MultiPoint (версия “UltraDense”). Длина получившейся карты составила 80.4 сМ (картирующая функция Косамби) и включала в себя 379 маркеров, из которых 82 – скелетные маркеры, каждый из которых представляет группу нерекombинирующих между собой (косегрегирующих) маркеров. Количество маркеров в таких группах варьировало от 2 до 23 маркеров.

5.2 QTL анализ

С использованием QTL анализа, значимые LOD были выявлены только в эксперименте с неяровизированными растениями. Идентифицированный QTL был локализован в прицентромержной области 5В хромосомы в интервале 11.2–18.4 сМ (рис. 7). Ген *VRN-B1* располагался в позиции 33.4 сМ и никаких корреляций данного локуса с временем колошения в данном анализе выявлено не было.

QTL, ассоциированный с временем колошения, соответствовал нескольким группам косегрегирующих маркеров. Поскольку SNP-маркеры, использованные в данном чипе, были разработаны на основании кодирующих последовательностей (Wang et al., 2014), можно сравнить их с последовательностями из баз данных для

модельных видов растений, чтобы выявить гены-кандидаты, обуславливающие изменение времени колошения.

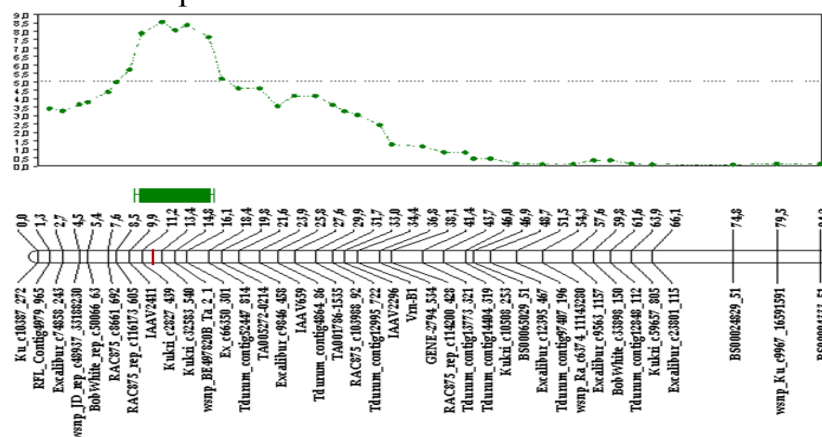


Рис. 7. Сокращенная генетическая карта 5В хромосомы с локализацией QTL времени колошения. Пунктирная линия означает пороговый уровень LOD.

5.3 Идентификация генов - вероятных детерминант времени колошения, локализованных в прицентроммерной области хромосомы 5В

Последовательности 78 SNP, локализованных в интервале 11.2–18.4 сМ идентифицированного QTL, были проанализированы с целью выявить гены-кандидаты, вовлеченные в определение времени колошения. Было проведено сравнение последовательностей SNP с последовательностями из баз данных следующих видов: *Brachypodium distachyon*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare*, *Aegilops tauschii*, *T. urartu* и *T. aestivum* с использованием алгоритма BLASTN. Были определены кодирующие последовательности, перекрывающие SNP локусы, охарактеризованы кодируемые белки, домены и возможные функции. Среди выявленных генов-кандидатов были последовательности, контролирующие устойчивость растения к стрессовым воздействиям, метаболизм фитогормонов, устойчивость к заболеваниям, фотосинтез, фолдинг белков, межклеточный транспорт и несколько транскрипционных факторов. Среди них, наиболее вероятными кандидатами для модуляции времени колошения можно считать транскрипционные факторы *WRKY*, *ERF/AP2*, *FHY3/FAR1*, а также ген *ELF4* (*EARLY FLOWERING4*).

6. Анализ паттернов суточной экспрессии генов цветения пшеницы

Для изучения взаимодействий генов колошения пшеницы был проведен анализ экспрессии генов фотопериодической чувствительности, генов восприятия света и генов трансдукции сигнала. Были использованы 21-дневные растения поздно переходящего к колошению ФЧЛ2, рано переходящего к колошению сорта Sonoga и почти изогенных линий Ppd-m и Ppd-w, представляющих собой ФЧЛ2 с некоторыми локусами, включая *Ppd-B1a^{cnv}*, интрогрессированными от Sonoga. Результаты анализа суточной экспрессии представлены на рис. 8. Ген *PPD-B1*, как и ожидалось, экспрессировался днем у всех исследуемых линий, а ночью только у нечувствительных к фотопериоду. Ген *TaFT1* экспрессировался только у нечувствительных к фотопериоду ранозацветающих форм, что подкрепляется предыдущими исследованиями (Kitagawa et al., 2012; Shaw et al., 2012).

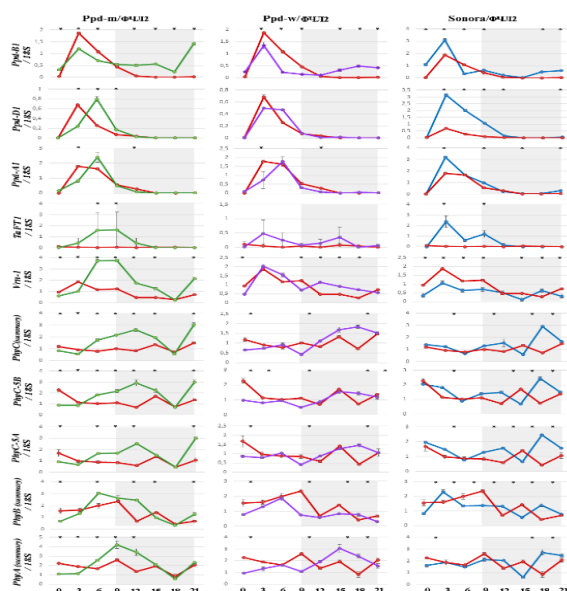


Рис. 8. Паттерны суточной экспрессии генов. Серые области обозначают ночной период (9 – 24 часа) в климатической камере. На графиках представлен относительный уровень экспрессии генов нечувствительных к фотопериоду почти изогенных линий Ppd-m (зеленый), Ppd-w (фиолетовый) и родительского сорта Sonora (синий) относительно чувствительного к фотопериоду реципиентного родителя ФЧЛ2 (красный).

Были проанализированы корреляции между паттернами экспрессии генов по отдельности в световой и темновой периоды у чувствительных и нечувствительных к фотопериоду линий. Экспрессия *TaFT1* коррелировала с экспрессией *PPD-1* генов у нечувствительных к фотопериоду линий, а у родительской линии ФЧЛ2 ген *TaFT1* не экспрессировался совсем.

Была выявлена значимая корреляция между *Ppd-B1a* и *PHYC* в течение ночного периода у нечувствительных к фотопериоду линий. Фитохромы, экспрессируясь ночью (в темновой период), образуют неактивные молекулы Фкр (фитохром, с максимумом поглощения в красной области спектра) (Kendrick & Kronenberg, 1994; Terzaghi & Cashmore, 1995), которые не могут влиять на экспрессию других генов. Таким образом, выявленная корреляция вероятнее всего означает, что *Ppd-B1a^{cnv}*, экспрессируясь в темновой период, положительно влияет на экспрессию *PHYC*, а не наоборот. Для *PHYA* была отмечена такая же тенденция, но значимых корреляций выявлено не было. Поскольку *Ppd-1b* дикого типа (чувствительность к фотопериоду) не экспрессируются в темновой период, они не могут влиять на экспрессию *PHYC* в общем. Возможно, *Ppd-1b* и оказывают влияние на экспрессию *PHYC* днем, но, вероятнее всего, деградация мРНК *PHYC* нивелирует этот возможный эффект.

Ранее было показано, что почти изогенные линии, несущие нечувствительные к фотопериоду *Ppd-1a* аллели (*Ppd-D1a* или *Ppd-B1a*) содержат увеличенное количество белка фитохрома по сравнению с сестринскими линиями, несущими все рецессивные *Ppd-1b* аллели (Кошкин и др., 2004). Таким образом, можно предположить, что *Ppd-1a* гены могут напрямую или опосредованно влиять на экспрессию *PHYC*. Чтобы подкрепить это предположение, были *in silico* проанализированы последовательности генов *PHYC* для обнаружения вероятных сайтов связывания *PPD-1*. Были выявлены сайты связывания транскрипционных факторов семейств RR (Response Regulator) и PRR (Pseudo Response Regulator), к которому относятся гены *PPD-1*.

Вместе взятые, данные о корреляции паттернов экспрессии *Ppd-B1a* и *PHYC*, анализ промотора *PHYC* и данные о том, что линии с нечувствительными к фотопериоду аллелями *Ppd-1a* характеризуются увеличенным количеством белка фитохрома (Кошкин et al., 2004), позволяют предположить, что *Ppd-B1a^{cnv}*, экспрессируясь ночью, может положительно регулировать экспрессию *PHYC*.

7. Вклад локуса, расположенного в прицентромерной области хромосомы 5В, во взаимодействие *PHYC* и *PPD-B1*

В ходе изучения почти изогенных линий от скрещивания раннего сорта Sonora и позднего ФЧЛ2, было отмечено, что хотя обе линии, Ppd-m и Ppd-w, несут интрогрессию на хромосоме 2В от Sonora, и, таким образом, содержат доминантный *Ppd-B1a^{cnv}*, обуславливающий нечувствительность к фотопериоду, всё-же значительно отличаются по времени колошения. Линия Ppd-m переходила к колошению на 4 дня раньше Ppd-w. SSR-генотипирование показало, что данные линии отличаются локусом в прицентромерной области хромосомы 5В. В то же время, анализ популяции рекомбинантных инбредных хромосомных линий, отличающихся по времени колошения, позволил выявить QTL, локализованный как раз в прицентромерной области хромосомы 5В.

Для данного локуса были охарактеризованы гены-кандидаты *FHY3/FAR1*, *AP2/ERF*, *WRKY* и *ELF4*. Сайт связывания *FHY3/FAR1* был обнаружен в промоторах таких генов, как *PPD-1*, *PHYC* и *TaFT1*. Таким образом, *FHY3/FAR1* является хорошим кандидатом для объяснения разницы по времени колошения линий. В ходе данной работы было показано, что экспрессия *FHY3/FAR1* была выше у линии Ppd-m в 6 – 12 часов после рассвета, откуда можно предположить, что данный ген может быть вовлечен в регуляцию времени колошения (рис. 9).

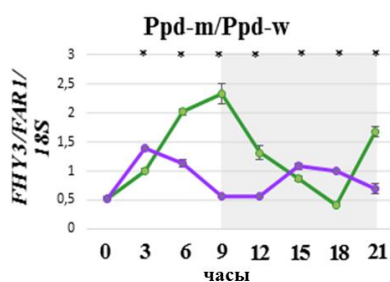


Рис. 9. Паттерны суточной экспрессии *FHY3/FAR1*. Серые области обозначают ночной период (9 – 24 часа). На графиках представлен относительный уровень экспрессии генов нечувствительных к фотопериоду линий Ppd-m (зеленый) и Ppd-w (фиолетовый).

Известно, что *FHY3/FAR1* вовлечен в передачу сигнала от фитохромов у арабидопсиса и риса (Li et al., 2011; Mongkolsiriwatana et al., 2009) и в контроль накопления фитохромов опосредованно через *FHY1* у арабидопсиса (Genoud et al., 2008). Тем не менее, никаких данных о функциях *FHY3/FAR1* у пшеницы пока нет.

У пшеницы фитохромы (*PHYB* и *PHYC*) положительно влияют на экспрессию *PPD-1* генов (Chen et al., 2014; Pearce et al., 2016), и, как следствие, индуцируют время колошения. Можно предположить, что *FHY3/FAR1*, вовлеченный в контроль времени цветения у некоторых видов растений, может принимать участие в этом процессе. В ходе данной работы было сделано предположение о положительном влиянии доминантного аллеля *Ppd-B1a^{cnv}* на экспрессию *PHYC*. Таким образом, полученные данные говорят о вероятной положительной обратной связи между

PHYS и *Ppd-B1a^{cnv}* с возможным участием *FHY3/FAR1*. Данная гипотеза требует дальнейших исследований и проверки. Используемые в данной работе почти изогенные линии, отличающиеся прицентромерным локусом на хромосоме 5B, являются подходящим материалом для такой работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием двух генетических моделей выявлены локусы на хромосомах 2B и 5B, ассоциированные с различием по времени колошения. На материале пары почти изогенных линий, полученных от скрещивания рано переходящего к колошению сорта Sonoga и поздно переходящей к колошению линии ФЧЛ2, с помощью SSR-маркирования был выявлен локус на хромосоме 2B, ассоциированный с изучаемым признаком. Более детальный анализ показал, что ген *PPD-B1*, являющийся одним из наиболее значимых регуляторов цветения пшеницы, находится в данном локусе и детерминирует различия линий по фенотипу. Секвенирование данного гена позволило выявить инсерцию/делецию и несколько SNP, отличающих изучаемый аллель от других доминантных аллелей. Методом количественного ПЦР было установлено, что нечувствительный к фотопериоду *Ppd-B1a^{cnv}* характеризуется увеличенным числом копий.

Одним из нерешенных вопросов на сегодняшний день остается вопрос регуляции экспрессии аллеля *Ppd-B1a^{cnv}* с увеличенным числом копий. Известно, что суточные паттерны экспрессии таких аллелей нарушены, они экспрессируются в ночной период, в отличие от чувствительных к фотопериоду аллелей, для которых экспрессия показана только в дневные часы. Если для доминантных аллелей *Ppd-1a*, характеризующихся делециями или инсерциями, предложены вероятные механизмы нарушения паттерна экспрессии – удаление регуляторных областей или разъединение сайтов связывания репрессоров, то механизмы регуляции *Ppd-B1a* с увеличенным числом копий остаются неизученными. В данной работе был проведен биоинформатический анализ промоторов *PPD-1* генов для выявления вероятных причин нарушения экспрессии *Ppd-B1a* с увеличенным числом копий. По результатам данного анализа предложена гипотеза о том, что вероятной причиной усиления экспрессии *Ppd-B1a* является дисбаланс между увеличенным числом копий гена и количеством специфичного для *PPD-B1* репрессора, которое остается неизменным. При этом, наиболее вероятными кандидатами на роль репрессоров являются гены семейства *MADS*, сайты связывания которых были обнаружены в промоторной области *PPD-B1*, которые регулируют время цветения у других видов растений.

Для идентификации локуса на хромосоме 5B, индуцирующего переход к колошению, был проведен фенотипический анализ популяции RICL с последующим высокопроизводительным генотипированием SNP-маркерами линий данной популяции. С использованием полученных данных был проведен QTL анализ, который выявил локус в прицентромерной области хромосомы 5B, достоверно ассоциированный со временем колошения. Гены, ассоциированные с SNP маркерами, расположенными в данной области, являются вероятной причиной

различия линий по времени колошения. Транскрипционные факторы *WRKY*, *ERF/AP2*, *FHY3/FAR1* и ген *ELF4*, гомология с которыми была показана для последовательностей, ассоциированных с SNP из данного локуса, являются известными регуляторами времени колошения у многих растений. Можно предположить, что возможной причиной различий по времени колошения является разное происхождение генов пути колошения и возможных участников этих взаимодействий, локализованных на хромосоме 5В. Интересно, что у почти изогенных линий (первая генетическая модель) также обнаружилось различие по локусу на хромосоме 5В в области вероятной локализации *FHY3/FAR1*.

В ходе изучения взаимодействий генов колошения путем сравнения суточных паттернов экспрессии и их корреляций, было сделано предположение, что нечувствительный к фотопериоду *Ppd-B1a* может оказывать положительное влияние на экспрессию гена рецептора красного света, *PHYC*. Имеющиеся данные также позволяют предположить возможное участие *FHY3/FAR1*, локализованного в прицентромерной области хромосомы 5В, во взаимодействии между *PHYC* и *Ppd-B1a*.

Таким образом, в данной работе подробно рассмотрены важные детерминанты времени колошения мягкой пшеницы. С использованием различных систем маркеров локализованы районы на хромосомах В-генома, связанные с индукцией колошения. Изучены последовательности, расположенные в выявленных локусах.

ВЫВОДЫ

1. Выявлен район на коротком плече хромосомы 2В между маркерами *Xgwm148* и *Xgwm388*, ассоциированный с различиями по времени колошения у почти изогенных линий *Ppd-m* и *Ppd-0^m*, *Ppd-w* и *Ppd-0^w*. Установлено, что доминантный аллель *Ppd-B1a*, локализованный в данном районе, детерминирует данный признак.
2. Структурно-функциональный анализ аллеля *Ppd-B1a* у линий *Ppd-m* и *Ppd-w* показал, что причиной раннего колошения является увеличение числа копий гена. Выявленный доминантный аллель *Ppd-B1* с увеличенным числом копий гена был обозначен как *Ppd-B1a^{cnv}*. Последовательности копий были одинаковыми, но выявленные однонуклеотидные замены и инсерция/делеция позволяли отличать *Ppd-B1a^{cnv}* от других аллелей *PPD-B1*. Впервые предложен механизм модуляции экспрессии аллеля *Ppd-B1a* с увеличенным числом копий гена с участием транскрипционных факторов MADS-box.
3. Построена генетическая карта хромосомы 5В пшеницы, включающая 379 SNP маркеров, с использованием популяции рекомбинантных инбредных хромосомных линий, полученных от скрещивания CS и CS-5Bdic. QTL-анализ позволил выявить новый локус в прицентромерной области хромосомы 5В, ассоциированный с различиями по времени колошения при развитии без яровизации. Для данного локуса выявлены новые вероятные гены-кандидаты, детерминирующие время колошения мягкой пшеницы: *WRKY*, *AP2/ERF*, *FHY3/FAR1* и *ELF4*.

4. Анализ паттернов суточной экспрессии генов, контролирующих цветение мягкой пшеницы и их корреляций впервые позволил установить, что доминантный аллель *Ppd-B1a^{cnv}* в ночное время положительно регулирует экспрессию *PHYC*, гена рецептора красного света, инициирующего переход к цветению.
5. Впервые показано, что транскрипционный фактор *FHY3/FAR1*, локализованный на хромосоме 5B, может быть вовлечен во взаимодействие генов *PPD-B1* и *PHYC* мягкой пшеницы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации по теме работы в рецензируемых журналах:

1. **Киселева А.А.**, Егги Э.Э., Кошкин В.А., Ситников М.Н., Родер М., Салина Е.А., Потоккина Е.К. Выявление генетических детерминант, определяющих различие почти изогенных линий *Triticum aestivum* L. по фотопериодической чувствительности // Генетика, 2014, Генетика Т. 50, № 7, С. 802–813
2. **Kiseleva A.A.**, Shcherban A.B., Leonova I.N., Frenkel Z. and Salina E.A. Identification of new heading date determinants in wheat 5B chromosome // BMC Plant Biology, 2016, V. 16(Suppl 1), №. 8, p. 35-46
3. **Kiseleva A.A.**, Potokina E.K., Salina E.A. Features of *Ppd-B1* expression regulation and their impact on the flowering time of wheat near-isogenic lines // BMC Plant Biology, 2017, V.17(Suppl 1), №. 1, p. 172
4. **Киселёва А.А.**, Салина Е.А. Генетические механизмы формирования времени колошения мягкой пшеницы // Генетика 2018, Т. 54, № 4, С.1-16