

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](http://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 domestикация 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<sup>m</sup> и Ppd-0<sup>w</sup>), 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<sup>cnv</sup>*, 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<sup>cnv</sup>* 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<sup>m</sup>* и *Ppd-0<sup>w</sup>*, 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° С). 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)<sub>18</sub> 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.

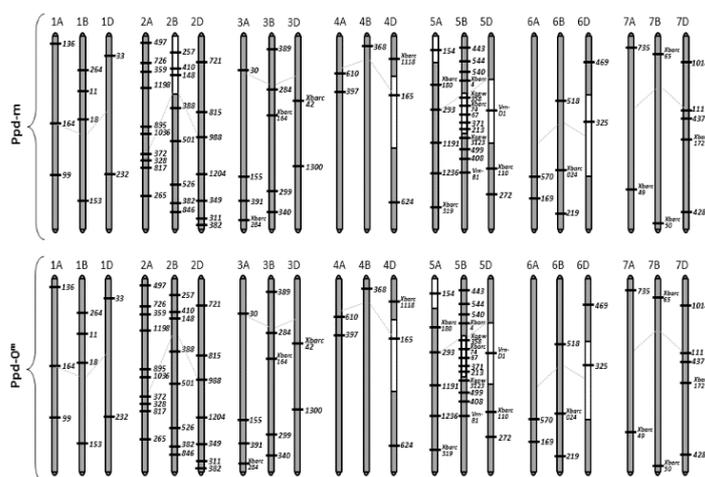
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

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

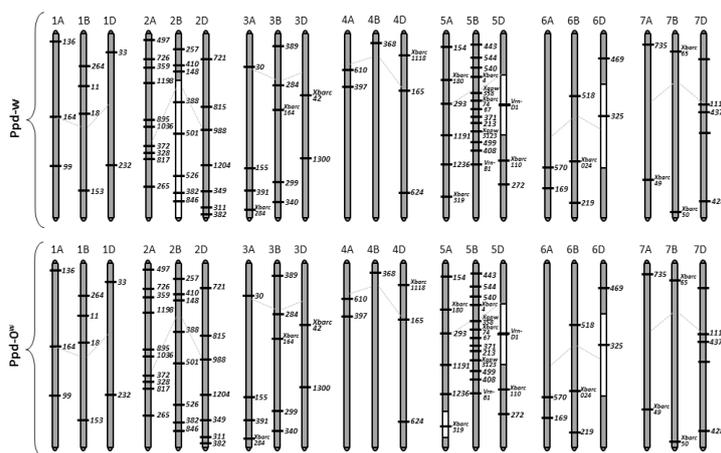
Основными детерминантами раннего колошения у мягкой пшеницы являются гены потребности яровизации и гены чувствительности к фотопериоду (длине дня). Поэтому у исследуемых почти изогенных линий Ppd-m и Ppd-w, их сестринских линий Ppd-0<sup>m</sup> и Ppd-0<sup>w</sup> и их родительских сортов Sonoga (раннее 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 Sonoga и ФЧЛ2, ассоциированы с интрогрессией на хромосоме 2В между маркерами *Xgwm148* и *Xgwm388* (рис. 1, 2), унаследованной от нечувствительного к фотопериоду сорта Sonoga.



**Рис. 1.** Генотипы почти изогенной линии Ppd-m и её сестринской линии Ppd-0<sup>m</sup> с интрогрессированными аллелями сорта Sonoga (белый цвет) в генетическую среду реципиентного родителя ФЧЛ2 (серый цвет).



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

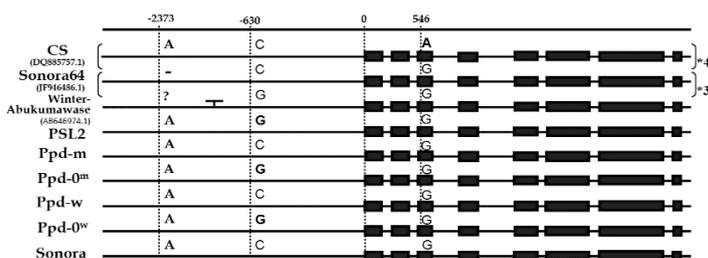
Таким образом, в результате SSR генотипирования было установлено, что почти изогенные линии и их сестринские линии имеют практически идентичный геном, за исключением хромосомы 2В. В данной области локализован ген *PPD-B1* (Mohler et al., 2004).

### 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.

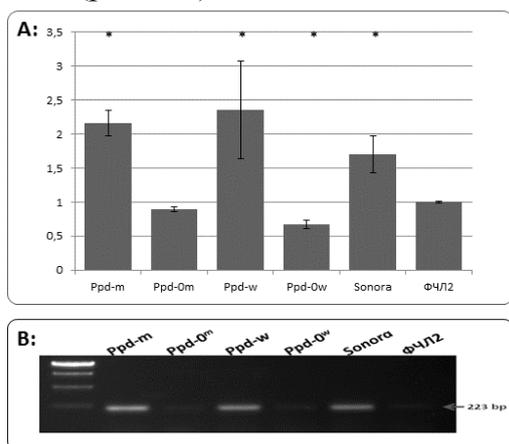


**Рис. 3.** Схема гена *PPD-B1* с обозначением характерных особенностей. Расстояния представлены в п.н. от TSS (точки старта транскрипции). Черные прямоугольники обозначают экзоны.

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<sup>cnv</sup>*. 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<sup>cnv</sup>* 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<sup>cnv</sup>* с увеличенным числом копий, а не изменения в структуре гена. Данный аллель впервые обнаружен у линий, культивируемых на территории России.

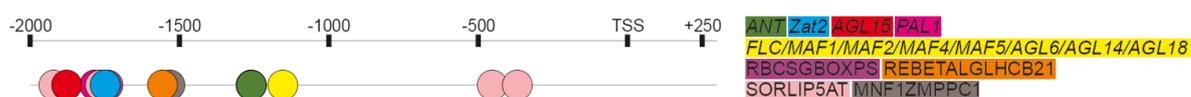
### 3.3 Биоинформатический анализ промоторов генов *PPD-1*

*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.

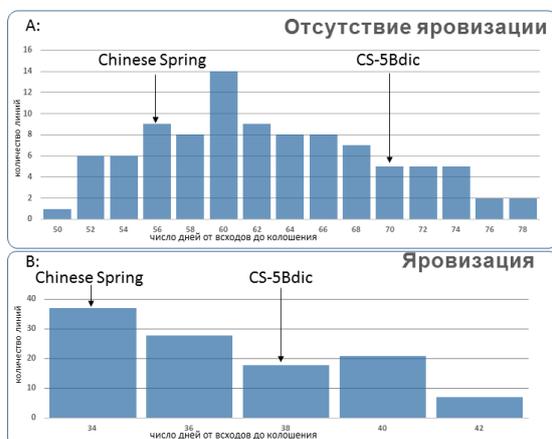
#### 4. Анализ времени колошения линий популяции RICL от скрещивания CS и CS-5Bdic

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

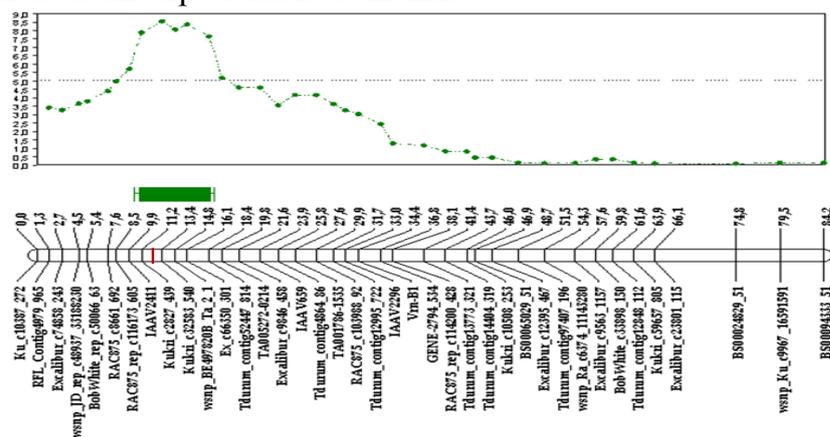
Генетическая карта была разработана с использованием данных генотипирования 116 рекомбинантных инбредных линий с 418 полиморфными SNP маркерами с помощью программы MultiPoint (версия “UltraDense”). Длина получившейся карты составила 80.4 сМ (картирующая функция Косамби) и включала в себя 379 маркеров, 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.



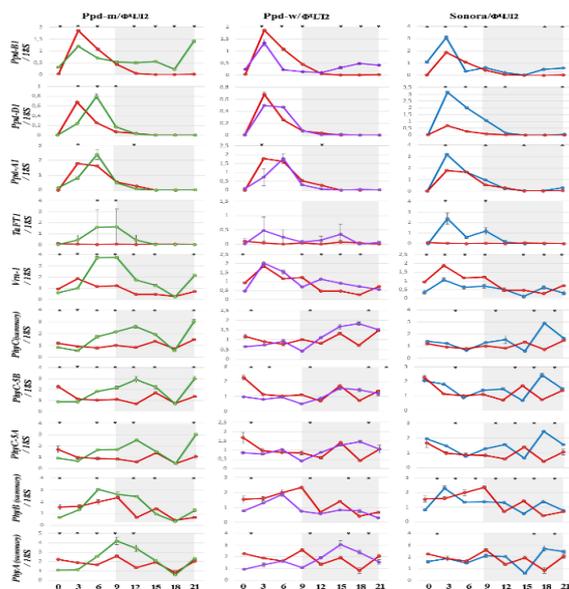
**Рис. 7.** Сокращенная генетическая карта 5В хромосомы с локализацией QTL времени колошения. Пунктирная линия означает пороговый уровень LOD.

### 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<sup>cnv</sup>*, 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<sup>cnv</sup>*, 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.

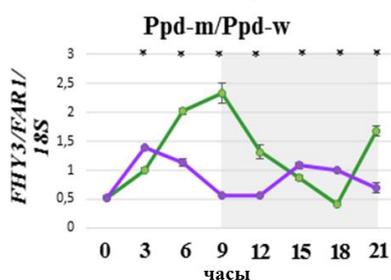
Ранее было показано, что почти изогенные линии, несущие нечувствительные к фотопериоду *Ppd-1a* аллели (*Ppd-D1a* или *Ppd-B1a*) содержат увеличенное количество белка фитохрома по сравнению с сестринскими линиями, несущими все рецессивные *Ppd-1b* аллели (Кошкин и др., 2004). Таким образом, можно предположить, 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<sup>cnv</sup>*, 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<sup>cnv</sup>*, 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<sup>cnv</sup>* на экспрессию *PHYC*. Таким образом, полученные данные говорят о вероятной положительной обратной связи между

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

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием двух генетических моделей выявлены локусы на хромосомах 2В и 5В, 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 2В, 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<sup>cnv</sup>* характеризуется увеличенным числом копий.

Одним из нерешенных вопросов на сегодняшний день остается вопрос регуляции экспрессии аллеля *Ppd-B1a<sup>cnv</sup>* 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 5В, индуцирующего переход к колошению, был проведен фенотипический анализ популяции R1CL с последующим высокопроизводительным генотипированием SNP-маркерами линий данной популяции. С использованием полученных данных был проведен QTL анализ, который выявил локус в прицентромерной области хромосомы 5В, 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<sup>m</sup>*, *Ppd-w* и *Ppd-0<sup>w</sup>*. 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<sup>cnv</sup>*. Последовательности копий были одинаковыми, но выявленные однонуклеотидные замены и инсерция/делеция позволяли отличать *Ppd-B1a<sup>cnv</sup>* 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<sup>cnv</sup>* 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 5В, 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