

МУТЕРКО

Александр Феликсович

**АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *VRN* И *PPD* У
ТЕТРАПЛОИДНЫХ И ГЕКСАПЛОИДНЫХ ВИДОВ
РОДА *TRITICUM* L.**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2017

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

Артемов Глеб Николаевич

кандидат биологических наук, доцент кафедры
цитологии и генетики Томского государственного
университета, г. Томск.

Ведущее учреждение: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 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 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 «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Широкая адаптивная способность к произрастанию в различных климатических условиях, жизненный цикл, тип развития и время колошения пшеницы определяются, главным образом, аллельным составом генов, регулирующих потребность в яровизации (гены *VRN1-VRN4*) и чувствительность к фотопериоду (гены *PPD1*) (Worland 1996; Kamran et al. 2014). Мутации в регуляторных участках этих генов являются основными детерминантами их аллельного разнообразия. Кроме того, детектирован полиморфизм в кодирующей области генов *VRN-A1* и *VRN2*, влияющий на проявление контролируемого признака. Так, полиморфизм в четвертом и седьмом экзонах гена *VRN-A1* ассоциирован с различием в продолжительности яровизации, времени выхода в трубку, морозостойкости и сроках колошения (Chen et al. 2009; Eagles et al. 2011; Li et al. 2013). Мутации в экзоне-2 генов *ZCCT (VRN2)*, кодирующем консервативные сайты ССТ-домена, характеризуют рецессивные аллели, ассоциированные с яровым типом развития. (Yan et al. 2004b). Гены *VRN2-VRN4* характеризуются низким аллельным разнообразием в пшенице. В частности, не выявлено полиплоидных пшениц, яровой тип развития которых был бы обусловлен рецессивными аллелями гена *VRN2* (Yan et al. 2004b). Доминантные аллели гена *VRN3* встречаются крайне редко (Zhang et al. 2008; Chen et al. 2013). Ген *VRN-D4* является аутентичным для вида *Triticum sphaerococcum* (Kippes et al. 2015). Следует отметить, что исследование гена *VRN3*, как и оценка распространенности нуль-аллелей *ZCCT1* до настоящего времени, не проводились в тетраплоидной пшенице, а также у представителей других видов гексаплоидной пшеницы отличных от *T. aestivum*.

Из трех гомеологичных генов *PPD1*, ген *PPD-D1* изучен лучше остальных. Доминантный аллель *PPD-D1a* характеризуется наибольшим влиянием на подавление чувствительности к фотопериоду (Bentley et al. 2011) и получил широкое распространение в современных скороспелых сортах мягкой пшеницы. В этой связи, исследование регуляторных участков данного гена в других видах гексаплоидной пшеницы отличных от *T. aestivum* кажется избыточным.

Генофонд различных видов полиплоидной пшеницы широко используется селекционными центрами различных стран в качестве природного источника аллельного разнообразия генов многих агрономически ценных признаков (Arzani et al. 2017). Оценка аллельного разнообразия генов *VRN* и *PPD1* в ранее не изученных видах пшеницы позволяет выявить наиболее перспективные источники полиморфизма соответствующих генных локусов, доноров новых

аллелей и гаплотипов. И хотя внедрение последних в селекцию пшеницы является трудно достижимым за короткое время, тем не менее, их идентификация и анализ имеют большое значение в области фундаментальных исследований. Такие исследования расширяют и корректируют наши представления о структуре и функции анализируемых генов, а также улучшают наше понимание путей и механизмов, детерминирующих развитие пшеницы, ее адаптивный потенциал. Однако аллельное разнообразие и первичная структура генов *VRN* и *PPD1* достаточно хорошо изучены только в одном виде гексаплоидной пшеницы, *T. aestivum*, а также частично в некоторых видах тетраплоидной пшеницы. При этом полиморфизм данных генов в других видах полиплоидной пшеницы является практически не исследованным. В этой связи, актуальным является анализ полиморфизма регуляторных районов генов *VRN* и *PPD1* с привлечением расширенной выборки тетраплоидных и гексаплоидных видов пшеницы.

Цель работы: исследовать полиморфизм регуляторных районов генов *VRN* и *PPD1*, использовать его для идентификации и оценки распространенности аллельных вариантов этих генов у тетраплоидных и гексаплоидных видов пшеницы.

Задачи:

1. Оптимизировать метод анализа регуляторных районов генов *VRN1*, *PPD-A1* и *PPD-B1*. Разработать диагностические маркеры для идентификации аллельных вариантов и гаплотипов этих генов.
2. Исследовать полиморфизм регуляторных районов генов *PPD-A1* и *PPD-B1* у ранее не изученных видов тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы.
3. Провести анализ полиплоидной пшеницы по генам, характеризующимся низким аллельным разнообразием (*VRN2*, *VRN-B3* и *VRN4*).
4. Исследовать регуляторные районы генов гомеологической серии *VRN1* в тетраплоидной пшенице и в видах гексаплоидной пшеницы, отличных от *T. aestivum*.
5. Провести анализ полиморфизма транскрибируемого участка экзон-3 – экзон-7 гена *VRN-A1* в образцах тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы, несущих различные аллели этого гена.

Научная новизна исследования. Проведено масштабное исследование шести видов тетраплоидной и шести видов гексаплоидной пшеницы по генам *VRN1*, *VRN2* (*ZCCT1*), *VRN-B3*, *VRN-D4* и *PPD1*. Для большинства видов данное исследование было проведено впервые. Идентифицировано 14 новых полиморфных вариантов генов *VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN-D1* и *PPD-A1*. Уточнены границы критических, в регуляции транскрипции, участков в области

промотора и первого интрона генов *VRN1* и *PPD1*, а также существующие представления о происхождении ряда доминантных аллелей генов *VRN1* и *VRN-B3*. Предложен метод использования модуляции кривизны молекул ДНК для выявления полиморфизма нуклеотидных последовательностей и разработки особого типа кодоминантных ДНК-маркеров.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования. Выявлены наиболее перспективные образцы пшеницы, природные мутанты, носители уникальных аллелей и гаплотипов генов *VRN* и *PPD1*, их специфических комбинаций, которые могут быть использованы как в фундаментальных исследованиях, так и в практической селекции пшеницы. Уточнение границ критических, в регуляции транскрипции, участков в области промотора и первого интрона *VRN1* и *PPD1* способствует более точной идентификации и локализации регуляторных сайтов в этих генах. Применение предложенных в настоящем исследовании молекулярных маркеров для идентификации аллелей и гаплотипов *VRN1* и *PPD1* является эффективным подходом для проведения быстрого скрининга больших коллекций генетического материала методом ПЦР-анализа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Однонуклеотидные мутации в последовательности *VRN*-бокса, локализованного в области промотора гена *VRN-A1*, модулируют потребность пшеницы в яровизации и сроки колошения.
2. Дигенно- и тригенно-доминантные по *VRN-A1*, *VRN-B1* и *VRN-B3* генотипы отличают сорта твердой пшеницы из России, Украины и Казахстана от сортов *T. durum* из других центров культивирования.
3. Полиморфизм экзона-4 гена *VRN-A1* наблюдается исключительно в гексаплоидной пшенице и ассоциирован с мутантным типом экзона-7, а также наличием не менее двух копий этого гена в геноме.

Вклад автора. Все результаты получены автором самостоятельно. Клонирование фрагментов ПЦР анализируемых участков генов *VRN1* и *PPD-A1* проведено к.б.н. Календарем Р.Н.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на: 10-ой международной конференции "Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology" (Новосибирск, 2016); 3-й международной конференции "Plant genetics, genomics, bioinformatics and biotechnology" (Новосибирск, 2015); всеукраинской конференции молодых ученых "Инновации в современной селекции и генетике сельскохозяйственных культур" (Одесса, 2014). По теме диссертации опубликовано 18 работ. Из 10

статей, 6 представлены в журналах, рекомендованных ВАК РФ для защиты кандидатских и докторских диссертаций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 220 источников. Проиллюстрирована 7 таблицами, 28 рисунками, а также содержит 15 приложений на 55 страницах. Общий объем работы составляет 249 страниц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генетический материал представлен 372 образцами шести видов гексаплоидной пшеницы (геномный состав ВВА^uA^uDD): *T. aestivum* L., *T. spelta* L., *T. macha* Deкар, *T. vavilovii* Jakubz, *T. compactum* Host и *T. sphaerococcum* Percival, и шести видов тетраплоидной пшеницы (геномный состав ВВА^uA^u): *T. durum* Desf., *T. turgidum* L., *T. polonicum* L., *T. carthlicum* Nevski, *T. dicoccum* Schrank и *T. dicoccoides* Körn.

Экстракция ДНК, амплификация и электрофорез. Тотальная ДНК экстрагирована из 4 дневных проростков с применением ЦТАБ буфера (Doyle JJ et al. 1987). Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась в 6-12 мкл реакционной смеси с оптимизированным содержанием и концентрацией рабочих компонентов. Продукты амплификации разделены в 6.6-8% не денатурирующих полиакриламидных гелях в 1.38x ТБЭ буфере. Для детекции полиморфизма кривизны молекул ДНК проведена оптимизация условий электрофореза в ПААГ при низкой (8-18°C) и комнатной температуре. Агарозный гель-электрофорез выполнен в 1.5-2% агарозных гелях в 1x ТБЭ буфере.

Гетеродуплексный анализ проведен согласно ранее предложенной методике (Delwart et al. 1993).

Клонирование и секвенирование фрагментов ПЦР. Продукты амплификации были лигированы в вектор pGEM-T (Promega). Трансформированные клетки детектированы в ходе "сине-белой" селекции на питательной среде содержащей ампицилин, X-Gal, и IPTG. Плазмидная ДНК экстрагирована с помощью GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific). Для секвенирования по Сэнгеру использован "BigDye Terminator v3.1 sequencing kit".

Построение, анализ кривизны и гибкости трехмерных моделей ДНК молекул. Предполагаемая форма молекул ДНК рассчитана из нуклеотидных последовательностей, основываясь на конформационных параметрах двойной спирали. Кривизна молекулы в позиции i ($1 < i < n$) соответствовала обратному

радиусу описанной окружности треугольника, вершины которого лежат на оси спирали с координатами $i-20$, i , $i+20$ п.н., нормированному по величине средней кривизны ДНК в кристаллизованном нуклеосомном коре ($1/42.8 \text{ \AA}$). Распределение гибкости ДНК оценивалось по последовательности нуклеотидов, основываясь на соответствующих параметрах ди- и тетра-нуклеотидных шагов (Olson et al. 1998; Packer et al. 2000).

Анализ нуклеотидных последовательностей из баз данных. Для проведения *in silico* ПЦР программный доступ к ресурсам сервера NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) осуществлялся через интерфейс прикладного программирования. Множественное выравнивание проведено с использованием программы Clustal W (Thompson et al. 1994). Поиск гомологичных последовательностей в базе данных ESTs *T. aestivum* (UniGene Build #63), выполнен с помощью BLASTn (Camacho et al. 2009).

Кластерный анализ сортов *T. durum* проведен с использованием оптимизированного алгоритма управляемой иерархической кластеризации.

Филогенетический анализ осуществлен с помощью специально разработанного алгоритма, а также квазимедианных филогенетических сетей (Bandelt et al. 1999).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Исследование полиморфизма области промотора гена *PPD-A1*

В результате анализа области промотора гена *PPD-A1* в различных видах полиплоидной пшеницы идентифицировано 13 однонуклеотидных полиморфизма (ОНП), которые образовывали 13 различных комбинаций (гаплотипов). Гаплотипы *Ppd-A1b* были распределены по двум гаплогруппам (A1 и A2) на основании данных филогенетического анализа. Один из ОНП локализован в последовательности аденинового тракта (A-тракт, T-тракт, $A_n T_m$, $n+m \geq 4$), что приводит к модуляции кривизны молекулы ДНК и скорости миграции полиморфных ампликонов через ПААГ (Рис.1.А-Б). При этом, данный полиморфизм ассоциирован с событием первичной дивергенции и образованием гаплогрупп. Исследовано распространение гаплотипов в различных видах тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы из различных географических регионов. Выявлен высокий уровень полиморфизма по гаплогруппам и гаплотипам гаплогруппы A2 в сортах мягкой пшеницы *T. aestivum*.

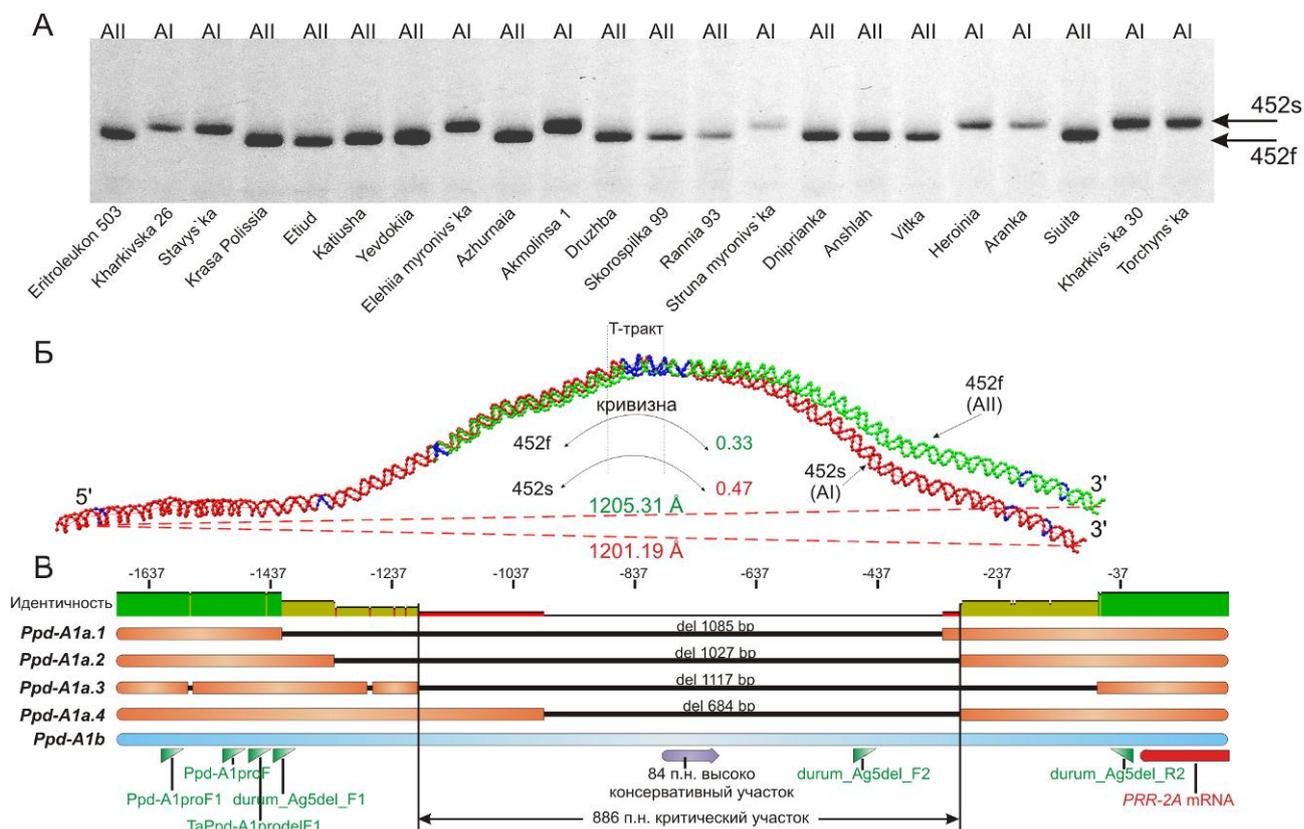


Рисунок 1. Анализ полиморфизма области промотора гена *PPD-A1*. (А) Полиморфизм участка промотора рецессивного аллеля *Ppd-A1b* и дискриминация гаплогрупп AI (452s) и AII (452f) в сортах мягкой пшеницы *T. aestivum*. (Б) Модуляция кривизны фрагментов ПЦР, детектирующих гаплогруппы *PPD-A1*. (В) Выравнивание нуклеотидных последовательностей области промотора аллелей *Ppd-A1*.

Пара праймеров *Ppd-A1proF* и *durum_Ag5del_R2* оптимизирована для получения ДНК-маркеров, идентифицирующих все известные доминантные аллели *Ppd-A1a*. В образцах гексаплоидной пшеницы вида *T. compactum* выявлен новый, предположительно доминантный, аллель *Ppd-A1a.4*, содержащий делецию 684 п.н. в области промотора. При этом, тогда как все четыре доминантных аллеля *Ppd-A1a* перекрывают общий участок -986 и -336 п.н., делеция в аллеле *Ppd-A1a.4* является наиболее короткой из них (Рис. 1В), что приводит к сдвигу левой границы критического, регуляторного участка на 207 п.н. в направлении стартового кодона. Уточнение границ "критического участка" повышает точность идентификации регуляторных районов промотора генов *PPD1*.

2. Анализ полиморфизма гена *PPD-B1* в полиплоидной пшенице

ПЦР-анализ с парами праймеров *TaPpd-B1proF1*–*TaPpd-B1int1R1* или *TaPpd-B1proinF1*–*206bp_del_25_R1* был оптимизирован для исследования области промотора гена *PPD-B1* в различных видах полиплоидной пшеницы, детекции

гаплотипов и гаплогруппы. Исследованы филогенетические взаимоотношения между гаплотипами *PPD-B1* и определен предполагаемый порядок их дивергенции в процессе эволюции. Полиморфизм в области промотора *PPD-B1* выявлен только в тетраплоидной пшенице. При этом выборки образцов видов *T. polonicum* и *T. durum* по гаплогруппе *PPD-B1* расщепляются почти в равном соотношении. Фрагменты ПЦР, детектирующие принадлежность соответствующих генотипов *PPD-B1* к гаплогруппе ВII, содержат комбинации из 3-4 мутаций, локализованных в регуляторном участке этого гена.

3. Анализ генов *VRN* характеризующихся низким аллельным разнообразием

3.1. Оценка распространенности нуль-аллелей генов *VRN2 (ZCCT1)*

Ген *VRN2* характеризуется дозовым влиянием на фенотип (Distelfeld et al. 2009). Кроме того, мутации в области кодирующей ССТ-домен не устраняют конкурентное взаимодействие *VRN2* с другими ССТ-домен-содержащими белками (Li et al. 2011). Таким образом, важной характеристикой является наличие нуль-аллелей данного гена. Однако исследование нуль-аллелей *VRN2* не проводилось в видах пшеницы отличных от *T. aestivum* (Zhu et al. 2011). В ходе анализа пяти видов гексаплоидной и шести видов тетраплоидной пшеницы идентифицированы нуль-аллельные варианты генов *ZCCT1* в А, В и D геномах в различных комбинациях. Нуль-аллели генов *ZCCT1* отсутствовали в таких видах пшеницы как *T. sphaerococcum*, *T. vavilovii*, *T. dicoccum* и *T. dicoccoides*. Носители нуль-аллельных вариантов *ZCCT1* могут быть использованы для дальнейшего изучения влияния этих генов на качественные и количественные показатели агрономически ценных признаков пшеницы.

3.2. Анализ участка промотора гена *VRN-B3*

Для идентификации аллельных вариантов гена *VRN-B3* в ходе одной реакции, оптимизирована мультиплекс-ПЦР с праймерами FT-B-INS-F, *VRN4-B-NOINS-F2* и *VRN4-B-NOINS-R*. В результате анализа 181 образца полиплоидной пшеницы не выявлено доминантных аллелей *VRN-B3*. Полученные результаты подтверждают низкую распространенность доминантных аллелей этого гена не только в сортах *T. aestivum*, но также и в других гексаплоидных и тетраплоидных видах.

3.3. Идентификация гена *VRN-D4*

Для идентификации гена *VRN-D4* разработана аллель-специфическая ПЦР (АС-ПЦР). Целевой фрагмент, детектирующий ген *VRN-D4*, выявлен только в образцах вида *T. sphaerococcum*, которые не несут доминантные аллели генов *VRN1*.

4. Исследование регуляторных участков генов *VRN1* в различных видах гексаплоидной и тетраплоидной пшеницы

4.1. Анализ регуляторных районов гена *VRN-A1*

В ходе исследования области промотора гена *VRN-A1* в образцах гексаплоидной пшеницы вида *T. compactum*, идентифицирован новый вариант доминантного аллеля *Vrn-A1a*, характеризующийся наличием делеции 16 п.н. и 4 ОНП в последовательности мобильного генетического элемента (МГЭ) MITE_VRN в промоторе одной из копий *VRN-A1*. Кроме того, в образцах этого же вида идентифицирован новый аллель *Vrn-A1j*, содержащий делецию 54 п.н. в области промотора. Отличительной особенностью аллеля *Vrn-A1j* от известных аллелей *VRN-A1*, несущих мутации в области промотора, является мутантный тип экзона 7, а также его возможная ассоциация с 1-2 интактными копиями этого гена.

В образцах *T. dicoccum* идентифицирован новый, предположительно доминантный, аллель *Vrn-A1k*, несущий инсерцию 42 п.н. в области промотора, которая не перекрывается мутациями в известных аллелях *VRN-A1*.

Электрофорез в ПААГ выявил разницу в скорости миграции фрагментов ПЦР участка промотора *VRN-A1*, которые в агарозном геле детектировали рецессивный аллель *vrn-A1*. В результате анализа первичной структуры полиморфных ампликонов идентифицирован ОНП в последовательности А-тракта VRN-бокса гена *VRN-A1* (Рис. 2). Новый аллель был обозначен как *Vrn-A1i* и детектирован в ряде образцов тетраплоидной пшеницы видов *T. turgidum* и *T. durum*.

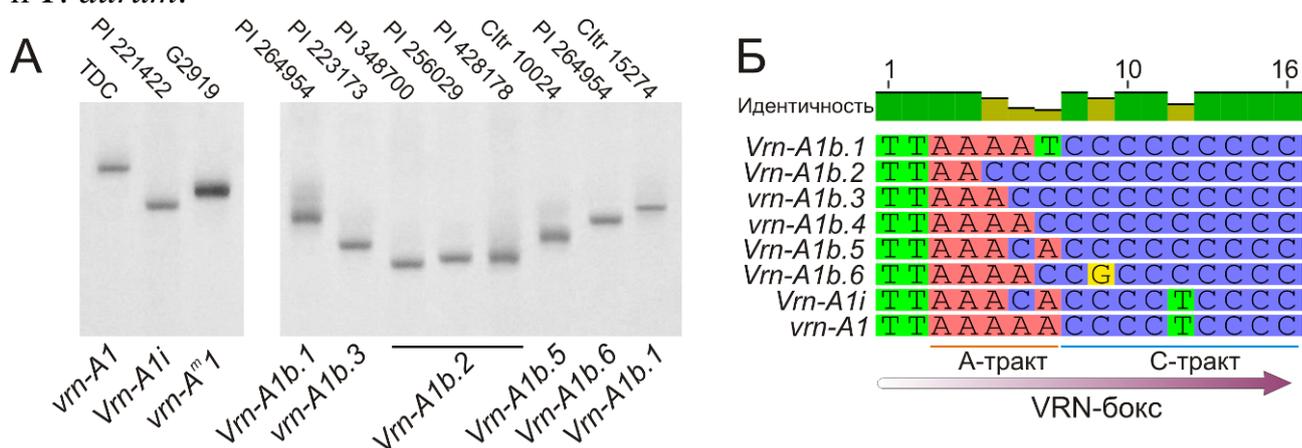


Рисунок 2. Идентификация новых аллельных вариантов гена *VRN-A1*. (А) Дискриминация аллелей *Vrn-A1i* и вариантов *Vrn-A1b* в оптимизированных условиях проведения электрофореза в ПААГ. (Б) Мутации в последовательности VRN-бокса, отличающие аллель *Vrn-A1i* и варианты *Vrn-A1b* от рецессивного аллеля *vrn-A1*.

Аналогичным образом, исследование первичной структуры ампликонов, длина которых близка к ДНК-маркеру, детектирующему аллель *Vrn-A1b*, но

обладающих различной подвижностью в ПААГ, привело к идентификации шести вариантов этого аллеля (Рис. 2). Полиморфизм А-тракта и С-обогащенного сегмента, локализованных в последовательности VRN-бокса, различает альтернативные варианты *Vrn-A1b*.

Аллели *VRN-A1*, несущие мутации в области промотора и аллели, несущие мутации в области интрона-1 распространены неравномерно в различных видах полиплоидной пшеницы. Так, доминантный аллель *Vrn-A1c(Langdon)* (делеция в первом интроне), детектирован только в образцах тетраплоидной пшеницы и преобладал у видов *T. durum* и *T. polonicum*. Аллель *Vrn-A1a* впервые обнаружен в тетраплоидной пшенице (*T. dicoccum*). Суммарно, идентифицированные в настоящем исследовании аллели *VRN-A1* были более широко представлены в полиплоидной пшенице, чем известные аллели *VRN-A1*.

4.2. Анализ регуляторных участков гена *VRN-B1*

В результате анализа области промотора гена *VRN-B1* установлено, что практически все образцы вида *T. carthlicum* содержат инсерцию ретротранспозона (аллель *Vrn-B1(ins)*). В условиях электрофореза в ПААГ, усиливающих аномально медленную миграцию изогнутых молекул ДНК, обнаружена разница в подвижности фрагментов ПЦР, детектирующих интактный промотор *VRN-B1* (Рис. 3).

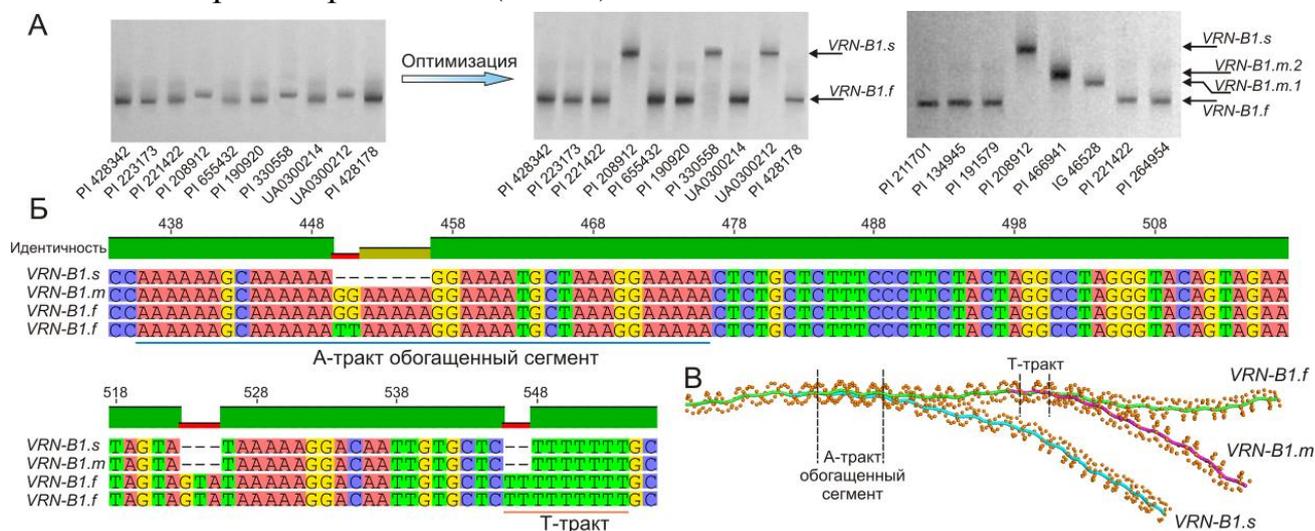


Рисунок 3. Идентификация и анализ мутаций в области промотора *VRN-B1*, различающих три варианта последовательности промотора этого гена. (А) Идентификация вариантов *VRN-B1*. (Б) Полиморфизм последовательности промотора *VRN-B1*. Позиции п.н. обозначены относительно начала ампликона *VRN-B1.f*. (В) Суперпозиция предсказываемых пространственных структур молекул ДНК фрагментов ПЦР, детектирующих альтернативные варианты *VRN-B1*.

Данные варианты последовательности промотора *VRN-B1*, различающиеся наличием 7, 3 и 2 п.н. делеций, были обозначены как *VRN-B1.f*, *VRN-B1.m* и *VRN-B1.s*. Вариант *VRN-B1.f* широко распространен в полиплоидной пшенице, тогда как *VRN-B1.s* идентифицирован преимущественно в образцах, которые согласно паспортным или экспериментальным данным характеризовались яровым типом развития. *VRN-B1.m* детектирован в образцах вида *T. dicoccoides* и образце *T. durum*.

Мультиплекс-ПЦР с комбинацией праймеров Ex1/C/F, Intr1/B/R3 и Intr1/B/R4 была оптимизирована для исследования области интрона-1 гена *VRN-B1*. Доминантные аллели *VRN-B1* с мутантным интроном-1 преобладали в гексаплоидных видах пшеницы. Интересно, что все образцы *T. compactum*, доминантные по *VRN-B1* характеризовались аллелем *Vrn-B1a*, тогда как аналогичные образцы у вида *T. spelta* несли исключительно аллель *Vrn-B1c*. Среди 6 видов тетраплоидной пшеницы только в одном образце *T. durum* идентифицирован аллель *Vrn-B1a*, и в 2 и 5 образцах *T. dicoccum* и *T. dicoccoides*, соответственно, детектирован аллель *Vrn-B1c*.

4.3. Потребность в яровизации и время колошения образцов полиплоидной пшеницы, содержащих новые аллели генов *VRN-A1* и *VRN-B1*

Согласно паспортным и экспериментальным данным все образцы, в которых детектирован аллель *vrn-A1b.3* или *vrn-A1b.4* и не обнаруживающих доминантные аллели других генов *VRN*, характеризуются озимым типом развития. Образцы несущие *Vrn-A1i* выколашивались без яровизации, хотя даты колошения были значительно более поздними, чем у образцов моногенно-доминантных по *VRN-A1* или *VRN-B1*. В связи с этим предполагается пониженная чувствительность к яровизации и факультативный тип развития для образцов несущих *Vrn-A1i*. Выращивание образцов, несущих аллели *Vrn-A1j* и *Vrn-A1k* при отсутствии яровизации и последующий ДНК-маркерный анализ показал ассоциацию этих аллелей с яровым типом развития. Полученные в настоящем исследовании результаты также предполагают наличие ассоциации между аллелем *VRN-B1.s*, снижением чувствительности к яровизации и ранним колошением.

4.4. Полиморфизм *VRN*-бокса ассоциирован с модуляцией потребности в яровизации и времени колошения пшеницы

Установлено, что делеция "Т" выше, также как и делеция 20 п.н. ниже *VRN*-бокса не критичны для индукции транскрипции аллеля *Vrn-A1b* в отсутствие яровизации. Таким образом, предполагается, что именно полиморфизм нуклеотидной последовательности *VRN*-бокса определяет снижение чувствительности к яровизации образцов с доминантными вариантами аллеля

Vrn-A1b. Значимость VRN-бокса в регуляции транскрипции генов *VRN1* подчеркивает тот факт, что мутации в области промотора у большинства известных доминантных аллелей гена *VRN-A1* локализованы именно в последовательности данного участка. В этой связи, интересно, что мутации в новых доминантных аллелях *Vrn-A1j* и *Vrn-A1k* расположены на 50-70 п.н. ниже VRN-бокса. Следовательно, вызванные их наличием изменения в транскрипционной активности, обуславливающие ее индукцию в отсутствие яровизации, вероятно, обусловлены действием альтернативных механизмов регуляции экспрессии генов *VRN1*, которые ассоциированы с другими регуляторными сайтами в промоторе этих генов. Полиморфизм VRN-бокса обусловлен главным образом мутациями в первичной структуре А-тракта и С-богатого сегмента. Результаты настоящего исследования предполагают, что мутации в обоих этих участках влияют на экспрессию генов *VRN1*.

4.5. Полиморфизм гена *VRN-D1*

Комбинация праймеров VRN1DF и VRN1-INT1R была оптимизирована для ПЦР-анализа области промотора гена *VRN-D1*. В ходе исследования пяти видов гексаплоидной пшеницы идентифицированы два гаплотипа *VRN-D1* (Нар-7Т и Нар-8Т), различающиеся протяженностью Т-тракта в позиции -428 п.н.

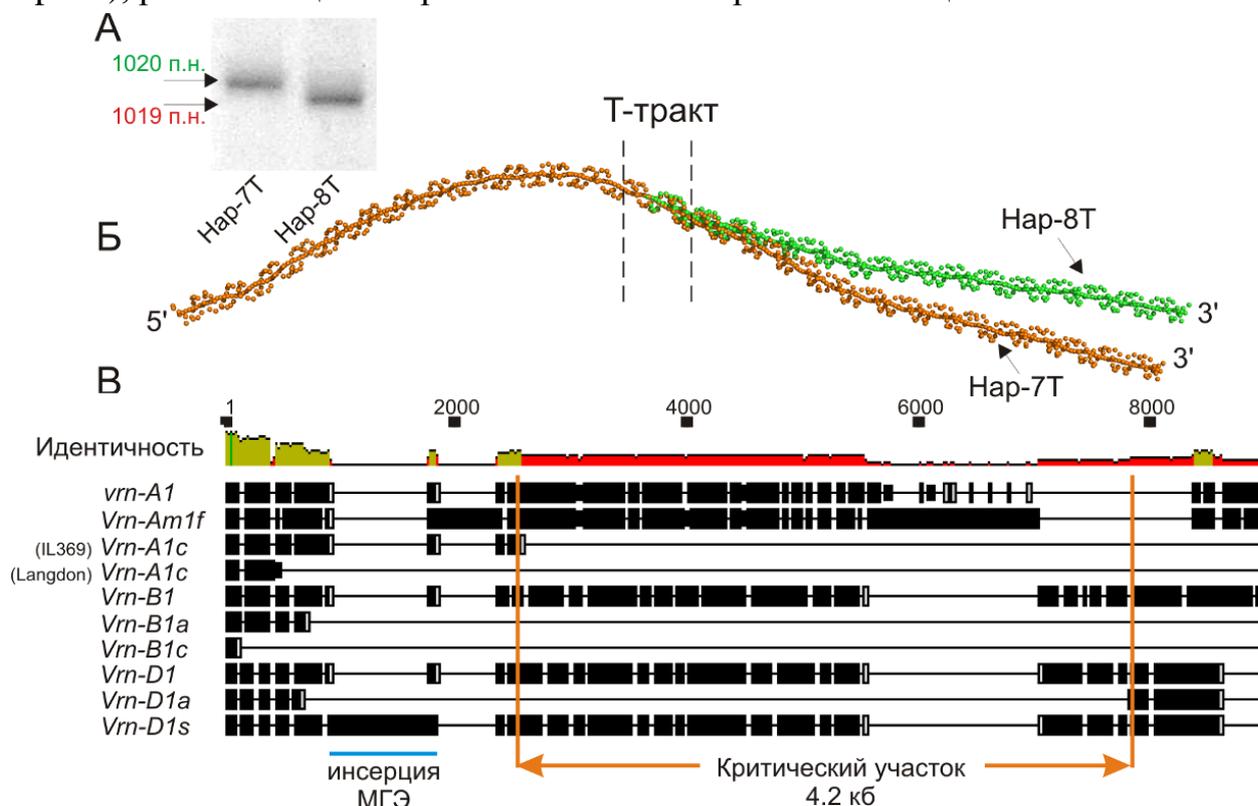


Рисунок 4. Анализ регуляторных областей гена *VRN-D1*. (А) Идентификация гаплотипов Нар-7Т и Нар-8Т. Предсказываемая форма молекул ДНК. (Б) на участке локализации полиморфного Т-тракта в альтернативных гаплотипах *VRN-D1*. (В) Множественное выравнивание последовательностей первого интрона различных

аллелей генов *VRN1*. Указана локализация инсерции транспозона в аллеле *Vrn-D1s* и ранее обозначенные границы критического регуляторного участка.

Данный полиморфизм сопровождается модуляцией кривизны молекулы ДНК, которая может быть детектирована в ходе электрофореза в ПААГ (Рис. 4А, Б). Новый гаплотип Нар-8Т идентифицирован в четырех образцах вида *T. spelta* и образце *T. macha*.

В ходе анализа первого интрона гена *VRN-D1* в образцах *T. spelta* и *T. compactum* идентифицирован новый, предположительно, доминантный аллель *Vrn-D1s*, содержащий инсерцию МГЭ (DTA_Chimera_KF800714) размером 844 п.н. В этой связи, предполагается, что левая граница критического регуляторного участка в первом интроне генов *VRN1* может быть расширена на 300 п.н. в направлении стартового кодона (Рис. 4В).

6. Полиморфизм транскрибируемого участка экзон-3 - экзон-7 гена *VRN-A1*

Для идентификации гаплотипов экзона-4 *VRN-A1*, был разработан кодоминантный маркер, основанный на модуляции кривизны молекул ДНК. Установлено, что практически все доминантные аллели гена *VRN-A1* характеризуются интактным экзоном-4 с гаплотипом Ex4C или Ex4C.f. Гаплотип Ex4T (мутантный тип) идентифицирован исключительно в гексаплоидной пшенице с рецессивным аллелем *vrn-A1*, а также в образцах, несущих аллель *Vrn-A1j*. За исключением одного образца, гаплотип Ex4T детектирован только в комбинации с Ex4C. В этой связи предполагается, что мутантный тип экзона-4 (Ex4T) ассоциирован с наличием не менее двух копий гена *VRN-A1*, с альтернативным гаплотипом данного экзона, на геном. В результате расширения анализируемого участка на 200 п.н. в сторону 3' конца получено расщепление гаплотипа Ex4C на четыре варианта (Ex4C.f, Ex4C.m, Ex4C.s и Ex4C.sph), что обусловлено полиморфизмом А-тракта в интроне-4 (Рис. 5). Идентификация дополнительных гаплотипов *VRN-A1* позволила более точно установить предполагаемый порядок дивергенции генотипов с различным числом копий этого гена в ходе аллополиплоидизации пшеницы, а также установить филогенетические линии для различных комбинаций его гаплотипов.

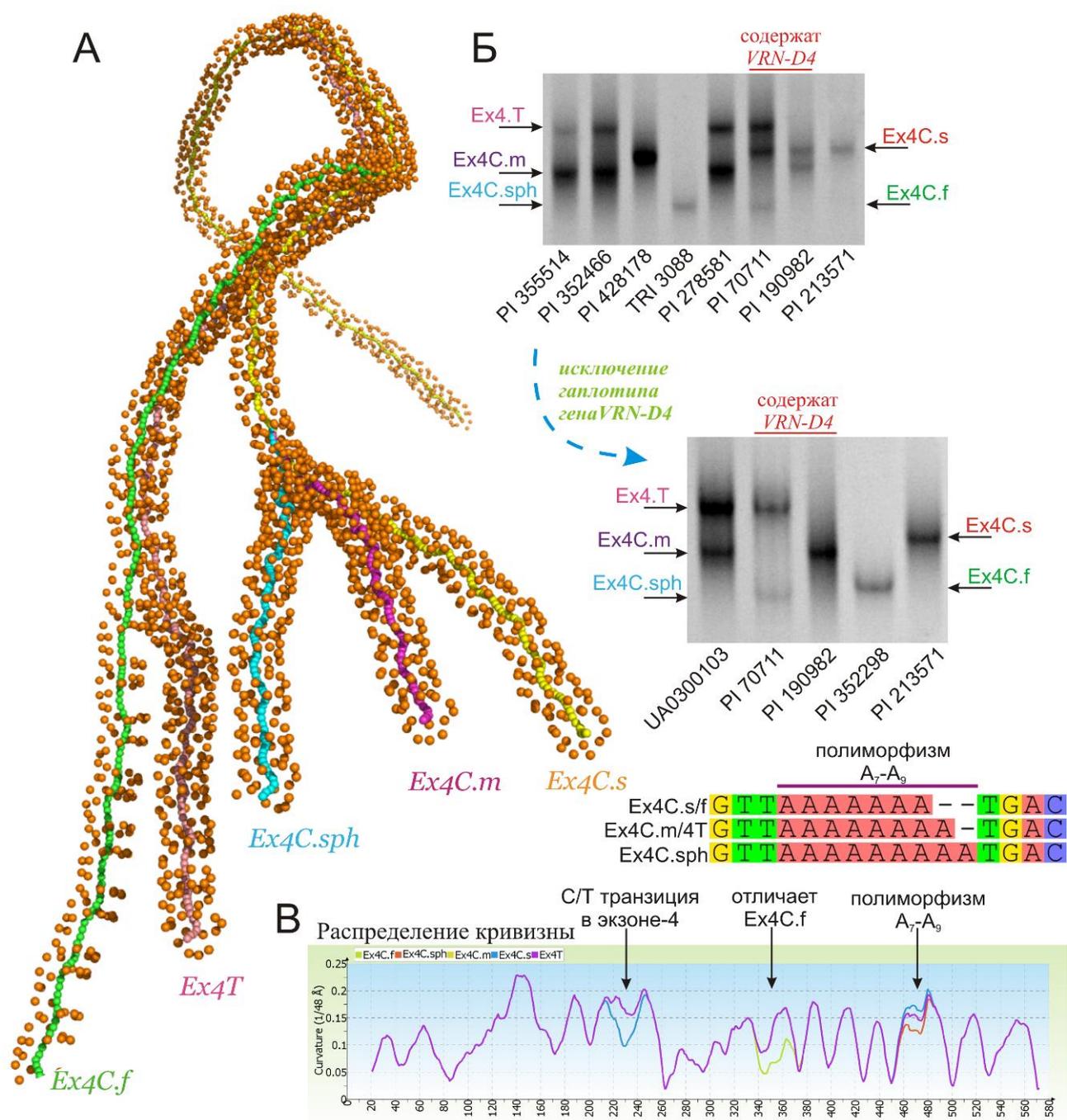


Рисунок 5. Гаплотипы участка экзон-3-5 гена *VRN-A1*. (А) Суперпозиция предсказываемых трехмерных структур молекул ДНК, детектирующих гаплотипы четвертого экзона и интрона гена *VRN-A1*. (Б) Электрофорез в ПААГ фрагментов ПЦР детектирующих гаплотипы *VRN-A1* (В) Распределение кривизны предсказываемых структур ПЦР-фрагментов данных гаплотипов.

Для дискриминации гаплотипов экзона-7 *VRN-A1* оптимизирована мультиплекс АС-ПЦР. Установлено, что все образцы тетраплоидной пшеницы характеризуются гаплотипом дикого типа (Ex7C). Кроме того, практически все доминантные аллели гена *VRN-A1* обладали гаплотипом Ex7C, за исключением аллелей *Vrn-A1c* (*IL369*) и *Vrn-A1j*, идентифицированных исключительно в

гексаплоидной пшенице. Образцы гексаплоидной пшеницы, детектирующие одновременно оба гаплотипа экзона-4 *VRN-A1* (Ex4C, Ex4T), характеризовались мутантным типом экзона-7 (Ex7T) этого гена. Показано, что дикий тип экзона-7 и мутантный тип экзона-4 ассоциированы с аналогичными типами экзонов 4 и 7, соответственно.

5. Исследование аллельного разнообразия генов *VRN1* и *VRN3* в сортах твердой пшеницы *T. durum*

Установлено, что все яровые сорта *T. durum* содержат доминантный аллель гена *VRN-A1*. При этом подавляющее большинство сортов (72%) доминантных по *VRN-A1*, несут делецию 7.2 тыс. п.н. в интроне-1 (аллель *Vrn-A1c* (*Langdon*)). Идентифицировано 5 аллельных вариантов гена *VRN-A1* с мутациями в области промотора: *Vrn-A1a.1*, *Vrn-A1b.1*, *vrn-A1b.3*, *Vrn-A1b.6* и *Vrn-A1i*. Аллель *Vrn-A1a.1* был впервые идентифицирован в многочисленных сортах тетраплоидной пшеницы *T. durum* из России, где он присутствовал почти у половины сортов с мутантным промотором гена *VRN-A1*, но не обнаружен в сортах из других стран. Установлена высокая частота встречаемости доминантного аллеля *Vrn-B1c* в сортах *T. durum* из Украины, России и Казахстана.

Хотя доминантные аллели гена *VRN-B3* встречаются крайне редко и ранее выявлены только в некоторых сортах гексаплоидной пшеницы вида *T. aestivum*, в настоящем исследовании доминантный аллель *Vrn-B3a* идентифицирован в 28 сортах *T. durum*, преимущественно из Украины (79%) и России (18%).

Показано, что отличительными особенностями сортов *T. durum* из Украины, России и Казахстана являются высокая частота аллеля *Vrn-B1c*, а также присутствие дигенно-доминантных (*VRN-A1*, *VRN-B1*) и тригенно-доминантных (*VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN-B3*) генотипов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования молекулярно-генетической детерминации системы генов, вовлеченных в контроль типа развития пшеницы, играют важную роль в решении многих теоретических и прикладных задач генетики и селекции. В представленной работе, гены, определяющие чувствительность пшеницы к яровизации и фотопериоду, проанализированы в генетическом материале представителей шести видов тетраплоидной и шести видов гексаплоидной пшеницы. Решающее значение в анализе полиморфизма первичной структуры, дискриминации гаплотипов, а также идентификации новых аллелей *VRN* и *PPD1* имела модуляция кривизны молекул ДНК. Кроме того, именно изменение кривизны ДНК, обусловленное полиморфизмом адениновых трактов, было взято за основу для разработки особого типа кодоминантных ДНК-маркеров.

Настоящее исследование показывает как использование генофонда различных видов гексаплоидной и тетраплоидной пшеницы открывает широкие возможности для выявления новых аллельных вариантов и гаплотипов *VRN* и *PPD1*, которые могут быть полезны как в области фундаментальных исследований структуры, функции и эволюции этих генов, так и обладают значительным потенциалом для практической селекции, где могут быть использованы для создания высокопродуктивных и высококачественных сортов.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизирован ПЦР-анализ, направленный на исследование полиморфизма регуляторных районов генов *VRN1* и *PPD-B1*, а также транскрибируемого участка экзон-3 – экзон-7 гена *VRN-A1*. Разработаны диагностические ДНК-маркеры, к аллельным вариантам и гаплотипам генов *VRN1*, *VRN-B3*, *VRN-D4*, *PPD-A1* и *PPD-B1*. Показано, что анализ кривизны молекулы ДНК, является эффективным инструментом исследования полиморфизма интересующих участков генома при скрининге больших коллекций генетического материала, а также может быть основой для разработки кодоминантных ДНК-маркеров.
2. Уточнены границы критического регуляторного участка в области промотора генов *PPD1*. Определены основные гаплотипы по участку промотора *PPD-A1* и *PPD-B1*. Идентифицирован новый аллель гена *PPD-A1* (*Ppd-A1a.4*), ассоциированный с изменением чувствительности к фотопериоду.
3. Идентифицированы нуль-аллельные варианты генов *ZCCT1* (*VRN2*) в А, В и D геномах в различных видах полиплоидной пшеницы, в различных комбинациях. Отмечена высокая частота встречаемости доминантного аллеля гена *VRN-B3* в сортах твердой пшеницы из Украины и России.
4. Идентифицировано 13 новых полиморфных вариантов генов *VRN-A1* (*Vrn-A1a.2*, *Vrn-A1b.2-b.6*, *Vrn-A1i*, *Vrn-A1k*, *Vrn-A1j*), *VRN-B1* (*VRN-B1m*, *VRN-B1s*) и *VRN-D1* (*Нар-8Т*, *Vrn-D1s*), ассоциированных с изменением потребности в яровизации и сроков колошения пшеницы. Уточнены границы критических регуляторных участков в области промотора и первого интрона генов *VRN1*. Показано, что однонуклеотидные мутации в последовательности VRN-бокса, в области промотора этих генов, модулируют потребность пшеницы в яровизации и сроки колошения. Отмечены специфические комбинации аллелей генов *VRN1*, отличающие

сорта твердой пшеницы из России, Украины и Казахстана от сортов *T. durum* из других стран.

5. Определены основные гаплотипы транскрибируемой области экзон-3 – экзон-7 гена *VRN-A1*. Установлено, что полиморфизм экзона-4 *VRN-A1* наблюдается исключительно в гексаплоидной пшенице и ассоциирован с мутантным типом экзона-7, а также наличием не менее двух копий этого гена в геноме.
6. Охарактеризованы виды гексаплоидной и тетраплоидной пшеницы как перспективные источники новых аллелей и гаплотипов генов *VRN* и *PPD1*.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Мутерко А.Ф.**, Салина Е.А. Анализ полиморфизма экзона-4 гена *VERNALIZATION-A1* у видов полиплоидной пшеницы. // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2017. - Т. 21. - №3. - С. 323-333.
2. **Muterko A.**, Kalendar R., Salina E. Allelic variation at the *VERNALIZATION-A1*, *VRN-B1*, *VRN-B3*, and *PHOTOPERIOD-A1* genes in cultivars of *Triticum durum* Desf. // *Planta*. - 2016. - V. 244. - № 6. - P. 1253-1263.
3. **Muterko A.**, Kalendar R., Salina E. Novel alleles of the *VERNALIZATION1* genes in wheat are associated with modulation of DNA curvature and flexibility in the promoter region. // *BMC Plant Biology*. - 2016. - V. 16. - Suppl 1:9.
4. **Muterko A.**, Kalendar R., Cockram J., Balashova I. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes and new alleles of *Photoperiod-A1* gene in wheat. // *Plant Molecular Biology*. - 2015. - V. 88. - № 1-2. – P. 149-164.
5. **Muterko A.**, Balashova I., Cockram J., Kalendar R., Sivolap Y. The new wheat vernalization response allele *Vrn-D1s* is caused by DNA transposon insertion in the first intron. // *Plant Mol Biol Rep*. - 2015. - V. 33. - № 2. - P.294-303.
6. **Muterko A.F.**, Balashova I.A., Fayt V.I., Sivolap Yu.M. Molecular genetic mechanisms of regulation of growth habit in wheat. // *Cytology and Genetics*. - 2015. - V. 49. - № 1. - P. 58-71.