

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

На правах рукописи

Мутерко Александр Феликсович

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

03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Салина Елена Артемовна

Новосибирск – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ	9
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	20
1.1. Генетический контроль чувствительности пшеницы к фотопериоду	20
1.1.1. Аллельные варианты гена <i>PPD-A1</i>	24
1.1.2. Аллели гена <i>PPD-B1</i>	24
1.1.3. Аллели и гаплотипы гена <i>PPD-D1</i>	27
1.2. Генетическая детерминация потребности пшеницы в яровизации	30
1.2.1. Гены <i>VRN1</i>	31
1.2.1.1. Гены <i>VRN1</i> и продукты их экспрессии	31
1.2.1.2. Регуляция экспрессии генов <i>VRN1</i>	33
1.2.1.3. Регуляторные сайты в области промотора генов <i>VRN1</i>	35
1.2.1.4. Эпигенетическая регуляция <i>VRN1</i>	38
1.2.1.5. Полиморфизм в кодирующей области гена <i>VRN-A1</i>	40
1.2.2. Гены <i>VRN2</i>	42
1.2.2.1 Структура генов <i>ZCCT</i> и продуктов их экспрессии	44
1.2.3. Аллельные варианты гена <i>VRN3</i>	46
1.2.4. Ген <i>VRN4</i>	48
1.2.5. Эпистатическое взаимодействие между генами <i>VRN</i>	49
1.2.6. Регуляция процесса яровизации пшеницы	54
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	58
2.1. Генетический материал	58
2.2. Вегетация	58
2.3. Экстракция ДНК и амплификация	59
2.4. Электрофорез в полиакриламидных и агарозных гелях	59
2.5. Гетеродуплексный анализ	61
2.6. Клонирование и секвенирование фрагментов ПЦР	61
2.7. Анализ данных	63
2.7.1. Построение, анализ кривизны и гибкости трехмерной модели спирали ДНК молекулы	63
2.7.2. Анализ нуклеотидных последовательностей из баз данных	64

2.7.3. Кластерный анализ.....	64
2.7.4. Филогенетический анализ	65
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	66
3.1. Исследование полиморфизма области промотора гена <i>PPD-A1</i>	66
3.1.1. Идентификация гаплотипов гена <i>PPD-A1</i>	66
3.1.2. Филогения гаплотипов <i>Ppd-A1b</i>	69
3.1.3. Видовое и географическое распространение гаплотипов <i>Ppd-A1b</i>	70
3.1.4. Новые данные уточняют и корректируют существующие представления о структуре и эволюции гаплотипов гена <i>PPD-A1</i>	75
3.1.5. Идентификация нового аллеля <i>Ppd-A1a.4</i>	78
3.2. Анализ полиморфизма гена <i>PPD-B1</i> в полиплоидной пшенице	83
3.2.1. Оптимизация ПЦР-анализа для исследования области промотора гена <i>PPD-B1</i>	83
3.2.2. Разработка ДНК-маркеров для идентификации гаплотипов и гаплогруппы гена <i>PPD-B1</i>	86
3.2.3. Гаплотипы гена <i>PPD-B1</i>	87
3.2.4. Филогенетический анализ гаплотипов <i>PPD-B1</i>	89
3.2.5. Распространение гаплотипов <i>PPD-B1</i> в различных видах гексаплоидной и тетраплоидной пшеницы	91
3.3. Анализ генов <i>VRN</i> характеризующихся низким аллельным разнообразием..	95
3.3.1. Оценка распространенности нуль-аллелей генов <i>ZCCT1</i>	95
3.3.2. Анализ участка промотора гена <i>VRN-B3</i>	98
3.3.3. Идентификация гена <i>VRN-D4</i>	99
3.4. Исследование регуляторных участков генов <i>VRN1</i> в различных видах гексаплоидной и тетраплоидной пшеницы	101
3.4.1. Анализ регуляторных областей гена <i>VRN-A1</i>	102
3.4.1.1. Идентификация нового варианта аллеля <i>Vrn-A1a</i>	102
3.4.1.2. Идентификация нового аллеля <i>Vrn-A1i</i>	104
3.4.1.3. Идентификация новых вариантов аллеля <i>Vrn-A1b</i>	105
3.4.1.4. Новый аллель <i>Vrn-A1j</i>	107
3.4.1.5. Новый аллель <i>Vrn-A1k</i>	108

3.4.1.6. Анализ распространения аллелей <i>VRN-A1</i> в полиплоидной пшенице	110
3.4.2. Анализ регуляторных участков гена <i>VRN-B1</i>	111
3.4.2.1. Идентификация новых полиморфных вариантов гена <i>VRN-B1</i>	111
3.4.2.2. Полиморфизм на участке промотора гена <i>VRN-B1</i> приводит к изменению локальной кривизны ДНК молекулы	112
3.4.2.3. Распространение аллелей <i>VRN-B1</i> в полиплоидной пшенице	115
3.4.3. Особенности детекции новых аллелей генов <i>VRN-A1</i> и <i>VRN-B1</i>	117
3.4.4. Потребность в яровизации и время колошения образцов полиплоидной пшеницы, содержащих новые аллели генов <i>VRN-A1</i> и <i>VRN-B1</i>	118
3.4.5. Полиморфизм VRN-бокса ассоциирован с модуляцией потребности в яровизации и времени колошения пшеницы	122
3.4.6. Полиморфизм гена <i>VRN-D1</i>	128
3.4.6.1. Анализ полиморфизм области промотора гена <i>VRN-D1</i>	129
3.4.6.2. Идентификация нового аллеля <i>Vrn-D1s</i>	131
3.5. Полиморфизм транскрибируемого участка гена <i>VRN-A1</i> в границах экзон-3 - экзон-7	135
3.5.1. ДНК-маркеры для идентификации типа экзона-4 гена <i>VRN-A1</i>	136
3.5.2. Идентификация типа экзона-4 гена <i>VRN-A1</i> в различных видах пшеницы	136
3.5.3. Полиморфизм интрона-4 гена <i>VRN-A1</i>	139
3.5.4. Полиморфизм экзона-7	140
3.5.5. Комбинации гаплотипов экзона 4 и 7 гена <i>VRN-A1</i>	145
3.5.6. Оптимизированные ДНК-маркеры в дискриминации гаплотипов экзонов 4 и 7 генов <i>VRN-A1</i> и <i>VRN-D4</i>	147
3.5.7. Обсуждение результатов исследования гаплотипов экзона 4 и 7 гена <i>VRN-A1</i>	150
3.6. Исследование аллельного разнообразия генов <i>VRN1</i> и <i>VRN3</i> в сортах твердой пшеницы <i>T. durum</i>	156
3.6.1. Оценка аллельного разнообразия генов <i>VRN1</i> в <i>T. durum</i>	157
3.6.2. Исследование гена <i>VRN-B3</i> в сортах твердой пшеницы	160

3.6.3. Анализ комбинации аллелей <i>VRN</i> в сортах <i>T. durum</i> из разных центров культивирования	161
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	166
ВЫВОДЫ	170
ЛИТЕРАТУРА	172
Приложение 1. Параметры праймеров используемых для проведения ПЦР-анализа генов <i>VRN</i> и <i>PPD1</i> пшеницы	193
Приложение 2. Влияние условий проведения электрофореза в полиакриламидных гелях, на эффективность дискриминации идентифицированных в настоящем исследовании аллелей генов <i>VRN-A1</i> и <i>VRN-B1</i>	196
Приложение 3. Кватернионная модель спирали ДНК.....	201
Приложение 4. Управляемая иерархическая кластеризация как способ повышения репрезентативности кластерного анализа.....	205
Приложение 5. Метод выведения филогении гаплотипов и определения гаплогрупп	207
Приложение 6. Гаплотип и гаплогруппа <i>Ppd-A1b</i> в образцах 12 видов полиплодной пшеницы	218
Приложение 7. Результаты ПЦР <i>in silico</i> с парой праймеров <i>durum_Ag5del_F2 / durum_Ag5del_R2</i>	224
Приложение 8. Распространение гаплогрупп <i>Ppd-A1b</i>	228
Приложение 9. Частоты ампликонов участка промотора и экзона-1 гена <i>PPD-B1</i> в различных видах полиплоидной пшеницы, по результатам <i>in silico</i> ПЦР с парой праймеров <i>TaPpd-B1proF1–TaPpd-B1int1R1</i>	232
Приложение 10. Идентификация гаплотипов и гаплогруппы гена <i>PPD-B1</i> в тетраплоидной пшенице	233
Приложение 11. Аллельные варианты генов <i>VRN-A1</i> и <i>VRN-B1</i> идентифицированные в различных видах полиплоидной пшеницы	235
Приложение 12. ДНК-маркерный анализ аллельного состояния гена <i>VRN-D1</i> в пяти видах гексаплоидной пшеницы.....	242
Приложение 13. Распределение кривизны и локальных углов изгиба в молекулах ДНК фрагментов ПЦР с парой праймеров <i>VRN1AF/VRN1-INT1R</i> аллелей <i>vrn-A1</i> и <i>Vrn-A1i</i>	244

Приложение 14. Распространение гаплотипов экзона-4 и экзона-7 гена <i>VRN-A1</i> в образцах полиплоидной пшеницы, несущих различные аллели этого гена	245
Приложение 15. Аллельные варианты генов <i>VRN-A1</i> , <i>VRN-B1</i> и <i>VRN-B3</i> в сортах твердой пшеницы <i>Triticum durum</i>	247

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- AGL – agamous-like MADS-box protein
- AP – apetala
- BLAST – basic local alignment search tool
- CCA – circadian clock associated
- CCT – constans, constans-like, timing of cab expression 1
- CDF – cycling DOF factor
- CNV – copy number variation
- CO – constans
- FD – flowering locus D
- FDL – flowering locus D-Like
- FLC – flowering locus C
- FLM – flowering locus M
- FT – flowering locus T
- FUL – fruitfull
- GI – gigantea
- GRP – glycine-rich RNA-binding protein
- HAP – heme activator protein
- HD-Zip – homeodomain-leucine zipper
- Hv – *Hordeum vulgare*
- MADS – MCM1, agamous, deficiens, SRF
- MITE – miniature inverted-repeat transposable element
- MJ – median-joining
- MP – maximum parsimony
- MULE – mutator-like
- NF – nuclear factor
- PCG – polycomb group
- PPD – photoperiod
- PRR – pseudo-response regulator
- REC – receiver domain
- SOC – suppressor of constans overexpression

SRF – serum response factor
SVP – short vegetative phase
HOX – homeobox protein
Ta – *Triticum aestivum*
TBP – TATA-binding protein
TOC – timing of cab expression
TRXG – trithorax group
TF – transcription factor
VIL – vernalization insensitive 3 -like
VRN – vernalization
VRT – vegetative to reproductive transition
ZCCT – zinc finger CCT
АС-ПЦР – аллель-специфическая ПЦР
ДМСО – диметилсульфоксид
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
кБ – килобаз
МА – межаллельные ассоциации
МГЭ – мобильный генетический элемент
мРНК – матричная РНК
ОНП – однонуклеотидный полиморфизм
ПААГ – полиакриламидный гель
ПАГЭ – полиакриламидный гель-электрофорез
ПЦР – полимеразная цепная реакция
п.н. – пары нуклеотидов
РНК – рибонуклеиновая кислота
сМ – сантиморган
ЦТАБ – цетилтриметиламмония бромид
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Из всех злаков, пшеница является самой распространенной культурой в мире (FAO 2014) и одним из ключевых источников сырья для пищевой и перерабатывающей промышленности (Bushuk 1998). Широкая адаптивная способность к произрастанию в различных климатических условиях, жизненный цикл, тип развития и продолжительность вегетационного периода пшеницы определяются, главным образом, аллельным составом генов, регулирующих потребность в яровизации (гены *VRN*) и чувствительность к фотопериоду (гены *PPD*) (Worland 1996; Snape et al. 2001; Distelfeld et al. 2009; Kamran et al. 2014; Bentley et al. 2013). Результатом данной адаптации является прохождение определенных этапов индивидуального развития при наиболее благоприятных условиях окружающей среды (Cockram et al. 2007c). Кроме того, плеiotропный эффект генов *VRN* распространяется на ряд агрономически ценных признаков пшеницы, таких как зимостойкость, морозостойкость, начало и продолжительность выхода в трубку, сроки колошения, физиологическую зрелость, урожайность, а также адаптивность к действию стрессовых факторов, среди которых засуха, соли, тепловой шок, ранения, действие абсцизовой кислоты (Chen et al. 2009; Diaz et al. 2012; Dhillon et al. 2010; Eagles et al. 2011; Li et al. 2013; Yan et al. 2015; Chen et al. 2010; Wang et al. 2009; Bonnin et al. 2008; Diallo et al. 2010).

Чувствительность пшеницы к продолжительности светового периода суток (фотопериод) обусловлена преимущественно аллельным составом гомеологической серии генов *PHOTOPERIOD-1 (PPD1)* (Snape et al. 2001). Мутации, идентифицированные в доминантных аллелях *PPD1* (не чувствительны к продолжительности фотопериода), обусловлены делециями или инсерциями в области промотора (Beales et al. 2007; Wilhelm et al. 2009; Nishida et al. 2013), а также увеличением числа копий этого гена (CNV мутанты) (Diaz et al. 2012). При этом показано, что мутации в области промотора генов *PPD1* оказывают более сильное влияние на снижение чувствительности к фотопериоду, чем CNV (Shaw et al. 2012). Кроме того, вариабельность числа копий не характерна для генов *PPD-A1*

и *PPD-D1* (Diaz et al. 2012), а механизм снижения чувствительности к фотопериоду у CNV-мутантов по *PPD-B1* считается установленным (Diaz et al. 2012; Shaw et al. 2012), тогда как идентичность, локализация и функция регуляторных участков в области промотора генов *PPD1* окончательно не выяснены.

Ранее, первичная структура генов *PPD-A1* и *PPD-B1* была исследована в диплоидной и некоторых видах тетраплоидной пшеницы (Takenaka et al. 2012; Takenaka et al. 2013). Однако анализ литературных источников не выявил информацию об аналогичных исследованиях генов *PPD1* в видах гексаплоидной пшеницы, отличных от *Triticum aestivum*, а также в большинстве видов тетраплоидной пшеницы. Ген *PPD-D1* достаточно хорошо изучен (Beales et al. 2007; Guo et al. 2010; Chen et al. 2013). В этой связи актуальным является исследование области промотора генов *PPD1* из А и В геномов у ранее не изученных видов тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы.

Необходимость низкотемпературной обработки растений для инициации репродуктивной стадии развития, определяется их потребностью в яровизации. Чувствительность пшеницы к яровизации детерминирована, главным образом, аллельным составом четырех мажорных генов: *VRN1* (транскрипционный фактор семейства MADS-box), *VRN2* (zinc-finger CCT-домен содержащий ген - *ZCCT*), *VRN3* (гомолог гена *FLOWERING LOCUS T*) и *VRN4* (дупликация гена *VRN-A1* в коротком плече хромосомы 5D) (Yan et al. 2003; Yan et al. 2004b; Yan et al. 2006; Kirpes et al. 2015). Система этих генов формирует единый регуляторный механизм, в котором изменение активности транскрипции любого из этих генов влияет на активность экспрессии остальных генов системы, контролирующей процесс яровизации и определяющей сроки колошения пшеницы (Muterko et al. 2015a).

Гены *VRN1* характеризуются наличием, по крайней мере, двух регуляторных участков, локализованных в области промотора и первого интрона, соответственно (Yan et al. 2004a; Fu et al. 2005). Следовательно, актуальным является анализ полиморфизма именно данных областей генов *VRN1* в ходе скрининга ранее не исследованных образцов полиплоидной пшеницы с целью идентификации новых аллельных вариантов этих генов, оказывающих влияние на отзывчивость пшеницы к яровизации.

Среди гомеологичных генов серии *VRN1*, полиморфизм в кодирующей области, ассоциированный с изменением количественных показателей ряда признаков, представляющих значительный интерес в селекции пшеницы, идентифицирован только для гена *VRN-A1* (Chen et al. 2009; Dhillon et al. 2010; Eagles et al. 2011; Diaz et al. 2012; Li et al. 2013; Yan et al. 2015). В частности, полиморфизм в четвертом экзоне, кодирующем участок К-домена, ассоциирован с различием в морозостойкости, продолжительности яровизации и временем колошения (Chen et al. 2009; Eagles et al. 2011). В связи с наличием взаимодействия К-домена с другими MADS-бокс-содержащими белками, предполагается, что полиморфизм в экзоне-4 *VRN-A1* может оказывать влияние на признаки, проявление которых связано с экспрессией этого гена (Eagles et al. 2011). Другим важным однонуклеотидным полиморфизмом (ОНП) идентифицированным в кодирующей части гена *VRN-A1* является транзигция в седьмом экзоне. Хотя мутация локализована на участке, кодирующем С-терминальную область аминокислотной последовательности белка *VRN-A1*, в которой не идентифицировано каких-либо функциональных доменов, полиморфизм в данном сайте ассоциирован с различием в продолжительности яровизации и времени колошения пшеницы (Li et al. 2013). Кроме того, было достоверно установлено, что данная мисенс-мутация в белке *VRN-A1* влияет на его взаимодействие с продуктами экспрессии гена *TaHOX1*, что также сказывается на сроках колошения (Li et al. 2013). Однако, несмотря на то, что с момента выявления данных полиморфизмов в кодирующей области *VRN-A1* прошло почти 10 лет, в настоящее время отсутствуют данные об исследовании экзона-4 и экзона-7 этого гена в видах полиплоидной пшеницы отличных от *T. aestivum*.

Рецессивные аллели *vrn2*, ассоциированные со снижением чувствительности к яровизации, обусловлены мутациями в последовательности *ZCCT* генов, кодирующей ССТ-домен или наличием нуль-аллелей по этим генам (Yan et al. 2004b; Distelfeld et al. 2009; Zhu et al. 2011). Однако до сих пор не обнаружено представителей полиплоидной пшеницы, которые бы содержали нуль-аллели или не функциональные варианты одновременно всех генов *ZCCT* (Distelfeld et al. 2009; Zhu et al. 2011; Ma et al. 2012). Известно, что мутации в консервативных сайтах ССТ-домена белков *ZCCT* хотя и устраняют влияние последних на подавление

экспрессии локуса *VRN3*, тем не менее, даже такие мутантные белки *VRN2* способны вступать в конкурентное взаимодействие с другими ССТ-домен-содержащими белками (Li et al. 2011). Однако последнее полностью устраняется при наличии нуль-аллелей генов *ZCCT*, что может отразиться на показателях признаков, регуляция которых осуществляется при участии ССТ-домен-содержащих белков. Ранее нуль-аллельные варианты были показаны только для генов *ZCCT1*, при этом их исследование проводилось исключительно в сортах *T. aestivum* (Zhu et al. 2011), и в настоящее время отсутствует информация относительно их идентификации у представителей других видов полиплоидной пшеницы. В этой связи актуальным является идентификация и оценка распространенности нуль-аллельных мутантов по генам *ZCCT1* среди представителей различных видов гексаплоидной и тетраплоидной пшеницы.

Аллельное разнообразие гена *VRN3* выявлено только в В геноме (Yan et al. 2006; Chen et al. 2013). Доминантные аллели гена *VRN-B3* встречаются крайне редко, и выявлены в немногочисленных сортах мягкой пшеницы (Yan et al. 2006; Zhang et al. 2008; Iqbal et al. 2011; Chen et al. 2013; Derakhshan et al. 2013). Однако анализ этого гена до настоящего времени не проводился в тетраплоидной пшенице, а также у представителей других видов гексаплоидной пшеницы отличных от *T. aestivum*.

Использование молекулярных маркеров значительно повышает эффективность идентификации большого количества генетического материала, предоставляя исходную информацию для понимания адаптивной ценности отдельных аллелей или их комбинаций в конкретных условиях культивирования пшеницы (Mohan et al. 1997; Gupta et al. 1999; Koebner et al. 2002; Rana et al. 2009; Mammadov et al. 2012; Randhawa et al. 2013). Однако большинство маркеров к генам *VRN* и *PPD1* разрабатывались, основываясь на данных их первичной структуры полученных для какого-либо одного вида пшеницы, при этом возможность и эффективность их использования в анализе других видов пшеницы не исследовалась. Кроме того, многие маркеры разрабатывались как доминантные или же для специфической детекции только одного аллеля относительно интактной, референсной последовательности, исключая возможность их применения для идентификации нескольких аллельных вариантов,

характеризующихся полиморфизмом одного и того же или близко расположенных участков генома одновременно. В этой связи актуальным является создание и оптимизация эффективных ДНК-маркеров, которые можно использовать как для идентификации аллелей генов *VRN* и *PPD1*, так и для исследования полиморфизма регуляторных областей этих генов.

Генофонд дикорастущих и видов тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы, имеющих ограниченный ареал возделывания, широко используется селекционными центрами различных стран в качестве природного источника аллельного разнообразия генов многих агрономически ценных признаков (Cavanagh et al. 2013; Zamir 2001; Arzani et al. 2017). Оценка аллельного разнообразия в различных видах пшеницы позволяет дать им характеристику наиболее перспективных источников полиморфизма соответствующих генных локусов, а также определить наиболее вероятных доноров новых аллелей, гаплотипов и мутантных вариантов нуклеотидных последовательностей интересующих генов. 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. Так, к примеру, несмотря на то, что такие виды полиплоидной пшеницы как *T. durum* и *T. spelta* по посевным площадям занимают, соответственно, второе и третье место в мире после мягкой пшеницы *T. aestivum* (Bushuk 1998; Cooper 2015; Konvalina et al. 2012; Arzani et al. 2017), они остаются плохо изученными по аллельному составу генов *VRN* и *PPD*.

Кроме того, слабо окультуренные виды пшеницы часто привлекают внимание исследователей в качестве исходного материала для поиска новых мутантных вариантов и аллелей генов агрономически ценных признаков. К примеру, в таких видах тетраплоидной пшеницы как *T. dicoccoides*, *T. dicoccum* и *T. carthlicum* были впервые идентифицированы аллели *Vrn-Ald*, *Vrn-Ale* и *Vrn-B1(ins)*, соответственно (Yan et al. 2004a; Seki et al. 2011). И хотя внедрение этих аллелей в селекцию пшеницы является трудно достижимым, за короткое время, тем не менее, новые данные имеют большое значение в области фундаментальных исследований. Такие исследования расширяют и корректируют наши представления о структуре и функции анализируемых генов, способствуют идентификации и более точной

локализации регуляторных областей, а также улучшают наше понимание путей и механизмов, детерминирующих развитие пшеницы, ее потребность в яровизации, чувствительность к фотопериоду и время колошения. Именно с использованием диплоидных видов пшеницы (главным образом *T. monosocum*) было проведено позиционное клонирование и анализ первичной структуры генов *VRN1* (Yan et al. 2003) и *VRN2* (Yan et al. 2004b), локализованы регуляторные участки в области промотора и первого интрона генов *VRN1* (Yan et al. 2003; Dubcovsky et al. 2006; Pidal et al. 2009), исследовано эпистатическое взаимодействие между генами *VRN* и сформулированы канонические модели молекулярно-генетических механизмов, регулирующих отзывчивость к яровизации, тип и темп развития пшеницы (Tranquilli et al. 2000; Yan et al. 2003; Yan et al. 2004b; Dubcovsky et al. 2006). Наконец, современные достижения в области молекулярной генетики и биотехнологии позволяют осуществить внедрение требуемых аллелей путем целевого внесения изменений в первичную структуру генома (Shan et al. 2014; Khatodia et al. 2016; Zhang et al. 2016; Liang et al. 2017), избегая тем самым продолжительный, и не всегда возможный или целесообразный (желательный по отношению к другим генным локусам) процесс переноса генов путем скрещивания.

В связи с вышесказанным, актуальным является анализ полиморфизма генов *VRN* и *PPD1* в дикорастущих и видах тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы, имеющих ограниченный ареал возделывания, с целью оценки распространенности известных и поиска новых аллельных вариантов, которые могут быть полезны при создании высокопродуктивных и высококачественных сортов, как путем непосредственного их вовлечения в селекционный процесс, так и через область фундаментальных исследований структуры, функции и эволюции данных генов, углубляющих наши знания о ключевых биологических процессах, регулирующих развитие пшеницы в условиях ее взаимодействия с биотическими и абиотическими факторами в процессе адаптации к окружающей среде.

Цели и задачи исследования

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 дикорастущих и видов тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы, имеющих ограниченный ареал возделывания по генам *VRN1*, *ZCCT1* (*VRN2*), *VRN-B3*, *VRN-D4* и *PPD1*. Проанализированы регуляторные участки этих генов и проведена оценка их аллельного разнообразия в полиплоидной пшенице из различных эколого-географических регионов. Для большинства видов данное исследование было проведено впервые.

Идентифицировано 14 новых полиморфных вариантов генов *VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN-D1* и *PPD-A1* ассоциированных с модуляцией чувствительности пшеницы к яровизации, фотопериоду и времени колошения. Аннотированные первичные структуры новых аллелей депонированы в публичную базу данных GenBank для открытого доступа широкого круга исследователей.

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 в ходе быстрого скрининга крупных выборок генетического материала, а также для разработки особого типа кодоминантных ДНК-маркеров, повышающих информативность и эффективность маркерного анализа генов *VRN* и *PPD* пшеницы.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования

Результаты настоящего исследования вносят существенный вклад в понимание структуры, функции и механизмов регуляции генов, контролирующих тип развития и время колошения пшеницы, а также во многом определяющих ее адаптивную способность в изменяющихся условиях окружающей среды. Переопределение и уточнение границ критических в регуляции транскрипции участков в области промотора и первого интрона генов *VRN1* и *PPD1* способствует более точной идентификации и локализации регуляторных сайтов в этих генах, а также открывают широкие возможности в манипуляции с их первичной структурой для достижения требуемых характеристик их экспрессии. Полученные в результате анализа регуляторных областей промотора генов *VRN1* данные предполагают новое видение роли VRN-бокса в контроле транскрипционной активности этих генов в качестве гибкого инструмента для регуляции их экспрессии.

В результате анализа полиморфизма и оценки аллельного разнообразия генов *VRN* и *PPD1* идентифицированы наиболее перспективные образцы пшеницы, природные мутанты, носители уникальных аллелей и гаплотипов этих генов, их

специфических комбинаций, которые могут быть использованы в практической селекции пшеницы.

Обнаруженные в результате исследования сортов *T. durum* специфические для определенных центров культивирования аллельные комбинации генов *VRN*, позволяют судить о преимуществе внедрения тех или иных аллелей *VRN* в селекцию твердой пшеницы в конкретных эколого-географических регионах.

Применение предложенных в настоящем исследовании молекулярных маркеров, в том числе основанных на модуляции кривизны молекул ДНК, для идентификации аллелей и гаплотипов генов *VRN1* и *PPD1* обеспечивает получение надежных и высоко воспроизводимых результатов, а также является наиболее целесообразным, экономически выгодным и 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" (BGRS\SB-2016) (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 10 статей, из которых 6 представлены в журналах, рекомендованных ВАК РФ для защиты кандидатских диссертаций:

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.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.
6. 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.

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.

Благодарности

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики растений ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН, а также в отделе общей и молекулярной генетики Селекционно-генетического института - Национального центра семеноведения и сортоизучения НААН Украины. Автор выражает искреннюю признательность и благодарность научному руководителю Салиной Е.А. за руководство, поддержку и всестороннюю помощь в выполнении настоящего исследования.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Генетический контроль чувствительности пшеницы к фотопериоду

В пшенице, чувствительность к продолжительности светового периода суток (фотопериод) обусловлена преимущественно аллельным составом гомеологической серии генов *PHOTOPERIOD-1* (*PPD1*) (Snape et al. 2001). Гомозиготы по рецессивным аллелям *ppd1* (дикий тип) характеризуются задержкой времени колошения на коротком дне (<10 ч) и обладают высокой чувствительностью к удлинённому фотопериоду (~16 ч). Носители доминантных аллелей *PPD1* (мутантный тип) не чувствительны к продолжительности фотопериода и показывают одинаковые сроки колошения, как на длинном, так и на коротком дне. Гены *PPD1* являются важным регулятором цветения в злаках. Так, раннее цветение сортов пшеницы, несущих доминантные аллели *PPD1* является важной региональной адаптацией, позволяющей избежать неблагоприятных климатических условий, в частности высоких температур летнего периода (Kato et al. 1992; Law et al. 1997; Worland et al. 1998). В связи с этим, не чувствительные к фотопериоду аллели получили широкое распространение в сортах мягкой и твердой пшеницы после "зеленой революции".

В пшенице, гены *PPD1* локализованы в коротком плече хромосом второй гомеологической группы и принадлежат к семейству псевдо-ответных регуляторов (*PRR*) (Scarth et al. 1984; Turner et al. 2005; Beales et al. 2007; Cockram et al. 2012). В аминокислотной последовательности белков семейства *PRR* идентифицировано 2 функциональных домена (Mizuno et al. 2005). Рецепторный домен REC (pseudo-receiver) расположен в N-терминальном участке и выполняет функцию восприятия сигналов от паттернов сенсоров, переданных через двухкомпонентную систему при действии на нее факторов окружающей среды. В C-терминальной области локализован эффекторный ССТ-домен (*CONSTANS* (*CO*), *CO-like*, *TIMING OF CAB EXPRESSION 1* (*TOC1*)). Наличие ССТ-домена определяет способность белков *PPD1* конкурентно взаимодействовать с другими ССТ-домен-содержащими белками (такими как *PRR*, *ZCCT* и *CO*) за связывание с НАР-комплексом (НАР2-

НАР3-НАР5), замещая в нем субъединицу НАР2 (Li et al. 2011). Образованный белковый комплекс PPD1-НАР непосредственно связывается с ССААТ-боксом аффлекторных генов и принимает участие в регуляции активности их экспрессии, в частности активности локуса *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) (Wenkel et al. 2006), продукты экспрессии которого вовлечены в индукцию цветения (Turck et al. 2008). Существует прямая зависимость между экспрессией доминантных аллелей *Ppd1*, транскрипционной активностью локуса *FT1* и временем колошения (Beales et al. 2007; Wilhelm et al. 2009; Shaw et al. 2012; Nishida et al. 2013), при этом сильная позитивная корреляция наблюдается между количеством доминантных аллелей, представленных в гомеологичных геномах и экспрессией *FT1* (Shaw et al. 2012).

Пшеничные гены *PPD1* гомологичны семейству генов циркадианных часов арабидопсиса (*PRR1*, *PRR3*, *PRR5*, *PRR7*, *PRR9*) (Turner et al. 2005; Beales et al. 2007), при этом высокая степень гомологии выявлена между пшеничными генами *PPD1* и геном *PRR7* арабидопсиса (Turner et al. 2005). У арабидопсиса, гены *PRR7* являются частью циркадианных часов и играют важную роль в регуляции цветения на длинном дне. Продукты экспрессии *PRR7* подавляют активность транскрипции *CDF1*, репрессора *CO* (Imaizumi et al. 2005; Nakamichi et al. 2007). Однако в пшенице, сверхэкспрессия *PPD1* не влияет на транскрипционную активность генов циркадианных часов, таких как *CCA1*, *TOC1*, *GI*, *PRR73* или же гена *CDF1*, действующего ниже циркадианных часов (Shaw et al. 2012). В связи с этим предполагается, что гены *PPD1* не являются важными в функционировании циркадианных часов пшеницы. Влияние *PPD1* на регуляцию цветения злаков, вероятно, осуществляется альтернативным от *PRR7* образом, посредством активации *FT1* с обратной связью, подавляющей экспрессию *CO* (Campoli et al. 2012; Shaw et al. 2012). Белки *CO* стабилизируются светом, поэтому активация аффлекторных генов (в частности *FT1*) происходит на длинном дне (Suárez-López et al. 2001; Valverde et al. 2004). Однако в пшенице, *FT* может регулироваться продуктами экспрессии *PPD1* не зависимо от активности гена *CO*. В этом альтернативном регуляторном пути не задействованы гены циркадианных часов или гены действующие выше *CO* (Shaw et al. 2012).

В результате анализа первичной структуры регуляторной области генов *PPD1* выделен участок промотора длиной ~900 п.н., который обозначен как критический

для регуляции их экспрессии (Wilhelm et al. 2009). Данный участок определяется серией перекрывающихся делеций, идентифицированных в промоторе доминантных аллелей гомеологичных генов *PPD-A1* и *PPD-D1* с наиболее дистальной (3' конец делеции в аллеле *Ppd-A1a.2*) и наиболее проксимальной (5' конец делеции в аллеле *Ppd-A1a.3*) позицией относительно сайта инициации транскрипции. Кроме того, в пределах критического участка различают высоко консервативную область ~100 п.н., расположенную на 120 п.н. выше сайта инициации транскрипции и содержащую высоко консервативные позиции в гомологичных последовательностях пшеницы, ячменя, риса, и *Brachypodium* (Nishida et al. 2013), которые, как считается, контролируют подавление экспрессии генов *PPD1* в условиях сокращенного фотопериода (Wilhelm et al. 2009).

Экспрессия аллелей дикого типа (*ppd1*) является циркадианно-зависимой, с пиком транскрипционной активности через 3-6 часов после рассвета и последующим снижением экспрессии до минимального уровня в темное время суток. Доминантные аллели, напротив, характеризуются высокой экспрессией на протяжении всего дня с пиком транскрипционной активности в темное время суток и на рассвете (Beales et al. 2007; Wilhelm et al. 2009; Shaw et al. 2012). Мутации, идентифицированные в доминантных аллелях *Ppd1*, обусловлены делециями или инсерциями в области промотора (Beales et al. 2007; Wilhelm et al. 2009; Nishida et al. 2013), а также увеличением числа копий этого гена (CNV мутанты) (Diaz et al. 2012). Во всех случаях, мутации в доминантных аллелях генов *PPD1* сопровождаются повышением базального уровня транскрипции, а также качественным и количественным изменением их суточной экспрессии (Beales et al. 2007; Wilhelm et al. 2009; Diaz et al. 2012; Shaw et al. 2012). Так, в результате протяженных делеций на участке промотора доминантных аллелей *Ppd-A1a* и *Ppd-D1a* пик их экспрессии сдвигается из светлого в темный период суток. Белки PRR теперь накапливаются в течение всего дня и ночи, достигая максимальной концентрации в конце темного периода суток. На рассвете, высокое содержание белков PRR индуцирует экспрессию локуса *FT1*, концентрация продуктов которого достигает максимума к середине дня, после чего происходит ее постепенный спад. По мере того, как активность *FT1* снижается, концентрация белков PRR растет, достигая максимума в конце темной фазы, где и замыкает цикл. Мутации CNV в

аллелях *Ppd-B1a*, *Ppd-B1c* и *Ppd-B1d* (которые несут 2, 3 и 4 копии гена *PRR-2B* соответственно) напротив, ассоциированы с высокой транскрипционной активностью данных аллелей в вечернее время суток с пиком экспрессии на закате (Diaz et al. 2012; Shaw et al. 2012).

Влияние доминантных аллелей *Ppd1* из гомеологичных А, В и D геномов на снижение чувствительности к фотопериоду и сроки колошения не равнозначно. Так, доминантный аллель *Ppd-D1a* является наименее чувствительным к фотопериоду и ассоциирован с наиболее ранним цветением на коротком дне, за ним следуют не чувствительные к фотопериоду аллели генов *Ppd-A1* и *Ppd-B1* (Bentley et al. 2011).

Известно, что мутации в области промотора генов *PPD1* (главным образом доминантные аллели генов *PPD-A1* и *PPD-D1*) оказывают более сильное влияние на снижение чувствительности к фотопериоду, чем мутации, обусловленные увеличением количества функциональных копий (CNV-мутации), наиболее характерные для доминантных аллелей гена *PPD-B1*. Кроме того, механизм снижения чувствительности к фотопериоду CNV-мутантов по *PPD-B1* считается установленным и обусловлен высоким базальным уровнем продуктов экспрессии этого гена, позитивно коррелирующим с количеством его копий в геноме, тогда как идентичность, локализация и функция регуляторных участков в области промотора генов *PPD1* окончательно не выяснены. Следует также отметить, что многочисленные мутации (включая мисенс-мутации) в кодирующей области генов *PPD1* или снижение активности их экспрессии не влияет на отзывчивость пшеницы к фотопериоду или ассоциировано с более поздним цветением в условиях длинного дня (Beales et al. 2007; Guo et al. 2010).

Ранее, первичная структура генов *Ppd-A1* и *Ppd-B1* была исследована в диплоидной и некоторых видах тетраплоидной пшеницы (Takenaka et al. 2012; Takenaka et al. 2013). Однако анализ литературных источников не выявил информацию об аналогичных исследованиях генов *PPD1* в видах гексаплоидной пшеницы, отличных от *T. aestivum*, а также в большинстве видов тетраплоидной пшеницы. Данное обстоятельство является достаточным основанием для проведения исследования полиморфизма области промотора генов *PPD1* в широкой выборке тетраплоидных и гексаплоидных видов пшеницы.

1.1.1. Аллельные варианты гена *PPD-A1*

В недавних исследованиях полиплоидной пшеницы идентифицирован ряд доминантных аллелей гена *PPD-A1*. Впервые, мутации в нуклеотидной последовательности *PPD-A1*, которые вызывают снижение чувствительности к фотопериоду, были детектированы в сортах тетраплоидной пшеницы вида *T. durum* (Wilhelm et al. 2009). В частности, доминантные аллели *Ppd-A1a.2* и *Ppd-A1a.3* характеризуются делециями длиной 1027 и 1117 п.н., соответственно, в области промотора. Пятью годами позже в сортах гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* был выявлен аллель *Ppd-A1a.1*, содержащий делецию 1085 п.н. в области промотора (Nishida et al. 2013).

Не чувствительные к фотопериоду генотипы, несущие аллели *Ppd-A1a*, характеризуются активной экспрессией этого гена в течение всего дня с максимальными показателями в конце темновой фазы и на рассвете, тогда как в образцах, гомозиготных по рецессивным аллелям *Ppd-A1b*, максимальный уровень экспрессии этого гена наблюдается приблизительно через шесть часов после начала светового периода (Wilhelm et al. 2009; Nishida et al. 2013). Именно эти качественные и количественные различия в характере суточной экспрессии доминантных аллелей *PPD-A1* обуславливают изменение транскрипционной активности локуса *FT1*, что приводит к более раннему колошению в условиях сокращенного фотопериода.

Несмотря на то, что делеции выявленные в аллелях *Ppd-A1a* ассоциированы со сверхэкспрессией гена *FT1* на коротком дне, их влияние на время колошения различается (Wilhelm et al. 2009; Bentley et al. 2011). Так, разница во влиянии доминантных аллелей *Ppd-A1a.2/3* на дату колошения составляет 5 дней, в то время как разница между этими аллелями относительно рецессивного аллеля *Ppd-A1b* составляет от 30 до 40 дней (Wilhelm et al. 2009).

1.1.2. Аллели гена *PPD-B1*

Снижение чувствительности к фотопериоду у растений доминантных по гену *PPD-B1*, как правило, обусловлено либо наличием в геноме нескольких функциональных копий этого гена (Diaz et al. 2012), либо мутациями в области

промотора (Nishida et al. 2013). В настоящее время идентифицировано шесть аллельных вариантов гена *PPD-B1*, среди которых два рецессивные, и четыре доминантные (Beales et al. 2007; Diaz et al. 2012; Cane et al. 2013; Nishida et al. 2013). Три доминантных аллеля *Ppd-B1c*, *Ppd-B1a* и *Ppd-B1d* представлены CNV-мутантами, содержащими четыре, три и две копии гена *PRR-2B* в геноме, соответственно. Доминантный аллель *Ppd-B1a.1* характеризуется инсерцией транспозона типа МІТЕ длиной 308 п.н. в области промотора и детектирован в нескольких японских сортах мягкой пшеницы (Nishida et al. 2013). Рецессивный аллель *Ppd-B1b* содержит интактный ген *PRR-2B*, который представлен в количестве равном одной копии на геном (Beales et al. 2007; Diaz et al. 2012). Аллель *Ppd-B1e* также рецессивный, однако, детектирован только у одного образца мягкой пшеницы (линия Н574-1-2-6) и характеризуется полным отсутствием гена *PRR-2B* (нуль-аллель) (Cane et al. 2013).

Известно, что такие сорта мягкой пшеницы как Chinese Spring, Sonora 64, Timstein, C591 и Recital отличаются чувствительностью к фотопериоду, что обусловлено аллельным состоянием гена *PPD-B1*. Установлено, что растения, содержащие доминантный аллель *Ppd-B1* типа Sonora 64 цветут раньше, чем носители аллеля *Ppd-B1* типа Chinese Spring или *Ppd-B1* типа Recital (Diaz et al. 2012). Однако сопоставление нуклеотидных последовательностей этих генов не выявило полиморфизм в их структуре относительно референсных последовательностей сортов рецессивных по *ppd-B1* (Beales et al. 2007; Diaz et al. 2012). Последующие исследования установили, что сорт Chinese Spring содержит не менее двух копий гена *PPD-B1* на геном, одна из которых редуцирована (Beales et al. 2007). Однако в дальнейшем были обнаружены дополнительно еще две интактных копии, следовательно, для сорта Chinese Spring характерно четыре копии гена *PPD-B1*, которые содержат ОНП в третьем экзоне (А вместо G) (Diaz et al. 2012). В дальнейшем, именно благодаря редуцируемой последовательности экзона-8 в четвертой копии гена *PRR-2B* появилась возможность разработать доминантный ДНК-маркер к аллелю *Ppd-B1c*, который также может быть детектирован по наличию ОНП в экзоне-4 с помощью CAPS-маркера (Beales et al. 2007; Cane et al. 2013). Кроме того, анализ сортов, содержащих доминантный аллель *Ppd-B1a*, однако несколько различающихся между собой по

чувствительности к продолжительности светового дня, показал, что такие сорта как Sonora64, Timstein и C591 содержат три копии гена *PPD-B1*, а сорт Recital - две копии (Diaz et al. 2012).

Участки генома между копиями включают инсерции мобильных генетических элементов, преимущественно ретротранспозонов, и очень сходны между собой. Данное обстоятельство значительно осложняет разработку молекулярных маркеров для детекции доминантных аллелей гена *PPD-B1*, характеризующихся CNV-мутациями. Тем не менее, некоторые различия были обнаружены между трех- и четырех-копийными вариантами (Diaz et al. 2012). Так, точка разрыва в сортах, содержащих три копии гена *PRR-2B* (Sonora64, Timstein и C591), отличается от аналогичного участка сорта Chinese Spring отсутствием одного WIS-элемента. Именно к этой делеции был предложен доминантный ДНК-маркер, идентифицирующий наличие трех копий гена *PRR-2B* (аллель *Ppd-B1a*). Разница между последовательностями точек разрыва указывает на то, что доминантные аллели *Ppd-B1* в Sonora64/Timstein/C591 и Chinese Spring образовались в результате независимых событий амплификации гена *PRR-2B*.

Увеличение количества копий гена *PPD-B1* ассоциировано с повышением активности экспрессии этих генов на рассвете, когда экспрессия рецессивного аллеля *ppd-B1* очень низкая (Diaz et al. 2012). В этой связи предполагается, что именно увеличение количества копий гена *PPD-B1*, сопровождающееся повышением его базального уровня транскрипции, является причиной снижения чувствительности к фотопериоду. Темп развития пшеницы, как и активность экспрессии гена *PPD-B1* позитивно коррелирует с количеством его копий (Cane et al. 2013), а почти равнозначное влияние на время колошения (разница в 0.9 суток), наблюдаемое при выращивании образцов несущих *Ppd-B1a* (3 копии) и *Ppd-B1c* (4 копии) в целом согласуется с установленной корреляцией, поскольку четвертая копия гена *PRR-2B* в аллеле *Ppd-B1c* редуцирована, и экспрессируется в нефункциональный продукт (Beales et al. 2007; Cane et al. 2013).

1.1.3. Аллели и гаплотипы гена *PPD-D1*

Пять мутантных вариантов гена *PPD-D1* идентифицировано Beales и соавторами (Beales et al. 2007), однако только делеция 2089 п.н. была ассоциирована со снижением чувствительности к фотопериоду. В дальнейшем выяснилось, что данные мутации встречаются в виде комбинаций, которые были приняты как отдельные гаплотипы (Guo et al. 2010). Предложено использовать именно обозначение гаплотипов, как специфических комбинаций из мутаций, для описания генов *PPD-D1* в сортах мягкой пшеницы (Chen et al. 2013). Показано, что вероятно не только делеция 2 тыс. п.н., но и другие мутации в структуре гена *PPD-D1* оказывают влияние на регуляцию темпа развития, обуславливая разницу во времени колошения (Chen et al. 2013).

В ходе анализа гена *PPD-D1* в сортах мягкой пшеницы и *Aegilops tauschii* идентифицировано шесть гаплотипов, которые характеризуются мутациями в области промотора и частично в транскрибируемом участке гена (Guo et al. 2010). В частности, 2 полиморфных сайта детектированы в области промотора, один в первом интроне и два в кодирующей последовательности (экзон-7 и экзон-8, соответственно). К каждому гаплотипу разработаны ДНК-маркеры и показана разница в характере экспрессии относительно рецессивного аллеля *ppd-D1* (Guo et al. 2010). Гаплотип I содержит делецию 2089 п.н. в области промотора *PRR-2D*, является эквивалентом аллеля *Ppd-D1a* (Beales et al. 2007) и характеризуется наивысшим уровнем экспрессии среди гаплотипов *PPD-D1* (Guo et al. 2010). Соответственно сорта, которым присущ этот гаплотип, характеризуются наиболее ранним колошением и преобладают в регионах, где практикуют короткий период выращивания пшеницы. Гаплотип II содержит интактный ген *PRR-2D* (рецессивный аллель *Ppd-D1b*), чувствительный к фотопериоду. Он является исходным для видов гексаплоидной пшеницы и распространен преимущественно в странах Азии. Предполагается, что именно от гаплотипа II образовались гаплотипы I и III. Гаплотип III содержит инсерцию *mariner-like* транспозона в первый интрон и характеризуется самым низким уровнем экспрессии гена *PRR-2D* в сравнении с другими гаплотипами. Носители этого гаплотипа выколашиваются позже других, поэтому вероятно, могут быть полезными для выращивания в северных широтах.

Гаплотип IV содержит делецию пяти нуклеотидов в экзоне-7. Его уровень экспрессии на 5% выше уровня экспрессии гаплотипов II и III. Гаплотипы V и VI характеризуются инсерцией 16 п.н. в экзон-8. Кроме того, гаплотип VI дополнительно несет инсерции 24 и 15 п.н. в области промотора, которая на 2 тыс. п.н. выше сайта инициации транскрипции. Влияние гаплотипов IV и V на дату колошения принимает среднее значение между влиянием гаплотипов I и III. Гаплотипы V и VI идентифицированы исключительно в геноме синтетической пшеницы и *A. tauschii* (Guo et al. 2010). Не так давно в геноме мягкой пшеницы были выявлены еще две комбинации мутаций, которые образуют дополнительные гаплотипы гена *PPD-D1* (Chen et al. 2013). Один из них (*HAPL-VII*) характеризуется делецией 2089 п.н. в экзоне-8 в комбинации с инсерцией ТЭ в интрон-1 и делецией 5 п.н. в экзоне-7. Другой, *HAPL-VIII*, отличается от предыдущего наличием только 2089 п.н. в экзоне-8.

Анализируя влияние отдельных гаплотипов на фенотип, для гена *PPD-D1* было охарактеризовано четыре аллеля: доминантный аллель – *Ppd-D1a* (гаплотип I), содержащий делецию в области промотора и три рецессивных. Рецессивные аллели *ppd-D1d* (гаплотип IV) и *ppd-D1c* (гаплотип III) характеризуются делецией 5 п.н. в седьмом экзоне, которая обуславливает экспрессию в нефункциональный белок (нонсенс-мутация) и инсерцией *mariner-like* транспозона в первый интрон соответственно (Beales et al. 2007; Guo et al. 2010). Рецессивный аллель *ppd-D1b* (гаплотип II) представляет собой интактный ген *PRR-2D*. Показано, что комбинация аллеля *ppd-D1d* с тремя доминантными аллелями *Vrn-A1a*, *Vrn-B1a* и *Vrn-D1a* сильнее продлевает период до колошения чем его комбинация только с одним доминантным аллелем *Vrn-B1a*, в то время как аллель *Ppd-D1a* имеет прямую корреляцию времени колошения с уменьшением количества доминантных аллелей гомеологичных генов *VRN1* (Cane et al. 2013). Для идентификации аллеля *ppd-D1d* предложены ДНК-маркеры, детектируемые в ходе анализа методом гнездовой ПЦР (Guo et al. 2010). Детекцию аллеля *ppd-D1c* проводят методом мультиплекс-ПЦР (Cane et al. 2013).

Таким образом, ген *PPD-D1* достаточно хорошо изучен, охарактеризовано около десятка гаплотипов, проведена оценка их фенотипического эффекта и географической распространенности. Доминантный аллель *PPD-D1a*

характеризуется наибольшим влиянием на подавление чувствительности к фотопериоду среди всех известных аллелей гомеологичных генов *PPD1*, благодаря чему активно включался в селекционный процесс во времена "зеленой революции" и получил широкое распространение в современных скороспелых сортах мягкой пшеницы.

В этой связи исследование регуляторных участков гена *PPD-D1* в других видах гексаплоидной пшеницы отличных от *T. aestivum* кажется избыточным и не столь актуальным как для генов *PPD1* из А и В геномов. Не чувствительные к фотопериоду аллели генов *PPD-A1* и *PPD-B1* могут быть вовлечены в селекцию как гексаплоидной, так и для тетраплоидной пшеницы, не содержащей D геном. Кроме того, доминантный аллель *PPD-D1a* ассоциирован с признаком полужарликовости, который во многих случаях является нежелательным.

1.2. Генетическая детерминация потребности пшеницы в яровизации

Потребность растений в предварительном воздействии низкой температуры для последующего перехода к репродуктивной стадии развития, определяется их чувствительностью к яровизации. Чувствительность пшеницы к яровизации детерминирована, главным образом, аллельным составом четырех мажорных генов: *VRN1* (транскрипционный фактор семейства MADS-box), *VRN2* (zinc-finger CCT-домен содержащий ген - *ZCCT*), *VRN3* (гомолог гена *FLOWERING LOCUS T*) и *VRN4* (дупликация гена *VRN-A1* в коротком плече хромосомы 5D) (Yan et al. 2003; Yan et al. 2004b; Yan et al. 2006; Kippes et al. 2015). Система этих генов формирует единый регуляторный механизм, отдельные элементы которого вовлечены в эпистатическое взаимодействие. В результате взаимодействия между генами *VRN* образуется регуляторная петля с положительной обратной связью, где изменение активности транскрипции любого из этих генов влияет на активность экспрессии остальных генов системы, контролирующей процесс яровизации и сроки колошения пшеницы.

Изучение генетической системы удобнее проводить, опираясь на данные, предварительно полученные на модельном организме, которым для цветочных растений обычно является арабидопсис. Но поскольку для генов *VRN2* пшеницы не обнаружено гомологов в арабидопсисе, равно как и для гена *FLC* (вовлечен в контроль чувствительности к яровизации) арабидопсиса не представлены гомологи в пшенице, то предполагается, что системы, регулирующие процесс яровизации, или, по крайней мере, отдельные элементы этой системы, в этих двух видах эволюционировали не независимо друг от друга (Yan et al. 2004b). В то же время, показано существование межвидовой функциональной активности генов, участвующих в регуляции цветения. Например, обнаружен контроль времени цветения продуктами экспрессии гена *SOCI* риса в трансгенном арабидопсисе, и, соответственно, контроль времени колошения трансгенного риса продуктами экспрессии гена *FLC* арабидопсиса (Tadege et al. 2003). Кроме того, показана регуляция времени цветения трансгенного арабидопсиса продуктами экспрессии генов *VRN1* и *VRN2* пшеницы (Adam et al. 2007; Diallo et al. 2010). В этой связи предполагается, что однодольные и двудольные классы растений, хотя и имеют

разные системы контроля процесса яровизации и времени цветения, тем не менее, они отличаются отдельными компонентами, выполняющими аналогичные функции (Diallo et al. 2010).

В настоящее время для всех локусов *VRN* идентифицированы гены-кандидаты, а изучение их молекулярной структуры позволило выяснить причины, обуславливающие изменения соответствующих физиологических процессов в образцах с альтернативным аллельным составом этих генов, и построить обобщенную модель, которая отражает взаимодействие между отдельными элементами этой системы в процессе регуляции чувствительности к яровизации и времени колошения пшеницы.

1.2.1. Гены *VRN1*

1.2.1.1. Гены *VRN1* и продукты их экспрессии

Гены *VRN1* картированы в середине длинных плеч хромосом пятой гомеологической группы (Yan et al. 2003). Идентифицировано два гена (дистанция между которыми 0.03 сМ), которые являются вероятными кандидатами *VRN1*. Оба этих гена кодируют MADS-бокс-содержащие транскрипционные факторы ортологического семейства генов арабидопсиса *APETALA1 (AP1) / FRUITFULL (FUL/AGL8)* и *AGL1* соответственно (Yan et al. 2003; Danyluk et al. 2003; Trevaskis et al. 2003). Продукты экспрессии генов этого семейства принимают участие в регуляции процессов, индуцирующих переход растительного организма от вегетативной стадии развития к генеративной (Murai et al. 2003; Danyluk et al. 2003). Нарушение функции генов *VRN1* в диплоидной пшенице сопровождалось отсутствием генеративной стадии развития (Distelfeld et al. 2010; Shitsukawa et al. 2007). Однако в последующих исследованиях было установлено, что в полиплоидной пшенице переход к цветению происходит и в случае полного отсутствия генов *VRN1* (Chen et al. 2012). Нуль-аллельные по *VRN1* мутанты характеризуются более продолжительным развитием, но при этом имеют неповрежденные цветки и фертильное зерно. Предполагается, что у таких растений

индукция цветения опосредствована продуктами экспрессии других MADS-боксов содержащих генов, не аллельных *VRN*, например, *FUL2* и *FUL3* (Chen et al. 2012). Поскольку, корреляция между структурой и экспрессией вышеперечисленных генов-кандидатов и альтернативными аллелями *VRN1* характерна только для гена *API*, предполагается, что наиболее вероятным кандидатом локуса *VRN1* является ген *APETALA1 / FRUITFULL ((API/FUL)-like)* (Yan et al. 2003; Murai et al. 2003). Последующие исследования подтвердили, что именно ген *WFUL1* идентичен пшеничным генам *VRN1* (Kinjo et al. 2012).

В гексаплоидной пшенице, ген *VRN-A1* часто представлен более чем одной копией на геном (Diaz et al. 2012; Würschum et al. 2015). Предполагается, что потребность озимой пшеницы в яровизации (продолжительность яровизации до полного насыщения, когда дальнейшее увеличение периода яровизации не приводит к сокращению сроков колошения, при прочих равных условиях) и продолжительность вегетационного периода развития пшеницы, в том числе, зависят и от количества копий *VRN-A1* в геноме (Diaz et al. 2012). Однако, следует отметить, что данное предположение является дискуссионным, поскольку среди различных копий *VRN-A1* наблюдается полиморфизм экзонов 4 и 7, который, как было показано позже, оказывает влияние на те же признаки (Chen et al. 2009; Eagles et al. 2011; Li et al. 2013).

В структуре генов *VRN1* локализовано 8 экзонов, 6 из них кодируют функциональные домены: MADS- и К-боксы (Yan et al. 2003). Тогда как К-боксы вовлечены в белок-белковые взаимодействия, домен MADS обеспечивает связывание с регуляторными мотивами контролируемых генов. Домен SRF-TF, принадлежащий надсемейству MADS, кодируется первым экзоном генов *VRN1* (Treisman 1992). В его структуре различают ряд функционально-активных сайтов: фосфорилирования, димеризации и сайт, вовлеченный в связывание любого белка, содержащего MADS-боксы с ДНК (Santelli et al. 2000). Последний, обеспечивает специфичность ДНК-белкового взаимодействия, при котором, благодаря образующимся в домене димеризации амфипатическим альфа спиральям, происходит оборачивание молекулы ДНК вокруг SRF-доменов содержащего белка. Аминокислотная последовательность К-домена, как правило, детектируется во всех транскрипционных факторах SRF типа. В генах *VRN1* К-боксы кодируются

экзонами 2-6. Белок-белковые взаимодействия К-бокса с MADS-боксо-содержащими белками (Yang et al. 2004) обеспечиваются посредством образования суперспиральных структур (Lupas et al. 1991).

1.2.1.2. Регуляция экспрессии генов *VRN1*

В растениях, содержащих доминантные и рецессивные аллели генов *VRN1*, выращенных на продолжительном фотопериоде и без яровизации, транскрипты доминантных аллелей детектируются на стадии 1-3 листов, однако уже через несколько недель (на стадии шести листов) можно наблюдать продукты экспрессии как доминантных, так и рецессивных аллелей (Loukoianov et al. 2005). Доминантные аллели генов *VRN-A1*, *VRN-B1* и *VRN-D1* снижают чувствительность к яровизации и определяют яровой или факультативный тип развития (Stelmakh 1987). Однако влияние доминантных аллелей гомеологичных генов *VRN1* на чувствительность к яровизации и темп развития пшеницы не равнозначно. Изменение силы этого влияния можно проследить в ряду *VRN-A1* > *VRN-B1* > *VRN-D1* (Stelmakh 1993), что коррелирует с относительным уровнем их транскрипционной активности и действием продуктов их экспрессии на подавление активности гена *VRN2* (Loukoianov et al. 2005).

Базальный уровень транскрипции интактных генов *VRN1* очень низкий, однако, он резко усиливается после действия низкой температуры (Danyluk et al. 2003; Yan et al. 2003; Murai et al. 2003; Trevaskis et al. 2003; Alonso-Peral et al. 2011). Активность экспрессии *VRN1* количественно изменяется в зависимости от длительности низкотемпературного воздействия и составляет прямую корреляцию по отношению к ней (Danyluk et al. 2003; Trevaskis et al. 2003; von et al. 2005; Sasani et al. 2009). Последующие исследования генетической экспрессии *VRN1* в условиях яровизации установили, что ни инсерция МГЭ в области промотора доминантного аллеля *Vrn-A1a* ни мутации локализованные в первом интроне, не критичны для индукции транскрипции, обусловленной действием низкой температуры (Trevaskis et al. 2007; Hemming et al. 2009; Alonso-Peral et al. 2011).

Гены *VRN1* характеризуются наличием, по крайней мере, двух регуляторных участков, локализованных в области промотора и первого интрона, соответственно

(Yan et al. 2004a; Fu et al. 2005). Предполагается, что регуляция экспрессии генов *VRN1* у злаков зависит, главным образом, от действия двух антагонистичных механизмов: (1) активация транскрипции с привлечением регуляторных сайтов промотора, характеризующаяся низким базальным уровнем транскрипции, который может быть увеличен действием низкой температуры во время яровизации и (2) подавляющим механизмом конститутивной репрессии хроматина, контролируемой регуляторными участками первого интрона (Alonso-Peral et al. 2011). Доминантные аллели генов *VRN1* детерминированы различного рода нарушениями в регуляции их экспрессии и обусловлены многочисленными мутациями, идентифицируемыми в области промотора и первого интрона.

Исследование молекулярной структуры первого интрона генов *VRN1* у образцов пшеницы и ячменя выявило критический участок (около 4.2 кб), в котором первые 400 нуклеотидов отличаются высокой консервативностью. Предполагается, что именно на этом участке могут быть расположены регуляторные последовательности (Fu et al. 2005). Однако в дальнейшем было установлено, что инсерции, локализованные выше критического участка, также обуславливают снижение чувствительности к яровизации (доминантные аллели *Vrn-A^mIf*, *Vrn-A^mIh*) (Dubcovsky et al. 2006). Анализ эпистатического взаимодействия между генами *VRN* ячменя обнаружил, что влияние отдельных мутаций на участке интрона-1 гена *VRN-H1* на фенотип, неравнозначно. Так, протяженные делеции ассоциированы с более активной экспрессией генов *VRN1* и более ранним колошением при отсутствии яровизации, чем короткие делеции (Hemming et al. 2009; Szucs et al. 2007).

Известно, что мутации в первом интроне гомеологичных генов *VRN1* более эффективно подавляют действие продуктов экспрессии *VRN2* на время цветения, чем мутации локализованные области промотора (Dubcovsky et al. 2008), индуцируя транскрипцию *VRN1* независимо от экспрессии гена *VRN2* (Dubcovsky et al. 2005; Hemming et al. 2008; Pidal et al. 2009). Важность первого интрона генов *VRN1* в подавлении транскрипции до яровизации подтверждается наличием не менее 18 мутаций на этом участке, ассоциированных с повышением активности экспрессии этих генов и снижением чувствительности к яровизации у пшеницы и ячменя (Fu et al. 2005; Dubcovsky et al. 2006; Cockram et al. 2007a; Cockram et al.

2007b; Santra et al. 2009; von Zitzewitz et al. 2005; Hemming et al. 2009; Milec et al. 2012; Shcherban et al. 2012; Muterko et al. 2015b). В результате этих мутаций могут, например, быть повреждены сайты связывания с гипотетическими транскрипционными факторами, которые подавляют транскрипцию *VRN1* (Fu et al. 2005), или же данные мутации могут повлиять на сайты, необходимые для поддержания подавленного состояния хроматина, посредством модификации гистонов, формируя, таким образом, механизм соматической памяти о яровизации («зимний код») у злаков (Trevaskis et al. 2007; Oliver et al. 2009; Diallo et al. 2012), подобно тому, как это происходит в арабидопсисе (Sung et al. 2006).

Кроме того, результаты недавних исследований подчеркивают также важность первого интрона и в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов *VRN1* (Xiao et al. 2014; Kippes et al. 2015). Так, в последовательности интрона-1 генов *VRN1* локализованы сайты узнавания РНК-связывающего белка TaGRP2 (GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN2), который гомологичен белку GRP7, регулирующему цветение у арабидопсиса (Streitner et al. 2008). Белки TaGRP2 связываются с одноцепочечной молекулой пре-мРНК генов *VRN1*, ингибируя их экспрессию. В ходе яровизации, белок TaGRP2 модифицируется O-N-ацетилглюкозамин трансферазой (O-GlcNAc) в результате чего приобретает способность к взаимодействию с карбогидрат-связывающим белком VER2. Связывание VER2 с белком O-GlcNAc-TaGRP2 препятствует накоплению TaGRP2 в ядре клетки и способствует тем самым его диссоциации от мРНК *TaVRN1* (Xiao et al. 2014).

1.2.1.3. Регуляторные сайты в области промотора генов *VRN1*

В области промотора генов *VRN1* идентифицировано несколько цис-активных сайтов (Рисунок 1), которые принимают участие в регуляции транскрипции (Golovnina et al. 2010; Diallo et al. 2012), однако детальное исследование проведено лишь некоторых из них – CArG- VRN- и G-боксов.

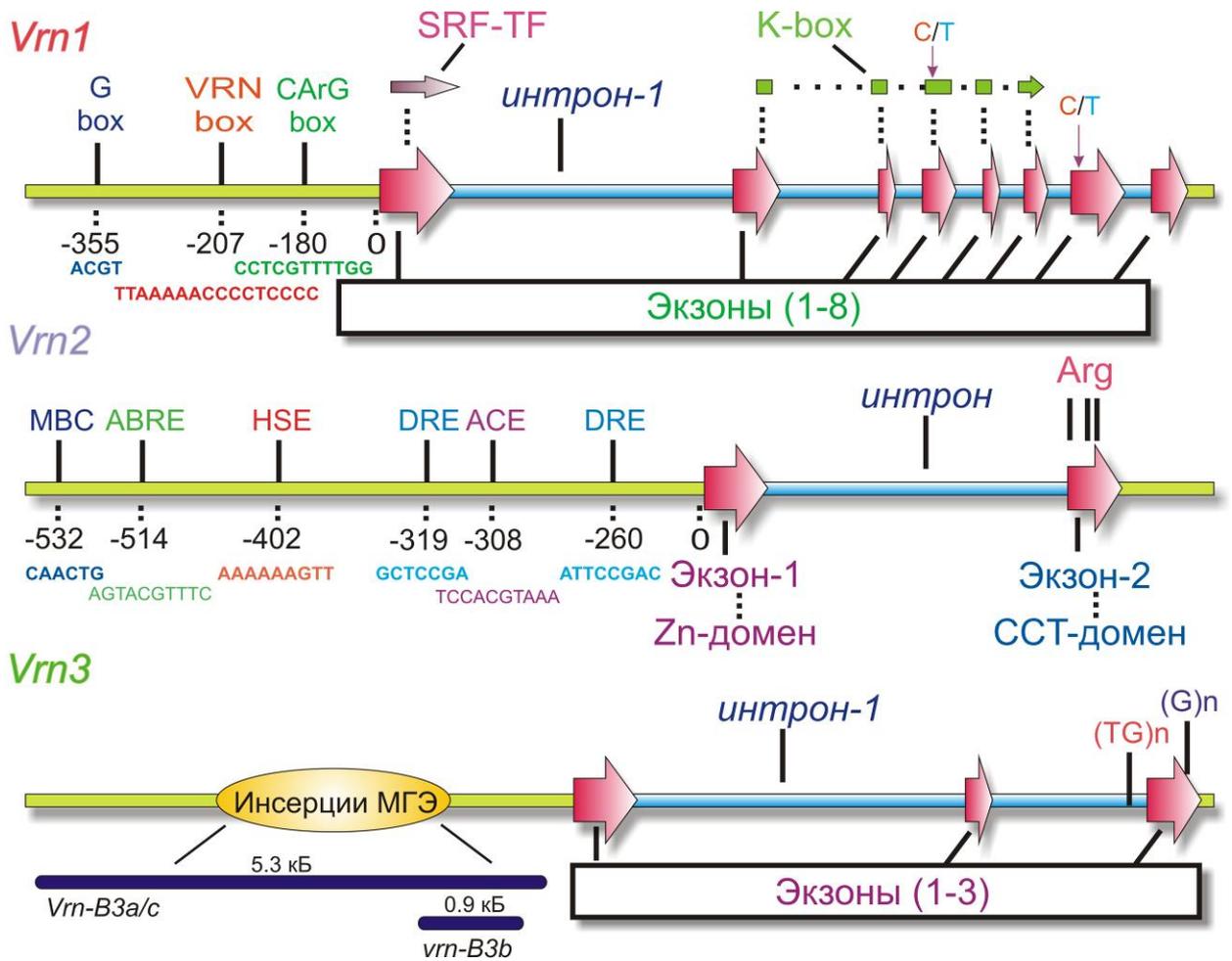


Рисунок 1. Схематическое представление структуры генов *VRN* (Muterko et al. 2015a). Обозначены регуляторные элементы на участке промотора генов *VRN1* и *VRN2*, а также последовательности, кодирующие функциональные домены. Для гена *VRN1* указаны сайты локализации полиморфных позиций в экзонах 4 и 7, дифференцирующие альтернативные гаплотипы *VRN-A1*. В кодирующей области гена *VRN2* обозначены сайты локализации триплетов, кодирующие консервативные остатки аргинина, имеющие критическое значение в обеспечении функционирования CCT-домена. На участке промотора доминантных *Vrn-B3a*, *Vrn-B3c* и рецессивного аллеля *vrn-B3b* локализованы инсерции мобильных генетических элементов (МГЭ), а в транскрибируемой области обозначены полиморфные сайты в генах *VRN-A3* и *VRN-B3*, ассоциированные с изменением во времени колошения.

Немного выше сайта инициации транскрипции, но ниже ACGT-мотива локализована последовательность (CCTCGTTTTGG) CArG-бокса (сайт связывания с MADS-боксом), который, впрочем, имеется у всех представителей семейства

генов, кодирующих MADS-боксы-содержащие белки. Изначально предполагалось, что CArG-боксы имеют ключевое значение в регуляции активности транскрипции генов *VRN1* (Yan et al. 2003). Так пшеничные SVP-like (Short Vegetative Phase) MADS-боксы-содержащие белки VRT2 (vegetative to reproductive transition 2) способны как *in vitro*, так и *in vivo* связываться с CArG-боксом промотора *VRN1* (Kane et al. 2007; Dubcovsky et al. 2008). Однако последующие исследования показали, что чувствительность к яровизации сохраняется и при полном отсутствии CArG-боксов, следовательно, последний не является критическим в регуляции экспрессии генов *VRN1* (Pidal et al. 2009). Тем не менее, не исключена потенциальная роль белков VRT2 в регуляции экспрессии *VRN1* независимо от яровизации, например, при формировании цветка (Dubcovsky et al. 2008; Trevaskis et al. 2007). Известно, что для некоторых озимых сортов мягкой пшеницы, чувствительных к фотопериоду (рецессивных по генам *PPD1*), длительность яровизации может быть значительно сокращена или же исключена вовсе, если в течение нескольких недель (42 дня) выращивать такие растения на сокращенном фотопериоде (Dubcovsky et al. 2006; McKinney et al. 1935; Krekule 1964; Evans 1987). Это явление не характерно для арабидопсиса, однако наблюдается также у злаков подсемейства *Festucoideae* (Heide 1994). Показано, что такая замена низкотемпературной яровизации сокращенным фотопериодом ассоциирована с подавлением гена *VRN2*, а также наличием регуляторного участка в промоторе *VRN1*, чувствительного к сокращенному фотопериоду (Dubcovsky et al. 2006). Подавление экспрессии *VRN2*, опосредствованное выращиванием растений на коротком дне при комнатной температуре, не сопровождается последующей активацией генов *VRN1* до тех пор, пока эти растения не будут перенесены в условия длинного дня, тогда как у растений, которые прошли яровизацию, активация экспрессии *VRN1* происходит и без последующего действия условий продолжительного фотопериода (Dubcovsky et al. 2006). Эти наблюдения можно объяснить, предположив существование гипотетического репрессора генов *VRN1*, который проявляет активность при условии сокращенного фотопериода. Диплоидная пшеница с делетированным CArG-боксом и VRN-боксом или CArG-боксом и частью последовательности в первом интроне гена *VRN1*, характеризуется повышенной активностью транскрипции этого гена при

выращивании на сокращенном фотопериоде. В этой связи предполагается, что CArG-боксы могут участвовать в процессе регуляции фотопериодом и играть важную роль при связывании с гипотетическим репрессором, проявляющим активность в условиях короткого дня (Dubcovsky et al. 2006).

В результате анализа первичной структуры участка промотора доминантных аллелей *Vrn-A^m1a* и *Vrn-A^m1g* было установлено, что оба доминантных аллеля содержат делецию 20 п.н. в аналогичном участке промотора, предшествующем CArG-боксу (Pidal et al. 2009). На этом же участке локализованы также мутации двух доминантных аллелей *Vrn-A1a* и *Vrn-A1b*, которые идентифицированы в геноме полиплоидной пшеницы (Yan et al. 2004a). Таким образом, основываясь на результатах сравнения нуклеотидных последовательностей участка промотора альтернативных аллелей гена *VRN-A1* была выделена последовательность длиной в 16 п.н. (TTAAAAACCCCTCCCC) обозначенная как VRN-боксы, который, как предполагается, участвует в регуляции экспрессии генов *VRN1* и контролирует чувствительность к яровизации (Pidal et al. 2009).

CArG- и VRN-боксам на участке -2300 – 0 п.н. предшествуют bZIP (basic leucine zipper)-связывающие (взаимодействуют с транскрипционными факторами, содержащими bZIP-домен) G и четыре других гибридных боксов (A/G, A/C, G/A, G/C). В первичной структуре этих боксов содержится четырехнуклеотидная последовательность ACGT-мотива, который является сайтом связывания с комплексом FDL2-FT (возможно при участии дополнительных белков) (Li et al. 2008), подобно тому, как белковый комплекс FT–FD связывается с регуляторным участком (C-боксом) промотора *API* (гомолог пшеничного локуса *VRN1*) в арабидопсисе (Wigge et al. 2005). При этом ACGT-мотив связывается собственно с белком FDL2. В этой связи предполагается, что пшеничный ген *TaFDL2* (Flowering locus D-Like 2) является гомологом гена *FD* арабидопсиса. Таким образом, ACGT-мотив является необходимым компонентом системы, контролирующей активацию генов *VRN1* продуктами экспрессии гена *VRN3* (Li et al. 2008).

1.2.1.4. Эпигенетическая регуляция *VRN1*

В результате исследования гена *VRN1* ячменя (*HvVRN1*) установлено, что репрессия этого гена ассоциирована с высоким содержанием в хроматине гистона-

3, метилированного по лизину-27 (H3K27me3). После яровизации наблюдается снижение содержания гистона-3, метилированного по лизину-4 (H3K4me3) на участке первого экзона и в начале первого интрона, а также полная элиминация гистона H3K27me3 в области промотора, экзона-1 и интрона-1 из хроматина локуса *HvVRN1*. В связи с этим предполагается, что яровизация способствует активации хроматина гена *HvVRN1*. При этом влияние яровизации на содержание модифицированных гистонов H3K4me3 и H3K27me3 в хроматине локусов *HvVRN2* и *HvVRN3* не обнаружено. Показано, что индуцируемые яровизацией побегов изменения количественного содержания метилированных гистонов в хроматине локуса *HvVRN1*, сохраняются в дальнейшем и в листьях вегетирующих растений, что подтверждает данные, согласно которым именно в регуляции активного состояния хроматина локуса *HvVRN1*, опосредствованного модификацией его гистонов, и проявляется механизм эпигенетической памяти о яровизации у злаков.

Позже, аналогичные исследования были проведены на генетическом материале мягкой пшеницы. Анализ содержания модифицированных гистонов H3K4me3 и H3K27me3 в области промотора генов *Vrn1* и *TaFT1* (*VRN3*) в образцах гексаплоидной пшеницы контрастных по типу развития, обнаружил обогащение гистоном H3K4me3 при неизменном уровне гистона H3K27me3 в озимой пшенице после яровизации. Содержание H3K4me3 в образцах яровой пшеницы после яровизации, напротив, снижается при неизменном уровне гистона H3K27me3 (Diallo et al. 2012). Следовательно, переход к цветению озимой пшеницы, индуцируемый условиями яровизации, ассоциирован с изменением содержания метилированных гистонов H3K4me3 и H3K27me3 в области промотора генов *VRN1* и *TaFT1*. Также установлена прямая корреляция между уровнем экспрессии этих генов и вышеупомянутым изменением в содержании модифицированных гистонов H3K4me3 и H3K27me3 (Diallo et al. 2012).

Известно, что модифицированные гистоны H3K4me3 и H3K27me3 локализованы в участках генома, которые ассоциированы с активным и подавленным состоянием хроматина, соответственно (Bernstein et al. 2006). У растений, как и у других организмов, регуляция содержания гистонов H3K4me3 и H3K27me3 в разных участках хроматина опосредствована активностью белковых комплексов PCG (polycomb group), TRXG (trithorax group), которые играют

ключевую роль в процессах эпигенетической репрессии и активации, соответственно (Gendall et al. 2001; Pien et al. 2008; Schuettengruber et al. 2007). Кроме того, в арабидопсисе, ключевые локусы системы, контролирующей время цветения – *FLC* и *FLM*, в подавленном состоянии характеризуются высоким содержанием в хроматине гистона H3K27me3 (Jiang et al. 2008).

Предполагаемые компоненты комплекса, регулирующего активное состояние хроматина путем изменения содержания модифицированных гистонов, обнаружены также у злаков (Fu et al. 2007; Koyama et al. 2012). В частности, гены, кодирующие белки типа VIL (VIN3 (vernalization insensitive 3) - Like) картированы в прицентромерном участке хромосом 1, 5, 6 в А геноме *T. monococcum* L. (Fu et al. 2007) и в D геноме *A. tauschii* Coss. (Koyama et al. 2012). Условия яровизации, а именно действие низких температур, способствуют повышению уровня экспрессии (активации) генов *TmVIL* пшеницы, как на длинном, так и на коротком дне, а после повышения температуры, уровень экспрессии генов *TmVIL* возвращается к исходным (до яровизации) значениям (Fu et al. 2007). Если принять во внимание тот факт, что продукты экспрессии *VRN1* снижают морозостойкость пшеницы, то возможная роль повышения транскрипционной активности генов *VIL* во время действия низких температур могла бы заключаться в подавлении экспрессии генов *VRN1*, что способствовало бы, таким образом, повышению толерантности организма к низкотемпературному воздействию. Гены *VIL* активируются в начале яровизации и предшествуют активации генов *VRN1*. Аналогичное влияние действия низких температур и сокращенного фотопериода на активность транскрипции генов *VIL* арабидопсиса и пшеницы, вместе с идентичной доменной структурой белков, кодируемых этими генами, позволяет предположить, что гены *VIL* у арабидопсиса и злаков выполняют аналогичные функции (Fu et al. 2007; Koyama et al. 2012).

1.2.1.5. Полиморфизм в кодирующей области гена *VRN-A1*

Среди гомеологичных генов серии *VRN1*, полиморфизм в кодирующей области, ассоциированный с изменением количественных показателей ряда признаков, представляющих значительный интерес в селекции пшеницы,

идентифицирован только для гена *VRN-A1*. Однонуклеотидный полиморфизм в двадцатой позиции экзона-4 этого гена различает его С и Т типы (гаплотипы Ex4C и Ex4T, соответственно). Транзиция цитозина в тимин, в данной позиции, обуславливает миссенс-мутацию, сопровождающуюся замещением консервативного лейцина на фенилаланин в последовательности К-бокса (Leu¹¹⁷->Phe¹¹⁷). Полиморфизм четвертого экзона *VRN-A1* впервые идентифицирован и ассоциирован с влиянием на продолжительность вегетационного развития в озимых сортах мягкой пшеницы из США (Chen et al. 2009). Так, образцы озимой пшеницы с С типом экзона-4 *VRN-A1*, отличались более ранним колошением, по сравнению с образцами, несущими Т тип экзона-4 этого гена (Chen et al. 2009). Последующие исследования, проведенные на Австралийских сортах *T. aestivum* подтвердили данное наблюдение и дополнили его новыми результатами, согласно которым гаплотип Ex4T также ассоциирован с более высокой морозостойкостью и потребностью в более продолжительной яровизации (Eagles et al. 2011). В связи с возможностью взаимодействия К-домена с другими MADS-бокс-содержащими белками, предполагается, что полиморфизм в экзоне-4 *VRN-A1* может оказывать влияние на признаки пшеницы, проявление которых связано с экспрессией этого гена (Eagles et al. 2011).

Другим важным однонуклеотидным полиморфизмом идентифицированным в кодирующей части гена *VRN-A1* является С->Т транзиция в седьмом экзоне. В результате данной миссенс-мутации, происходит замещение аланина на валин (Ala¹⁸⁰/Val¹⁸⁰). Хотя мутация локализована в С-терминальной области аминокислотной последовательности белка *VRN-A1*, в которой не идентифицировано каких-либо функциональных доменов, полиморфизм в данном сайте ассоциирован с различием в продолжительности яровизации и во времени колошения пшеницы (Li et al. 2013). Кроме того, было достоверно установлено, что мутация Ala¹⁸⁰/Val¹⁸⁰ в аминокислотной последовательности белка *VRN-A1* влияет на его взаимодействие с продуктами экспрессии гена *TaHOX1*, что сказывается на сроках колошения (Li et al. 2013). В ходе яровизации, под действием низкой температуры, транскрипционная активность генов *TaHOX1* постепенно возрастает и поддерживается на высоком уровне, подобно тому, как это наблюдается у генов *VRN1*. Гены *TaHOX1* ортологичны генам *HD-Zip* класса 1 (Homeodomain-leucine

zipper subfamily I), AtHB-7 (Homeobox 7) арабидопсиса, вовлеченных в регуляцию развития в зависимости от действия стрессовых факторов внутренней и внешней среды (Olsson et al. 2004; Ré et al. 2014). Высокий уровень экспрессии TaHOX1 ассоциирован с ранним колошением как в пшенице так и в трансгенном арабидопсисе (Olsson et al. 2004; Li et al. 2013). Белки TaHOX1 содержат в своей структуре гомеодомен (HD) и доменом лейциновой застежки (Zip). Белки TaHOX1 и VRN-A1 характеризуются наличием пяти лейциновых оснований, вовлеченных во взаимодействие ("пристегивание") Zip-домена белка TaHOX1 с С-терминальной аминокислотной последовательностью белка VRN-A1. В выровненных аминокислотных последовательностях белков VRN-A1 и TaHOX1, аланин, в позиции 180 в белке VRN-A1, экспрессирующемся с копии одноименного гена с интактным экзоном-7 (гаплотип Ex7C), располагается против аланина в последовательности белка TaHOX1. Однако замещение Ala¹⁸⁰->Val¹⁸⁰ в белке, который экспрессируется с копии *VRN-A1*, содержащей мутантный экзон-7 (Ex7T), обуславливает возникновение несоответствия между последовательностями и приводит к снижению способности VRN-A1 взаимодействовать с TaHOX1 (Li et al. 2013).

1.2.2. Гены *VRN2*

Ген *VRN2* впервые картирован в геноме диплоидной пшеницы в дистальном участке длинного плеча хромосомы 5A (как транслокация из хромосомы 4A) (Dubcovsky et al. 1998). Позже, методом позиционного клонирования было идентифицировано три гена-кандидата для локуса *VRN2* (как в дальнейшем выяснилось, это один tandemный дублицированный ген), которые кодируют транскрипционные факторы ZCCT типа (Zinc finger CCT) содержащие домен «цинкового пальца» и CCT мотив (Yan et al. 2004b) (Рисунок 1). Транскрипционные факторы ZCCT в пшенице подобны CO и CO-like белкам, регулирующим время цветения в арабидопсисе (Putterill et al. 1995). Однако данное подобие ограничивается лишь наличием в их структуре CCT домена. Рецессивные аллели *vrn2*, ассоциированные со снижением чувствительности к яровизации, обусловлены мутациями в последовательности *ZCCT* генов, кодирующей CCT-

домен или наличием нуль-аллелей по этим генам (Yan et al. 2004b; Distelfeld et al. 2009; Zhu et al. 2011). Однако до сих пор не обнаружено ни одного представителя полиплоидной пшеницы, который бы содержал нуль-аллели или не функциональные варианты одновременно всех генов *ZCCT* (Distelfeld et al. 2009; Zhu et al. 2011; Ma et al. 2012).

Гены *VRN2* в полиплоидной пшенице локализованы в длинном плече хромосомы 5A и на длинных плечах хромосом четвертой гомеологической группы в В и D геномах (Diallo et al. 2010; Distelfeld et al. 2009; Zhu et al. 2011). Каждый геном полиплоидной пшеницы содержит по три копии гена *ZCCT*, однако одна из этих копий (*ZCCT3*) редуцирована и не функциональна, а функциональную активность сохраняют лишь гены *ZCCT1* и *ZCCT2* – "гипотеза двух генов *ZCCT*" (Distelfeld et al. 2009). Кроме того, часто наблюдается дупликация гена *ZCCT-B2* (*ZCCT-B2a* и *ZCCT-B2b* копии) (Distelfeld et al. 2009). Вероятно, в геноме гексаплоидной пшеницы присутствуют не менее девяти вариантов *ZCCT* генов (*ZCCT-1X*, *ZCCT-2X* и *ZCCT-3X*, где X обозначает А, В или D геном), по три варианта в каждом геноме (Zhu et al. 2011). Поскольку, в отличие от генов *VRN1* и *VRN3*, озимый тип развития пшеницы определяется доминантными аллелями *VRN2*, то для перехода к яровому типу развития необходимо присутствие рецессивной гомозиготы по всем генам *ZCCT*. Конечно, такая вероятность для полиплоидной пшеницы очень низкая, потому природное разнообразие по *VRN2* наблюдается только в диплоидной пшенице и ячмене, тогда как яровые образцы гексаплоидной пшеницы, тип развития которых обусловлен рецессивной гомозиготой по *vrn2*, до настоящего момента не выявлены.

Продукты экспрессии генов *VRN2* имеют ядерную локализацию (Li et al. 2011) и накапливаются во всех тканях листа молодых неярковизированных растений (Diallo et al. 2010), откуда через флоэму попадают в клетки апикальной меристемы, где накапливаются на протяжении всего вегетационного периода (Kane et al. 2007). В озимых сортах диплоидной пшеницы и ячменя (доминантные аллели *VRN2*) экспрессия генов *ZCCT* прогрессивно снижается в течение всего периода ярковизации, чего не наблюдается у неярковизированных растений (Yan et al. 2004b; Trevaskis et al. 2006). Исследования с РНК интерференцией гена *ZCCT-B1* мягкой пшеницы показали, что снижение концентрации продуктов экспрессии гена *ZCCT-*

В1 обуславливает сокращение периода до колошения, предполагая, что этот ген играет существенную роль в регуляции времени колошения пшеницы (Yan et al. 2004b). Кроме того, недавно было установлено, что ген *VRN-B2* оказывает более сильное влияние на потребность пшеницы в яровизации, чем гомеологичный ему ген *VRN-D2* (Kippes et al. 2016).

1.2.2.1 Структура генов *ZCCT* и продуктов их экспрессии

Первый экзон генов *ZCCT* кодирует домен цинкового-пальца, а второй – ССТ домен. В результате анализа нуклеотидных последовательностей участка промотора генов *ZCCT* обнаружено несколько цис-активных элементов (Рисунок 1) участвующих в регуляции чувствительности к засухе (MBS – "CAACTG"), действию абсцизовой кислоты (ABRE – "AGTACGTTTC"), тепловому шоку (HSE – "AAAAAAGTT"), низкой температуры (DRE – "GCTCCGA", "ATTCCGAC"), освещению (ACE – "TCCACGTAАА") и повреждениям (травматическая индукция) (Diallo et al. 2010). Установлено, что данные абиотические стрессоры, за исключением освещенности, снижают активность транскрипции генов *VRN2* (Diallo et al. 2010). При использовании трансгенных линий арабидопсиса доказано непосредственное влияние продуктов экспрессии генов *VRN2* на повышение морозостойкости (Diallo et al. 2010), что возможно обусловлено их подавлением экспрессии генов *VRN1*, транскрипционная активность которых обратно коррелирует с толерантностью к действию низких температур.

Установлено, что изменение аминокислотной последовательности в шести консервативных позициях ССТ-домена белков *ZCCT1*, *ZCCT2*, *PPD1* и *CONSTANS (CO)* ассоциированы с изменением времени колошения (Yan et al. 2004b; Diallo et al. 2010; Distelfeld et al. 2009; Turner et al. 2005; Robson et al. 2001). Руководствуясь тем, что обнаруженные мутации в нефункциональных продуктах экспрессии генов *ZCCT*, локализованные именно в ССТ-домене, а также опираясь на наличие непосредственного взаимодействия между ССТ-доменом белков *ZCCT* и белками *HAP* (Heme Activator Protein), предполагается, что подавление транскрипции *VRN3* продуктами экспрессии генов *VRN2*, аналогично тому, как это ранее было показано для *CO* и других ССТ-доменов содержащих белков (Li et al.

2011). Предполагается, что ССТ-домен содержащие белки, замещающие субъединицу НАР2 в комплексе НАР2/3/5, также способны связываться с ССААТ-боксом, в результате чего возникают альтернативные пути регуляции генов, содержащих ССААТ-боксы (Wenkel et al. 2006).

Последовательность ССТ-домена белков ZCCT содержит в трех позициях: 16, 35 и 39 консервативные остатки аргинина. Мутации в этих позициях обуславливают снижение прочности связывания белков ZCCT при белок-белковых взаимодействиях, что сопровождается снижением их функциональной активности (Yan et al. 2004b; Diallo et al. 2010; Distelfeld et al. 2009; Li et al. 2011). Установлено, что наиболее сильное влияние на снижение прочности связи при взаимодействии между белками ZCCT и НАР, как и при ССТ-ССТ взаимодействиях (взаимодействия между белками ZCCT и СО), оказывает мутация по аргинину в 16-й позиции ССТ-домена (Li et al. 2011).

Исходя из того, что локус *VRN2* в каждом из гомеологичных геномов пшеницы содержит по три гена *ZCCT*, можно предположить, что рецессивный аллель *vrn2*, обуславливающий яровой тип развития, определяется присутствием рецессивной гомозиготы по девяти вариантам генов *ZCCT* в гексаплоидной пшенице и шести вариантам в тетраплоидной. Кроме того, для тетраплоидной пшеницы частой является дупликация гена *ZCCT-B2* (*ZCCT-B2a* и *ZCCT-B2b* копии). Однако исследование молекулярной структуры этих генов и продуктов их экспрессии показало, что ген *ZCCT-3* имеет многочисленные мутации и редуцированный экзон-1, поэтому продукты его экспрессии не функциональны или отсутствуют вовсе (Yan et al. 2004b; Diallo et al. 2010). При изучении альтернативных аллельных вариантов генов *ZCCT* было установлено, что оба гена (*ZCCT1* и *ZCCT2*) принимают участие в регуляции чувствительности к яровизации, однако для каждого из геномов характерны разные функциональные варианты. В частности, ССТ-домен белков *ZCCT-A1* и *ZCCT-B1* у тетраплоидной пшеницы вида *T. durum* содержит фиксированную мутацию R39C (Distelfeld et al. 2009), которая также широко распространена, как и мутация R35W, в белках *ZCCT-A1* в гексаплоидной пшенице *T. aestivum* (Diallo et al. 2010; Ma et al. 2012). Белок *ZCCT-A2* в гексаплоидной, тетраплоидной и диплоидной пшенице содержит в ССТ-домене фиксированную мутацию R16C (Yan et al. 2004b; Diallo et al. 2010;

Distelfeld et al. 2009; Ma et al. 2012). Наличие этих мутаций обуславливает снижение функциональной активности соответствующих ZCCT-белков. Белок ZCCT-D2 в мягкой пшенице вида *T. aestivum* имеет фиксированную мутацию в CCT-домене – R33Q (Ma et al. 2012), однако влияние этой мутации на функциональную активность белка не установлено. Таким образом, общее количество генов *ZCCT*, контролирующих потребность пшеницы в яровизации, значительно сокращается.

1.2.3. Аллельные варианты гена *VRN3*

Локус *VRN3* (ранее известный как *VRN5*, *VRN-B3* или *VRN-B4*) картирован в коротком плече хромосомы 7В (Yan et al. 2006). Установлено, что геном-кандидатом для локуса *VRN3* является RAF-киназный ингибитор, ортолог *FT* (*Flowering locus T*) локуса Арабидопсиса – ген *TaFT1* (Yan et al. 2006). Локус *FT* является типичным представителем флорогенов, продукты экспрессии которых, перемещаясь от листьев к апексу, индуцируют цветение (Corbesier et al. 2007; Turck et al. 2008; Li et al. 2008). В отличие от изученных в настоящее время локусов *FT* других видов растений, пшеничные и ячменные *FT* локусы содержат не четыре, а три экзона, что обусловлено слиянием третьего и четвертого экзонов (Bonnin et al. 2008).

Аллельное разнообразие гена *VRN3* выявлено только в В геноме (Yan et al. 2006; Chen et al. 2013). В настоящее время идентифицировано два доминантных и не менее двух вариантов рецессивного аллеля *VRN-B3*. Доминантный аллель *Vrn-B3a* содержит инсерцию ретротранспозона длиной ~ 5.3 кб в область промотора (Рисунок 1), где также присутствуют 6 ОНП и еще три ОНП в интроне-1 (Yan et al. 2006). В результате этих мутаций активация экспрессии *Vrn-B3a* происходит вне зависимости от действия условий яровизации. Кроме того, установлена прямая корреляция между уровнем экспрессии *VRN3* и временем колошения (Yan et al. 2006). Предполагается, что наличие мутаций в области промотора гена *TaFT*, обуславливающих аллельные различия по генотипу *VRN3*, ответственны за нарушение взаимодействия между регуляторными последовательностями *TaFT* и продуктами экспрессии гена *VRN2*, приводящее к потере контроля генами *ZCCT*

над регуляцией экспрессии локуса *TaFT* (Yan et al. 2006). Аллель *Vrn-B3c* также доминантный и отличается от аллеля *Vrn-B3a* наличием дополнительной делеции 20 п.н., предшествующей инсерции ретротранспозона в области промотора, а также делеции 4 п.н. в последовательности самого мобильного элемента (Chen et al. 2013). Уровень экспрессии аллеля *Vrn-B3c* несущественно ниже экспрессии аллеля *Vrn-B3a*, в связи с чем, предполагается, что дополнительные делеции (20 и 4 п.н.) не влияют (или оказывают незначительное влияние) на активность транскрипции доминантного аллеля *Vrn-B3c* по сравнению с аллелем *Vrn-B3a* (Chen et al. 2013). Рецессивный аллель *vrn-B3b* содержит инсерцию 890 п.н. в участок промотора, которая на 429 п.н. предшествует сайту инициации транскрипции (Chen et al. 2013). Данный аллель ассоциирован со значительным снижением уровня экспрессии по сравнению с интактным геном *VRN-B3* и более поздним колошением пшеницы. Derakhshan и соавторы (2013) в ходе ПЦР-анализа с парой праймеров FT-B-NOINS-F и FT-B-NOINS-R, которая используется для детекции рецессивного аллеля *vrn-B3*, наблюдали ампликоны нетипичного размера в 1300 и 2000 п.н. вместо маркерных фрагментов длиной 1140 п.н. Исходя из этого они предположили, что данные фрагменты идентифицируют новые аллели *VRN-B3*. Оба типа фрагментов (1300 и 2000 п.н.) выявлены как в яровых, так и в озимых сортах мягкой пшеницы, в связи с чем, предполагается, что данные аллели не подавляют чувствительность пшеницы к яровизации. Однако, вероятно, что ампликоны 2000 п.н. соответствуют ранее идентифицированному аллелю *vrn-B3b*, в котором, при использовании данной пары праймеров амплифицируются фрагменты такой же длины.

Гомологи локуса *TaFT* исследованы также в А и D геномах мягкой пшеницы – гены *VRN-A3* и *VRN-D3*, соответственно. Установлено, что влияние доминантного аллеля *Vrn-D3* на темп развития пшеницы от выхода в трубку до колошения в двое меньше, чем вклад гена *PPD-D1*, однако, в отличие от последнего, *VRN-D3* не влияет на процессы развития до выхода в трубку (Chen et al. 2010). Показано, что полиморфизм (отличия в количестве повторений динуклеотидного микросателлита в *VRN-A3* и поли-G мотива в *VRN-D3*) в кодирующих и некодирующих участках генов *TaFT* из А и D геномов (Рисунок 1), ассоциированы с изменением во времени колошения образцов, выращенных без предварительной яровизации (Bonnin et al. 2008). Всего обнаружено три полиморфизма в генах *VRN-A3* и *VRN-D3*

(детектировано в 239 сортах), которые ассоциированы с изменением темпа развития пшеницы (Bonnin et al. 2008). Однако, причины, которые обуславливают наблюдаемые различия, не установлены, поскольку не были исследованы участки промотора соответствующих генов. Кроме того, сами авторы подчеркивают, что полученные результаты ничего не доказывают, а обнаруженный полиморфизм хотя и ассоциирован с изменением темпа развития, однако он не дает представление о причинах этого изменения (Bonnin et al. 2008).

1.2.4. Ген *VRN4*

Локус *VRN4* (известный также как *VRN-D4*, *VRN-D5*) картирован в прицентромерном участке короткого плеча хромосомы 5D (Kato et al. 1993; Kato et al. 2003). Генетическое разнообразие по *VRN4* детектировано только в D геноме. Локализация *VRN4* в прицентромерном участке хромосомы и, как следствие, низкая частота рекомбинаций долгое время являлось одним из основных препятствий к позиционному клонированию и идентификации гена-кандидата. Однако в результате использования альтернативного подхода было показано, что данный локус является частью дупликации протяженного участка (около 290 кб) длинного плеча хромосомы 5A, на котором локализован ген *VRN-A1* (Kippes et al. 2015).

Образцы, моногенно-доминантные по *VRN-D4*, выколашиваются немного позже, чем носители самого сильного из доминантных аллелей *Vrn-A1a*. Однако, несмотря на то, что ген *VRN-D4* характеризуется высоким базальным уровнем транскрипции, в его первичной структуре не выявлен ни один из известных полиморфизмов, наблюдаемых в доминантных аллелях генов *VRN1*. Более того, только несколько ОНП различают *VRN-D4* и интактный, рецессивный аллель *vrn-A1*. Следовательно, нужно полагать, что существуют альтернативные механизмы, обуславливающие изменения в регуляции экспрессии гена *VRN-D4* и подавляющие потребность в яровизации для активации его транскрипции. Существует несколько предположений для объяснения данного явления (Kippes et al. 2015): (1) эффект положения (хромосомная локализация), (2) влияние ОНП A367C в кодирующей последовательности и (3) точечные мутации в регуляторном участке первого

интрона. Однако ни одна из этих гипотез до сих пор не получила достоверного подтверждения, как в прочем и опровержения.

В мягкой пшенице вида *T. aestivum*, доминантный аллель *Vrn-D4* (наличие дупликации участка 5AL->5DS) встречается крайне редко, хотя с высокой частотой наблюдается в сортах из Южной Азии, Индии и пограничных регионов (Iwaki et al. 2000; Iwaki et al. 2001; Kippes et al. 2015). Интродукция гена *VRN-D4* в западные сорта *T. aestivum* состоялась в конце 1960-х годов из австралийского сорта Gabo (Pugsley 1972), который, в свою очередь, получил его от индийского сорта Muzaffarnagar (O'Brien et al. 2001). Тем не менее, *VRN-D4* является аутентичным для вида *T. shaerococcum*, где был обнаружен впервые и наблюдается практически во всех яровых образцах (Stelmakh et al. 1996; Goncharov et al. 1999; Goncharov 2003; Kippes et al. 2015).

1.2.5. Эпистатическое взаимодействие между генами *VRN*

В результате анализа экспрессии генов *VRN2* было обнаружено, что снижение активности их транскрипции ассоциировано с увеличением содержания продуктов экспрессии генов *VRN1* (Yan et al. 2004b; Loukoianov et al. 2005; Dubcovsky et al. 2006). Исследование гена *VRN3* показало, что характер его экспрессии подобен характеру экспрессии *VRN1* и, в то же время, противоположен характеру экспрессии *VRN2* (Yan et al. 2006). Эти данные подтверждали ранее выдвинутое предположение о том, что гены *VRN1*, *VRN2* и *VRN3* являются элементами одной регуляторной системы и вовлечены в эпистатическое взаимодействие между собой (Tranquilli et al. 2000) (Рисунок 2).

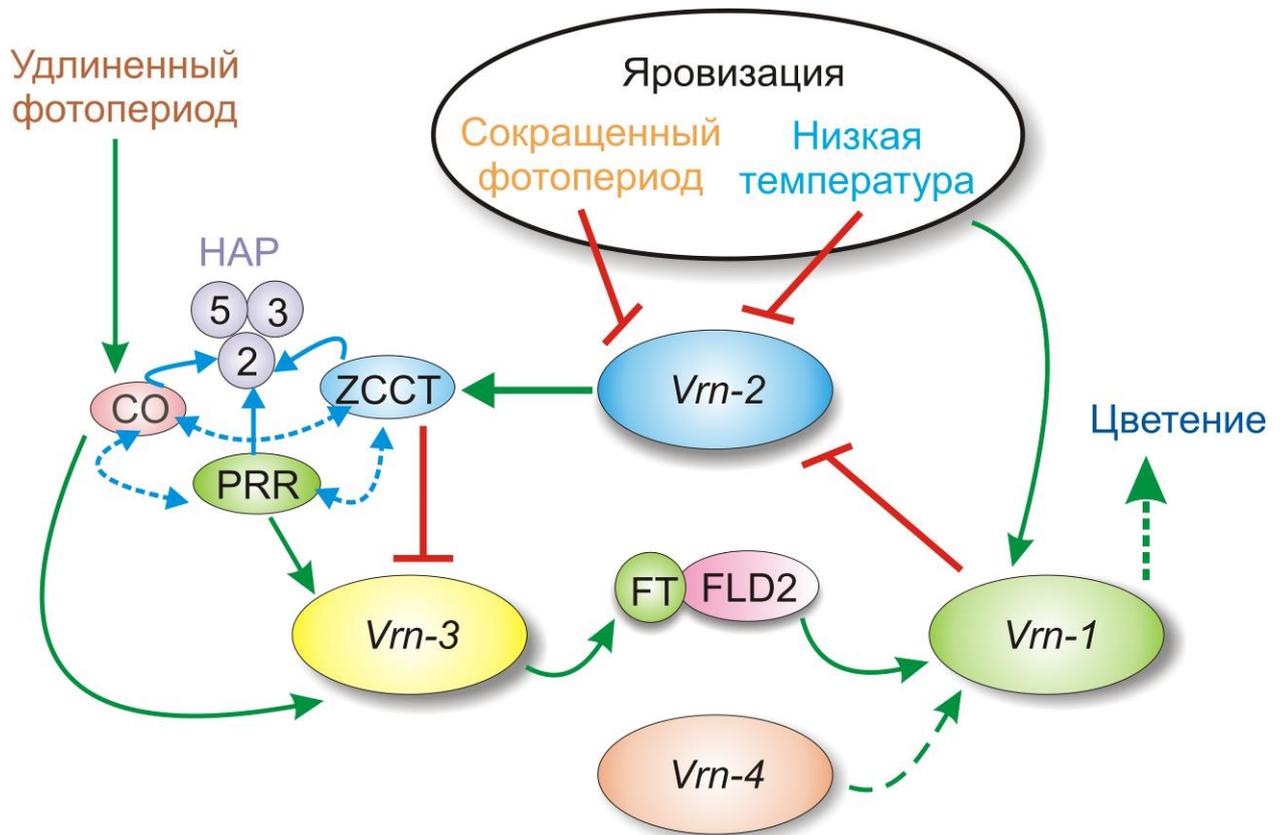


Рисунок 2. Обобщенная модель эпистатического взаимодействия между генами *VRN* и структура регуляторной петли с положительной обратной связью, обеспечивающая функционирование механизма регуляции развития пшеницы, потребность в яровизации и сроки колошения (Muterko et al. 2015a). Условия сокращённого фотопериода и действие низких температур во время яровизации подавляют активность транскрипции локуса *VRN2* (*ZCCT*), продукты экспрессии которого вступают в конкурентное взаимодействие с другими ССТ-домен-содержащими белками (в частности *PRR* (*PPD*) и *CO*) за связывание с *HAP* комплексом (*HAP3/2/5*), где они замещают субъединицу *HAP2*. Образовавшийся комплекс *HAP3-HAP5-ZCCT*, связываясь с регуляторной последовательностью в промоторе *VRN3* (*FT*), подавляет его экспрессию, тогда как комплекс *HAP* белков с *PRR* или *CO* наоборот - активирует. Продукты экспрессии гена *VRN3* при взаимодействии с белком *FLD2*, образуют комплекс, стимулирующий транскрипционную активность гена *VRN1*, который прямо или опосредованно, подавляет экспрессию *VRN2*. Таким образом, возникает регуляторная петля с положительной обратной связью. Ген *VRN4* является частью петли сформированной *VRN1/VRN2/VRN3*, где он выступает в качестве доминантного

аллеля гена *VRN-A1*, который запускает механизм перехода к генеративной стадии развития без предварительной яровизации.

Снижение активности транскрипции генов *VRN2*, наблюдаемое после активации экспрессии доминантных аллелей *VRN1* и предшествующее транскрипции рецессивных аллелей *vrn1*, не характерно для контрольных изогенных линий, рецессивных по всем гомеологичным генам *VRN1*. В связи с этим, предполагается, что продукты экспрессии генов *VRN1* принимают участие в подавлении транскрипции *VRN2* (Loukoianov et al. 2005; Li et al. 2008; Chen et al. 2012). Доминантные аллели *Vrn2* опосредствовано подавляют экспрессию рецессивных аллелей *vrn1* (Yan et al. 2004b; Trevaskis et al. 2007; Dubcovsky et al. 2008), которые непосредственно вовлечены в процесс инициации цветения. Так снижение активности транскрипции *VRN2* у трансгенных растений озимой пшеницы, обусловленное искусственной РНК-интерференцией, сопровождается активацией генов *VRN1* и сокращением периода яровизации вплоть до его полной ликвидации (Yan et al. 2004b). Таким образом, сочетание хотя бы одного доминантного аллеля *Vrn2* с рецессивной гомозиготой по *vrn1* определяет озимый генотип, который нуждается в яровизации (Tranquilli et al. 2000; Yan et al. 2003; Yan et al. 2004b). В ходе яровизации, транскрипция доминантных аллелей *VRN2* негативно регулируется действием низкой температуры и сокращенным фотопериодом (Yan et al. 2004b; Dubcovsky et al. 2006), что объясняет подавление экспрессии *VRN2* во время яровизации вне зависимости от наличия продуктов экспрессии *VRN1* у мутантных линий с делетированными гомеологическими генами *VRN1* (Chen et al. 2012).

У яровых линий, рецессивных по *vrn2*, аллельные различия по генам *VRN1* и *VRN3* не влияют на тип развития (Tranquilli et al. 2000; Dubcovsky et al. 2005). Поскольку доминантные аллели генов *VRN1* и *VRN3* снижают, или вообще устраняют влияние альтернативных аллелей *VRN2* на время колошения, предполагается, что наличие мутаций в регуляторных участках генов *VRN1* и *VRN3* является достаточным основанием для исключения влияния продуктов экспрессии *VRN2* в опосредствованной репрессии цветения (Yan et al. 2004b; Yan et al. 2006). В этой связи предполагается, что различия во влиянии мутаций в разных

регуляторных участках генов *VRN1* и *VRN3* на чувствительность к яровизации, ассоциировано с наличием функциональных продуктов экспрессии *VRN2* (Yan et al. 2006; Yan et al. 2004a; Fu et al. 2005). Исследование сдвига электрофоретической подвижности ДНК-белковых комплексов, а также эксперименты, связанные с иммуно-осаждением хроматина, установили, что между белками *VRN2* и регуляторными участками генов *VRN1* отсутствует непосредственное взаимодействие (Dubcovsky et al. 2008). Мутации в области промотора (в частности делеция 20 п.н. выше CArG-бокса) в доминантных аллелях *VRN1* только частично снижают, но не устраняют влияние продуктов экспрессии локуса *VRN2* на время колошения (Tranquilli et al. 2000). В связи с этим предполагается, что мутации в первом интроне доминантных аллелей *VRN1* оказывают более сильное влияние на устранение действия продуктов экспрессии *VRN2* на время колошения, чем мутации, локализованные в области промотора генов *VRN1* (Dubcovsky et al. 2008).

Преыдушие исследования не обнаружили непосредственного взаимодействия между белком *VRN3* и промотором генов *VRN1*. Однако установлено, что продукты экспрессии *VRN3* взаимодействуют с bZIP-доменом, который содержится в белках *FDL2* и *FDL6* (Li et al. 2008). При этом только белок *FDL2* способен связываться с регуляторными последовательностями (bZIP-связывающими сайтами), локализованными на участке промотора генов *VRN1* (Li et al. 2008). Активность транскрипционного фактора *FDL2* не зависит от аллельного состояния гена *VRN3*. Продукты экспрессии локуса *FDL2* в значительном количестве наблюдаются в апексе и в листьях, как на вегетативной, так и на репродуктивной стадии развития. Таким образом, белки *FDL2* присутствуют в нужной ткани и на нужной стадии развития, поэтому не лимитируют индукцию экспрессии генов *VRN1*. Следовательно, учитывая белок-белковые взаимодействия между *FDL2* и *VRN3*, а также взаимодействие комплекса *FDL2-VRN3* с промотором *VRN1* показано, что изменение активности транскрипции гена *VRN3* сопровождается параллельным изменением активности транскрипции гена *VRN1* (Li et al. 2008). Кроме локуса *TaFT* (*VRN3*) в геноме пшеницы присутствует также аналогичный ему (78 % гомологии) паралог – локус *TaFT2* (Yan et al. 2006). Однако в отличие от белков *TaFT1*, продукты экспрессии локуса *TaFT2* взаимодействуют с белком *FDL13*, который, в отличие от *FDL2* и

FDL6, принадлежит к другой филогенетической кладе FD-подобных белков, и не способен взаимодействовать с bZIP-связывающими сайтами, локализованными на участке промотора *VRN1* (Li et al. 2008).

Для гена *VRN3* отмечается роль интегратора молекулярно генетических механизмов, контролирующей чувствительность к яровизации и фотопериоду (Yan et al. 2006; Trevaskis et al. 2007). Установлено, что продукты экспрессии локуса *VRN2* принимают участие в регуляции экспрессии гена *VRN3*. На стадии пяти листов уровень транскрипции гена *VRN-B3* в 170 раз выше у образцов, которые содержат рецессивные (не функциональные) аллели *vrn2*, чем у образцов, доминантных по *VRN2*, что подтверждает негативное регуляторное влияние продуктов экспрессии локуса *VRN2* на *VRN3* (Yan et al. 2006). Установлено, что такое взаимодействие возможно благодаря наличию ССТ-домена в структуре белков *VRN2* (ZCCT). Показано, что ССТ-домен-содержащие участки белков *VRN2* и CO конкурентно взаимодействуют между собой при связывании с белками семейства NAR (NF-Y) (Рисунок 2), при этом мутации в ССТ-доме рецессивных аллелей *vrn2* снижают силу взаимодействия с белками NAR и подавляют способность *VRN2* конкурировать с белками CO, однако не устраняют ее (Li et al. 2011). Кроме взаимодействия с белками NAR, белки, содержащие ССТ-домен, в частности ZCCT и CO, также способны к самодимеризации (например, CO-CO) и взаимодействию между собой (Li et al. 2011). Показано, что наличие именно ССТ-домена является необходимым условием для такого взаимодействия. Впрочем, белок PPD-D1 (PRR-2D) не взаимодействует ни с ZCCT, ни с CO, что подтверждает специфичность ССТ-ССТ взаимодействий. Способность белков ZCCT к конкуренции с белками CO при связывании из NAR для последующего взаимодействия с промотором локуса *FT*, объясняет подавление индукции цветения у неярвизированных озимых растений при условии продолжительного фотопериода (Li et al. 2011), который активирует белки CO (Valverde et al. 2004), позитивно регулирующие локус *FT* (Putterill et al. 1995). Предполагается, что способность ССТ-домена взаимодействовать с NAR комплексом обеспечивает гибкость системы адаптации, контролирующей прохождение той или иной фазы индивидуального развития и, в частности, определяет время колошения в зависимости от условий окружающей среды, поскольку экспрессия многих ССТ-

домен-содержащих и НАР-подобных белков связана с чувствительностью к действию внешних абиотических стрессоров. Так, согласно вышеизложенному утверждению, взаимодействие между разными ССТ-домен-содержащими и НАР-подобными белками приводит к образованию большого количества разнообразных комплексов, которые различаются прочностью или специфичностью связывания, что, в свою очередь, может повлиять на активность транскрипции локуса *VRN3*, а, следовательно, и на экспрессию генов *VRN1*, и на время колошения (Distelfeld et al. 2009).

Предыдущие исследования установили, что доминантный аллель *Vrn-D4* ассоциирован с резким возрастанием активности экспрессии локусов *VRN1* и *VRN3* (*VRN-B3*) и в то же время с подавлением транскрипции локуса *VRN2* в листьях (Yoshida et al. 2010). При взаимодействии с доминантными аллелями генов *VRN1* и *VRN-B3* степень доминантности аллеля *Vrn-D4* составляет от 30.7% до 53.7%, что гораздо меньше, чем степень доминантности аллелей генов *VRN1*, которая составляет от 55.6 % до 96%, с наибольшим показателем у доминантного аллеля *Vrn-A1a*, вследствие чего наличие только одного аллеля *Vrn-A1a* полностью устраняет потребность в яровизации (Kippes et al. 2014). Следовательно, при наличии доминантных аллелей генов *VRN1*, доминантный аллель *Vrn-D4* оказывает незначительное влияние на сокращение периода до колошения, поскольку в этом случае его функция в листьях является избыточной (Kippes et al. 2014). Аналогично, когда присутствует доминантный аллель *Vrn-B3a*, высокая активность экспрессии локуса *TaFT1* подавляет транскрипцию генов *VRN2*, посредством стимуляции экспрессии *VRN1*, не зависимо от действия продуктов экспрессии гена *VRN-D4* (Kippes et al. 2014).

1.2.6. Регуляция процесса яровизации пшеницы

Обобщенная модель (Distelfeld et al. 2009; Trevaskis et al. 2007; Chen et al. 2012; Kippes et al. 2014), отображающая установленные к настоящему времени регуляторные механизмы чувствительности пшеницы к яровизации предполагает, что локус *VRN2*, продукты экспрессии которого негативно регулируют транскрипцию генов *VRN1* и *VRN3*, подавляется условиями яровизации (низкая

температура и сокращенный фотопериод) (Yan et al. 2004b; Dubcovsky et al. 2006; Trevaskis et al. 2006). Влияние длительности светового дня на активность транскрипции генов *VRN2* аналогично ее влиянию на локус *VRN3*, который позитивно регулирует гены *VRN1* (Yan et al. 2006; Dubcovsky et al. 2006). У яровизированных растений, выращенных на сокращенном фотопериоде, активность транскрипции генов *VRN1* значительно более высокая, чем у неяровизированных, для которых уровень транскрипции *VRN1* все же выше, чем если бы эти растения были бы выращены на продолжительном фотопериоде (поскольку последний активирует, а сокращенный, напротив, подавляет экспрессию локуса *VRN2*, который негативно регулирует *VRN3*) (Dubcovsky et al. 2006). В этой связи предполагается, что локус *VRN1* активируется условиями яровизации независимо от генов *VRN2* и *VRN3* (Dubcovsky et al. 2006; Trevaskis et al. 2007).

Следовательно, после прорастания ранней осенью, когда продолжительность светового дня все еще достаточно длинная, транскрипционная активность гена *VRN3* подавлена высокой концентрацией продуктов экспрессии локуса *VRN2*, вследствие чего снижена экспрессия *VRN1* (Yan et al. 2004b; Yan et al. 2006). Однако репрессия генов *VRN1* является неполной и продукты их экспрессии, хотя и в незначительном количестве, но все же присутствуют. Вторичный эффект от накопления продуктов экспрессии *VRN1* проявляется в подавлении экспрессии локуса *VRN2*, вследствие чего активируется ген *VRN3*, который, в свою очередь, активирует ген *VRN1* - регуляция с положительной обратной связью (Loukoianov et al. 2005; Trevaskis et al. 2006; Dubcovsky et al. 2006; Kane et al. 2007) (Рисунок 2). Изменение в активности транскрипции любого из генов регуляторной петли приводит к изменению в экспрессии двух других генов. Роль гена *VRN-D4* в функционировании регуляторной петли, в случае его наличия, аналогична присутствию доминантного аллеля гена *VRN-A1*. Так, у растений с озимым типом развития, которые не прошли яровизацию, регуляторная петля не активна. Экспрессия гена *VRN-D4* приводит к ее активации и обуславливает отсутствие потребности в яровизации.

При выращивании пшеницы на сокращенном фотопериоде все три локуса характеризуются низким уровнем экспрессии, однако при переходе на

продолжительный фотопериод экспрессия генов *VRN1* и *VRN3* резко повышается (Yan et al. 2006; Dubcovsky et al. 2006). Наличие белков *VRN1* совместно с действием низкой температуры и сокращенного фотопериода во время яровизации создают необходимые условия для подавления транскрипции генов *VRN2* (Yan et al. 2004b). Кроме того, долговременная экспозиция низкой температурой индуцирует резкое возрастание активности экспрессии генов *VRN1* у растений, которые прошли яровизацию (Alonso-Peral et al. 2011). После яровизации, вследствие снижения концентрации продуктов экспрессии генов *VRN2*, усиливается транскрипционная активность *VRN3*, что обусловлено его активацией продуктами экспрессии генов, вовлеченных в контроль чувствительности к фотопериоду, *PPD* и *CO* (Putterill et al. 1995; Beales et al. 2007). Продукты экспрессии гена *VRN3* из листьев транспортируются в апикальную меристему (Corbesier et al. 2007) где индуцируют транскрипцию генов *VRN1*, а также их паралога *FUL2* и *FUL3*, инициируя, тем самым, переход к генеративной фазе развития (Yan et al. 2006; Chen et al. 2012). Несмотря на то, что продолжительный фотопериод положительно регулирует *VRN2*, индуцированные яровизацией гены *VRN1* подавляют экспрессию этого локуса. Предполагается, что экспрессия генов *VRN1* в листьях важна для поддержания подавленного состояния локуса *VRN2* в озимых растениях после яровизации (Chen et al. 2012). Таким образом, яровизированные растения в условиях продолжительного фотопериода характеризуются низким уровнем экспрессии локуса *VRN2* и высоким уровнем экспрессии генов *VRN1* и *VRN3*, что сопровождается переходом к генеративной стадии развития. В противоположность этому, не яровизированные озимые растения, отличаются высокой активностью экспрессии локуса *VRN2* с одновременно низким уровнем экспрессии генов *VRN1* и *VRN3*, что обуславливает подавление цветения при отсутствии яровизации.

Таким образом, потребность пшеницы в яровизации можно рассматривать, как адаптивный механизм, который обеспечивает задержку перехода к репродуктивной стадии развития в зимний период, защищая, тем самым, чувствительную апикальную меристему от действия неблагоприятных условий. Одним из ключевых элементов этого механизма является локус *VRN2*. Условия яровизации направлены на подавление экспрессии *VRN2*, являющееся

необходимым для последующего перехода к репродуктивной стадии развития и активацию генов *VRN1*, которые, кроме индукции флорального морфогенеза, исполняют роль постоянного репрессора локуса *VRN2* после прохождения яровизации и до конца вегетации.

Инициация времени колошения пшеницы определяется тонким балансом между подавляющими и активирующими силами, которые влияют на регуляторные участки гена *VRN1*. При этом центральную роль играет ген *VRN3*, регуляция активности которого осуществляется в процессе конкурентного взаимодействия, в частности между продуктами экспрессии генов *VRN2*, *PPD1* и *CO*. Интеграционная роль гена *VRN3* проявляется в объединении механизмов контроля чувствительности к фотопериоду и яровизации, которая реализована через конкурентное взаимодействие между ССТ-домен содержащими белками, экспрессия которых осуществляется с генов, чувствительных к разного рода биотическим и абиотическим стрессорам. В результате образуется гибкая комбинаторная система, которая объединяет чувствительность к внутренним и внешним сигналам и формирует наиболее эффективную модель регуляции времени колошения в зависимости от условий окружающей среды, а также способности организма развиваться в этих условиях.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Генетический материал

Анализ полиморфизма генов *VRN* и *PPD1* проведен в генетическом материале шести видов гексаплоидной и шести видов тетраплоидной пшеницы. Для оценки географического распространения альтернативных аллельных вариантов исследуемых генов и анализа возможной ассоциации их комбинаций с адаптивным преимуществом на определенной местности, образцы каждого вида полиплоидной пшеницы выбирались случайным образом из различных эколого-географических регионов (стран).

Виды гексаплоидной пшеницы (геномный состав BBA^uA^uDD) были представлены: *T. aestivum* L., *T. spelta* L., *T. macha* Deкар, *T. vavilovii* Jakubz, *T. compactum* Host и *T. sphaerococcum* Percival.

Выборка тетраплоидной пшеницы (геномный состав BBA^uA^u) включала виды: *T. durum* Desf., *T. turgidum* L., *T. polonicum* L. и *T. carthlicum* Nevski, *T. dicoccum* Schrank и *T. dicoccoides* Körn.

Проанализированы местные сорта озимой мягкой пшеницы вида *T. aestivum*, а также образцы, полученные из Национальной системы зародышевой плазмы растений (National Plant Germplasm System (NPGS), <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs>), ИПК Gatersleben (https://gbis.ipk-gatersleben.de/GBIS_I/home.jsf), Селекционно-генетического института - Национального центра семеноведения и сортоизучения НААН Украины, а также Национального центра генетических ресурсов растений Украины (yuriev1908@gmail.com).

2.2. Вегетация

Вегетация экспериментальных растений осуществлялась в тепличных условиях на удлиненном (16-24 ч) и укороченном (9 ч) фотопериоде при естественном и искусственном освещении и без яровизации. Оценка времени

колошения и генотипирование с использованием ДНК-маркеров проводилось индивидуально для каждого образца. Растения, которые не вышли в трубку к концу эксперимента (120 дней) были охарактеризованы как озимые.

2.3. Экстракция ДНК и амплификация

Тотальная ДНК экстрагирована из 4 дневных проростков с применением лизирующего буфера на основе цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ) (модификация Doyle et al. 1987). Оптимизированный лизис-буфер содержит 3 % ЦТАБ, 1.7 М NaCl, 30 мМ ЭДТА-Na₂, 100 мМ Трис. Депротенизация хлороформом (1 объем). Осаждение ДНК 96 % этанолом (1.5 объема). Генетический материал получен из 2-10 индивидуальных растений каждого образца.

Полимеразно-цепная реакция (ПЦР) проводилась в 6 мкл реакционной смеси, содержащей: ДНК (~ 60 нг), 20 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 10 мМ (NH₂)₂SO₄, 2.5 мМ MgCl₂, 1 мМ KCl, 0.1 % Triton X-100, 250 мкМ dNTPs, 1.5 % ДМСО, 3 нг/мкл каждого праймера, 0.05 Е/мкл Taq полимеразы. Для предотвращения испарения реакционной смеси в каждую пробирку было добавлено 10 мкл парафинового масла. Термоциклирование осуществлялось по следующей программе: начальная денатурация при 94 °С (2 мин); 30-36 циклов амплификации: 94 °С (10 с), отжиг (10 с), элонгация при 74 °С (50 с или 2 мин для амплификации участка промотора гена *VRN-B3* и первого интрона *VRN-B1*). В ряде случаев, в качестве оптимизации, дополнительно вводились 3 цикла (опционально): 94 °С (10 с), 74 °С (40 с). Финальная элонгация 72 °С (5 мин). Первичная структура и температура отжига праймеров приведены в Приложении 1.

2.4. Электрофорез в полиакриламидных и агарозных гелях

Продукты амплификации первого интрона генов *VRN1* и *VRN-B3*, участка промотора генов *PPD-A1*, *VRN-D1* и *VRN-B3*, а также варианты аллеля *Vrn-A1a* разделены в 6.6 - 8 % неденатурирующих полиакриламидных гелях (соотношение

моно/бис-акриламида 82:1) в 1.38x ТБЭ буфере (ионная сила 123 мМ) при комнатной температуре, напряженности поля 6 В/см.

Для детекции аллельных вариантов генов *VRN-A1* и *VRN-B1* (разделение фрагментов ПЦР области промотора) было проведено исследование влияния различных факторов и условий электрофореза на изменение скорости миграции искривленных молекул ДНК (Приложение 2). Согласно полученным результатам, выполнена оптимизация условий проведения ПАГЭ при низкой (10-20 °С) и комнатной температуре с получением минимальных потерь в разрешающей способности разделения фрагментов. Так, электрофорез в 6.6% неденатурирующих ПААГ (соотношение моно/бис-акриламида 82:1) при низкой напряженности электрического поля (2.5 В/см) и высокой ионной силе (123 мМ, 1.38x ТБЭ в геле) осуществлялся при комнатной температуре, тогда как наилучшие результаты за минимальное время были получены при запуске электрофореза при низкой температуре (10-20 °С) и высокой напряженности электрического поля (5-10 В/см).

В ходе анализа полиморфизма экзона-4 и экзона-7 гена *VRN-A1*, электрофорез продуктов амплификации проведен в неденатурирующих ПААГ в оптимизированных условиях, усиливающих аномально медленную миграцию искривленных молекул ДНК (6.6-8% акриламида (соотношение моно/бисакриламид, 82:1), 1.38x ТБЭ буфер (ионная сила 123 мМ) при напряженности электрического поля 5-10 В/см и температуре 10-14°С).

Агарозный гель-электрофорез выполнен с использованием 1.5% агарозных гелей в 1x ТБЭ буфере.

Оптимизированный 3x буфер для внесения проб в ПААГ содержит формамид и фикол в соотношении 80:20 с добавлением 20 мМ ЭДТА (опционально), и ксиленцианола (0.01%).

Электрофорез в ПААГ проводился в течение времени, за которое целевые фрагменты мигрировали 60-70 % длины геля. Визуализация фрагментов ПЦР в полиакриламидных и агарозных гелях проведена путем их окрашивания в спиртовом (10% этанол) и водном растворах бромида этидия (0.5 мкг/мл), соответственно. Документирование осуществлялось при помощи системы "Gel Doc XR" (Bio-Rad Laboratories). В ряде случаев, окрашивание ПААГ проведено с использованием 0.15 % водного раствора AgNO_3 (Budowle et al. 1991).

2.5. Гетеродуплексный анализ

Для проведения быстрого скрининга крупных выборок генетического материала с целью идентификации гаплотипа и гаплогруппы гена *PPD-A1* был оптимизирован гетеродуплексный анализ (Muterko et al. 2015c). Гибридизация ампликонов исследуемых образцов проводилась с тремя референсными последовательностями, детектирующими гаплотипы Нар-1 (гаплогруппа АII, KF834265), Нар-3 (АII, KF834262) и Нар-4 (АI, KF758437). Выбор данных гаплотипов в качестве референсных обусловлен их высокой частотой встречаемости в гаплогруппах АI (Нар-4) и АII (Нар-1, Нар-3). Гетеродуплексный анализ выполнен согласно ранее предложенной методике (Delwart et al. 1993). Гетеродуплексы были сформированы в смеси, содержащей 1 мкл продуктов ПЦР каждого образца и 0.2 мкл 10x буфера для гибридизации (1 М NaCl, 20 мМ EDTA). Для предотвращения испарения смеси в каждую пробирку было добавлено по 10 мкл парафинового масла. Образцы центрифугированы при 14000 обр/мин в течении 1 минуты, денатурированы при 97 °С (3 мин) и тотчас же охлаждены до 10 °С. Электрофорез гетеродуплексов проведен в 6.5 % неденатурирующих ПААГ при напряженности электрического поля 3-5 В/см, в 1x ТБЭ буфере.

2.6. Клонирование и секвенирование фрагментов ПЦР

Продукты амплификации были разделены в 1.5 % агарозном геле, выделены из геля с помощью GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) и лигированы в вектор pGEM-T (Promega) в соответствии с инструкцией. Плазмидная ДНК трансформирована в компетентные клетки JM109 *Escherichia coli* (L2001, Promega). Трансформированные клетки, содержащие плазмиду с инсерцией чужеродного фрагмента ДНК детектированы в ходе "сине-белой" селекции на питательной среде, содержащей ампициллин, X-Gal, и IPTG. Позитивные клоны тестированы на присутствие клонируемого фрагмента с помощью ПЦР с универсальными праймерами pUC (прямой и обратный праймеры M13) с последующим разделением и визуализацией в агарозном геле. Плазмидная ДНК экстрагирована с помощью GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific).

В случаях, когда клонирование не требовалось, продукты ПЦР осаждались этанолом в присутствии линейного акриламида (15 мкг) в качестве носителя. При наличии в амплификате нескольких целевых фрагментов, нужные ампликоны были вырезаны из агарозных и полиакриламидных гелей, и очищены на спин-колонках с silica-мембраной. Секвенирующая ПЦР проведена с помощью "BigDye Terminator v3.1 sequencing kit". Флюоресцентно-меченые продукты элонгации были осаждены и ресуспендированны в формамиде. Капиллярный электрофорез проведен на ABI 3130xl Genetic Analyzer и ABI3700 PRISM DNA Analyser (Applied Biosystems) в ЦКП «Геномика» СО РАН.

Нуклеотидные последовательности секвенированных участков промотора генов *VRN1*, *VRN-B3* и *PPD-A1*, первого интрона гена *VRN-D1*, а также последовательности участка экзон-3 – экзон-7 гена *VRN-A1* депонированы в GenBank с идентификаторами доступа: KF758437 (Нар-4), KF834261, KF834265, KF834266 (Нар-1), KF834262 (Нар-3), KF834264 (Нар-12), KF834263 (Нар13), KJ767781 (*Ppd-A1a.2*), KJ767779, KJ767780 (*Ppd-A1a.4*), KR782255 (*Vrn-A1a.2*), KM016789 (*vrn-A^m1*), KM016790-KM016792 (*Vrn-A1i*), KT361213 (*Vrn-A1e*), KM047646 (*Vrn-A1b.1*), KM047641-KM047645 (*Vrn-A1b.2*), KM047647-KM047650 (*vrn-A1b.3*), KM047651 (*vrn-A1b.4*), KM047652 (*Vrn-A1b.5*), KT692944-KT692945 (*Vrn-A1b.6*), KR782252 (*VRN-B1.s*), KT361212 (*VRN-B1.m*), KR782253-KR782254 (*VRN-B1.f*), KF939526-KF939529 (область промотора *VRN-D1*), KX874608 (*Vrn-A1k*), KU738894 (*Vrn-A1j*), KU738895 (Kharkovskaya 1; *vrn-A1b.3*), KX139167 (GK Basa; *Vrn-A1i*), KX139174 (Bashkirskaya 27; *Vrn-A1a.1*), KX268729 (Zenati 368; *Vrn-A1b.1*), KX139169–KX139170 (Marzaga, Lavina; *Vrn-A1b.6*), KX139168 (Hordeiforme 18567-6; *VRN-B1.m*), KX139171 (Elizavetinskaya; *Vrn-B3a*), KX139173 (Donskaya Elegiya; *Vrn-B1c*), KX139172 (Kargala 28; *Vrn-A1c (Langdon)*), KF800714 (*Vrn-D1s*), KU844092 (Ex4C), KU844091 (Ex4T), KT983448 (Ex4C), KT983449 (Ex4C.f), KU844093 (Ex4C), KX874600 (Ex4C.sph), KX874601 (Ex4T), KX874602 (Ex4C.m), KX874603 (Ex4C.s), KX874604 (Ex4C.s), KX874605 (Ex4C.f), KX874606 (Ex4C.f), KX874607 (Ex4T).

2.7. Анализ данных

2.7.1. Построение, анализ кривизны и гибкости трехмерной модели спирали ДНК молекулы

Для исследования распределения кривизны и выявления локальных изгибов, предполагаемая форма молекул ДНК была рассчитана из нуклеотидных последовательностей, основываясь на конформационных параметрах двойной спирали, извлеченных из находящихся в открытом доступе трехмерных структур (PDB ID: 1RVI, 1RVH, 1FZX, 1G14, 1AXP, 2L8Q, 2M2C, 2MCI, 1DK9, 2K0V, 1NEV, 1LAI) с использованием Curves+ (Lavery et al. 2009). Каждый конформер представлен от 5 до 10 низкоэнергетическими структурами. Для избегания ошибок, связанных с "концевым эффектом", учитывались только центральные пары оснований. Параметры динуклетидных шагов были усреднены в тетрануклеотидном контексте, где это было возможно. Во всех других случаях использовались усредненные параметры динуклеотидных шагов полученные из той же выборки структур. Для построения трехмерной модели контура молекулы ДНК по заданным параметрам динуклеотидных шагов, использован алгоритм, базирующийся на алгебре кватернионов (Приложение 3). Трехмерные модели спирали ДНК визуализированы с использованием PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.2 (Schrödinger, LLC).

Распределение кривизны в молекуле ДНК анализировалось в скользящем окне размером 40 п.н. и шагом 1 п.н. В качестве кривизны молекулы в позиции $i+1$ ($1 < i < n$) было принято значение, обратное радиусу описанной окружности треугольника, вершины которого лежат на оси спирали с координатами $i-20$, i , $i+20$ п.н. Кривизна оценивалась в единицах кривизны ДНК молекулы, где в качестве единицы принята средняя кривизна ДНК в кристаллизованном нуклеосомном коре ($1/42.8 \text{ \AA}$). Локальные углы изгибы в каждой i -й позиции измерены как углы между касательными к контуру молекулы ДНК проведенные из позиции $i-2$ к i и из i к $i+2$.

Распределение гибкости в молекуле ДНК оценивалось из последовательности нуклеотидов, основываясь на ранее опубликованных параметрах ди- и тетрануклеотидных шагов (Olson et al. 1998; Packer et al. 2000).

2.7.2. Анализ нуклеотидных последовательностей из баз данных

Для проведения *in silico* ПЦР программный доступ к ресурсам сервера NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), включая инструмент NCBI BLAST (Zhang et al. 2000) и базы данных нуклеотидных последовательностей, осуществлялся через интерфейс прикладного программирования REST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/staff/tao/URLAPI/new/BLAST_URLAPI.html).

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проведено с использованием программы Clustal W (Thompson et al. 1994). База данных ESTs *T. aestivum* (UniGene Build #63), содержащая 1551792 последовательностей в 178464 кластерах, загружена на локальный носитель из NCBI (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/UniGene/Triticum_aestivum/Ta.seq.all.gz). Поиск гомологичных последовательностей в локальной базе данных выполнен с помощью программы BLASTn (пакет программ BLAST+, Camacho et al. 2009). Предполагаемая вторичная структура РНК предсказана с использованием веб-сервиса RNAstructure (Reuter et al. 2010).

2.7.3. Кластерный анализ

Для проведения кластерного анализа сортов *T. durum* в соответствии с аллельным составом генов *VRN*, разработан алгоритм управляемой иерархической кластеризации объектов с категориальными характеристиками, основанный на агломеративном методе последовательной кластеризации (impleментирован в Muterko et al. 2016b, основные положения изложены в Приложении 4). Визуализация результирующей кладограммы, рассчитанной в ходе кластерного анализа, проведена в программе Dendroscope 2.5 (Huson et al. 2007).

2.7.4. Филогенетический анализ

Для исследования филогенетических взаимоотношений между гаплотипами, определения гаплогрупп, а также порядка (очередности) дивергенции мутаций и их комбинаций в ходе эволюции, разработан алгоритм, базирующийся на символьно-ориентированной эволюционной реконструкции (имплементирован в Muterko et al. 2015c). В случае выведения внутривидовой филогении, биаллельных сегрегирующих позиций и при наличии насыщенной гаплотипами исходной выборки, вычисление ассоциативных связей может быть реализовано путем обычной итерации комбинаций аллелей и анализа частот их встречаемости (использовано в филогенетическом анализе гаплотипов *PPD-A1* и *PPD-B1*). Когда полиморфные позиции расщеплялись более чем на два аллеля (при анализе гаплотипов *VRN-A1*), был применен алгоритм циклической итерации с исключением аллелей с установленной зависимостью и пересчетом частот, восстанавливающей потерю ассоциации при дивергенции альтернативных аллельных вариантов из одной сегрегирующей позиции в одной филогенетической линии. Более подробное описание алгоритма расчета иерархической структуры межаллельных ассоциаций, выведение филогенетических взаимоотношений между гаплотипами, определение гаплотипов первичной дивергенции, гаплогрупп и предполагаемого корня содержится в Приложении 5. Визуализация графов полученных в ходе филогенетического анализа основанного на межаллельных ассоциациях проведена в программе Dendroscope 2.5 (Huson et al. 2007).

Построение квазимедианной филогенетической сети гаплотипов согласно алгоритму MJ (Median-Joining, Bandelt et al. 1999) и ее оптимизация методом максимального правдоподобия MP (Maximum Parsimony, Polzin et al. 2003) осуществлялась в программе Network 4.6.1.1 (<http://fluxus-engineering.com>).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

3.1.1. Идентификация гаплотипов гена *PPD-A1*

Методом ПЦР-анализа с применением пары праймеров durum_Ag5del_F2 - durum_Ag5del_R2 был исследован участок промотора гена *PPD-A1* (-470 - -19 п.н.) в 206 образцах шести видов гексаплоидной и шести видов тетраплоидной пшеницы из 57 стран (Приложение 6). В результате электрофореза продуктов амплификации в ПААГ обнаружена разница в скорости миграции фрагментов, детектирующих рецессивный аллель *Ppd-A1b* (ожидаемый размер маркерного фрагмента 452 п.н.) (Рисунок 3.А). При этом данное различие не наблюдалось при электрофорезе в агарозных гелях. Фракция медленно мигрирующих фрагментов ПЦР (обозначены как 452s) составляла 66% от общего количества образцов, соответственно оставшиеся 34%, приходились на фрагменты, характеризующиеся более высокой подвижностью в ПААГ (452f).

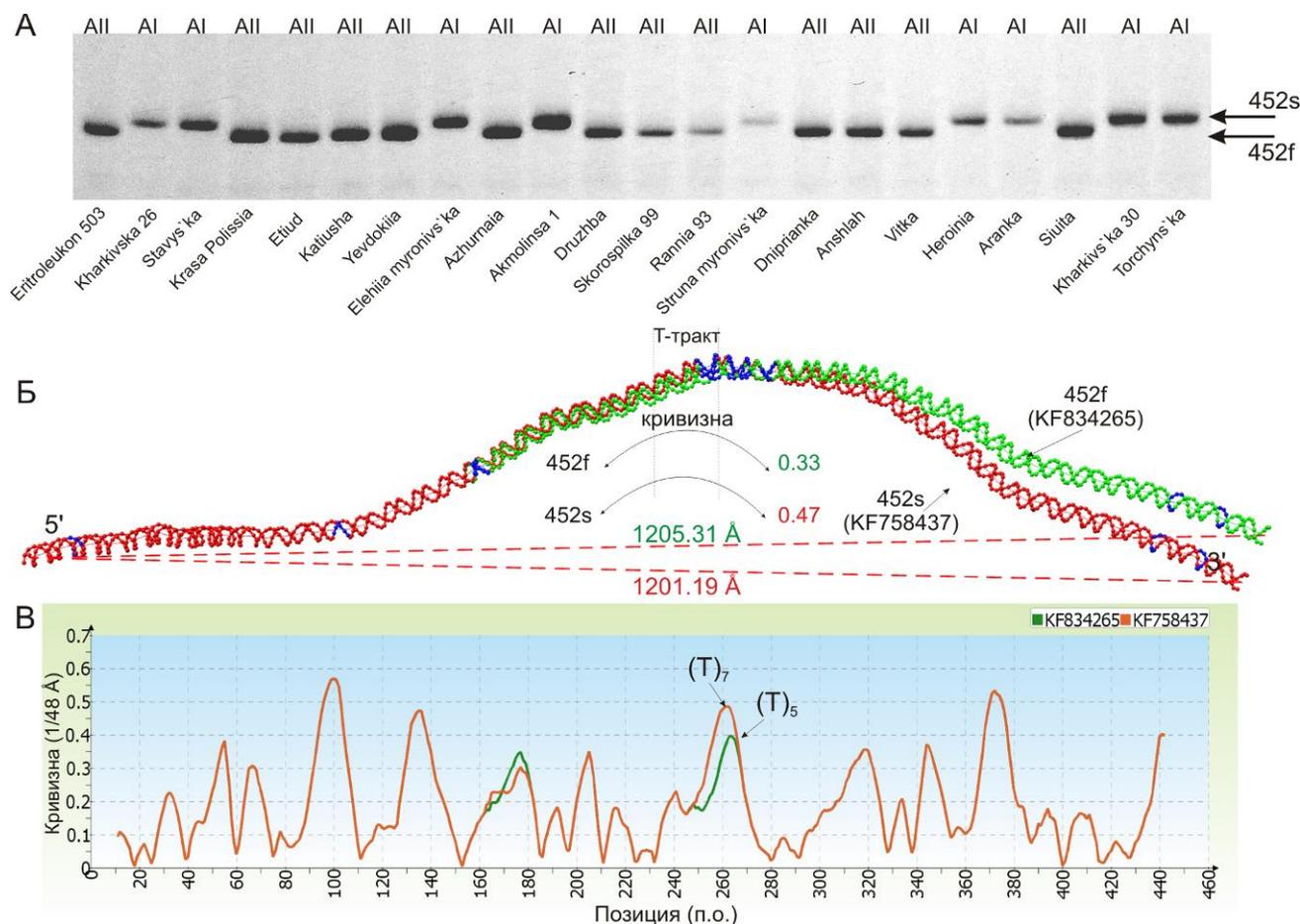


Рисунок 3. Анализ полиморфизма области промотора гена *PPD-A1*. (А) Полиморфизм участка промотора рецессивного аллеля *Ppd-A1b* и дискриминация гаплогрупп в сортах мягкой пшеницы *T. aestivum*. Изменение подвижности фрагментов ПЦР в ПААГ, обусловленное полиморфизмом Т-тракта, различает образцы с гаплогруппой АI (медленно мигрирующие ампликоны длиной 452 п.н., 452s) и АII (быстро мигрирующие ампликоны длиной 452 п.н., 452f). (Б) Суперпозиция прогнозируемых трехмерных моделей молекулы ДНК полиморфных фрагментов (452s и 452f). Значения кривизны рассчитаны в позиции 260 п.н. (В) Распределение кривизны молекул ДНК в скользящем окне 20 п.н. Обозначено снижение кривизны в положении 260 п.н., в центре Т-тракта.

Часть фрагментов, различающихся по скорости миграции через полиакриламидный гель, была клонирована и секвенирована (GB: KF758437, KF834261, KF834262, KF834265, KF834266). В результате анализа первичной структуры полиморфных ампликонов не выявлено мутаций типа инсерция/делеция, которые могли бы объяснить наблюдаемое различие в подвижности этих фрагментов в геле. Однако идентифицировано 2 ОНП, один из которых локализован в последовательности аденинового тракта (А-тракт, Т-тракт, A_nT_m , $n+m \geq 4$).

Известно, что искривленные молекулы ДНК мигрируют через ПАА гель медленнее, чем не искривленные такой же длины (Marini et al. 1982; Stellwagen 1983; Diekmann 1992). Как правило, аномально медленная электрофоретическая подвижность ассоциирована с увеличением кривизны молекул ДНК, обусловленной наличием изгибов в районах локализации А-трактов (Koo et al. 1986; Nagerman 1990). Для исследования возможного влияния идентифицированных ОНП на форму молекулы ДНК были рассчитаны трехмерные структуры фрагментов ДНК, соответствующие полиморфным ампликонам. В результате анализа распределения кривизны и локальных углов изгиба молекул ДНК было показано, что все фрагменты 452f характеризуются предсказываемым снижением кривизны, обусловленным транзицией Т->С в структуре тиминового тракта (Т-тракт=(Т)₇), который локализован вблизи центра молекулы (Рисунок 3.Б, В). Данная мутация приводит к разрыву Т-тракта и укорочению его длины до пяти пар нуклеотидов (Т-

тракт=(T)₅), что сопровождается выпрямлением ДНК молекулы и увеличением ее подвижности при электрофорезе в ПААГ.

Данный участок гена *PPD-A1* был исследован методом *in silico* ПЦР с использованием праймеров durum_Ag5del_F2/durum_Ag5del_R2 и последовательностей из базы данных GenBank (Приложение 7). В результате анализа *in silico* ампликонов идентифицированы фрагменты длиной 452 п.н. (230 образцов), 453 п.н. (9 образцов) и 456 п.н. (9 образцов). Фрагменты размером 456 п.н. детектированы исключительно в образцах диплоидной пшеницы вида *T. monosocum*, тогда как ампликоны размером 453 п.н. были представлены преимущественно в образцах *T. timopheevii*, а также в одном образце *T. dicoccoides*. В результате множественного выравнивания 240 нуклеотидных последовательностей фрагментов длиной 452 п.н. идентифицировано 13 ОНП, которые образовывали 13 различных комбинаций. Данные комбинации были приняты в качестве индивидуальных гаплотипов, а соответствующие ОНП в качестве отдельных аллелей (Таблица 1).

Таблица 1. Гаплотипы *Ppd-A1b*, сформированные основываясь на первичной структуре участка промотора длиной 452 п.н., амплифицируемого в ходе ПЦР с парой праймеров durum_Ag5del_F2 - durum_Ag5del_R2 в различных видах пшеницы.

Гаплотип	Позиция в ампликоне (п.н.)												
	21	54	60	130	149	172	180	254	258	315	317	329	341
Нар-1	T	C	T	C	C	C	G	G	C	G	C	C	C
Нар-2	T	C	T	T	C	C	G	G	T	G	C	C	C
Нар-3	T	C	T	C	C	C	G	C	C	G	T	C	C
Нар-4	T	C	T	C	C	G	G	G	T	G	C	C	C
Нар-5	T	C	T	C	C	C	G	G	T	C	C	C	C
Нар-6	T	C	T	C	C	C	G	G	C	G	T	C	C
Нар-7	T	C	T	C	C	C	G	G	T	G	C	C	C
Нар-8	T	C	C	C	C	C	G	G	T	G	C	C	C
Нар-9	T	C	C	C	T	C	G	G	T	G	C	C	C
Нар-10	T	T	C	C	C	C	G	G	T	G	C	C	C
Нар-11	C	C	T	T	C	C	G	G	T	G	C	C	C
Нар-12	T	C	T	C	C	C	C	G	C	G	C	C	C
Нар-13	T	C	T	C	C	C	G	G	C	G	C	A	T

3.1.2. Филогения гаплотипов *Ppd-A1b*

Для исследования филогенетических отношений между гаплотипами *Ppd-A1b* и определения гаплогрупп были использованы 2 подхода: (1) алгоритм, основанный на межаллельных ассоциациях (МА), позволяющий получить укорененную, направленную филогенетическую сеть (дерево) (Рисунок 4.А,Б) (2) неукорененная квазимедианная MJ сеть, оптимизированная методом МР (Рисунок 4.В).

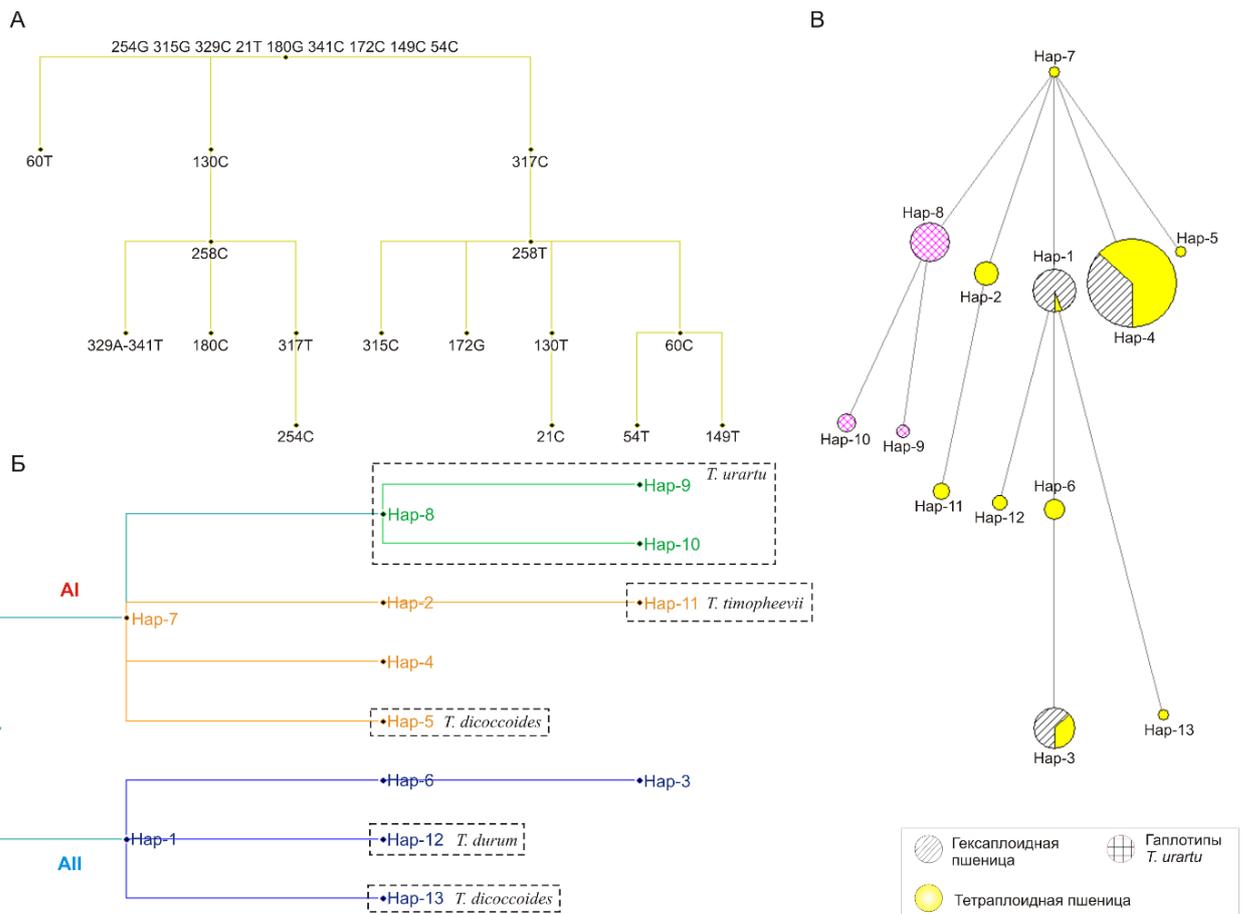


Рисунок 4. Межаллельные ассоциации и филогенетические взаимоотношения между гаплотипами *Ppd-A1b* (Muterko et al. 2015c). (А) Иерархия межаллельных ассоциаций. (Б) Предполагаемый порядок дивергенции гаплотипов. Обозначены видоспецифические гаплотипы. (В) Квазимедианная сеть гаплотипов. Размеры узлов пропорциональны числу образцов, несущих соответствующий гаплотип.

Обе сети имели идентичную топологию. Однако сеть MJ неукорененная и отображает только структуру взаимосвязей между гаплотипами основанную на дистанциях между ними. В отличие от последней, филогенетическая сеть МА

базируется на иерархии межаллельных ассоциаций, следовательно, является направленной (от корня к листьям) и позволяет установить порядок дивергенции гаплотипов в ходе эволюции.

Из результатов филогенетического анализа методом МА следует, что гаплотипы Нар-7 и Нар-1 являются гаплотипами первичной дивергенции (предковыми гаплотипами) лежащими в основании филогенетических линий, в которых дивергируют гаплотипы из гаплогруппы АI и АII, соответственно (Рисунок 4.Б). Гаплотипы Нар-7 и Нар-1 различаются по одному нуклеотиду, локализованному в позиции 258 п.н. от начала ампликона (258Т/258С). Предполагается, что гаплотип Нар-7 произошел эволюционно раньше, чем гаплотип Нар-1 и является предковым гаплотипом (корнем), поскольку филогенетическая линия Нар-7 содержит больше производных гаплотипов, чем Нар-1. Кроме того, гаплотипы гаплогруппы АI более широко представлены в различных видах пшеницы. Наконец, все гаплотипы идентифицированные в диплоидной пшенице, принадлежат к гаплогруппе АI, которая также преобладает в тетраплоидных видах. Также вероятно, что Нар-7 является предковым (исходным) гаплотипом для полиплоидной пшеницы, тогда как гаплотипы Нар-8, Нар-9 и Нар-10, выявленные в образцах *T. urartu*, содержат специфический аллель 60С и формируют отдельный кластер.

Согласно данным филогенетического анализа, наиболее позднее происхождение имеют гаплотипы Нар-4, Нар-5, Нар-9, Нар-10, Нар-11 из гаплогруппы АI и гаплотипы Нар-3, Нар-12 и Нар-13 из гаплогруппы АII. При этом гаплотипы Нар-4 и Нар-3 характеризуются наибольшим распространением в гаплогруппах АI и АII, соответственно. Гаплотип Нар-8 возник эволюционно позже, чем Нар-9 или Нар-10 и, вероятно, является основателем группы гаплотипов, идентифицированных в *T. urartu*.

3.1.3. Видовое и географическое распространение гаплотипов *Ppd-A1b*

Для быстрого скрининга образцов полиплоидной пшеницы с целью идентификации гаплотипа *Ppd-A1b* был оптимизирован ПЦР-гетеродуплексный анализ (Рисунок 5), в процессе которого проводилась гибридизация фрагментов ПЦР исследуемых образцов с ампликонами ранее секвенированных референсных

последовательностей. Использование данного подхода значительно повысило информативность ПЦР-анализа, поскольку стало возможным не только определение гаплогруппы *Ppd-Alb*, но также и регистрация расщепления каждой гаплогруппы на гаплотипы. В результате, возросло количество кодоминантных ДНК-маркеров, несущих информацию о полиморфизме анализируемого участка генома, которые можно детектировать в ходе одной реакции.

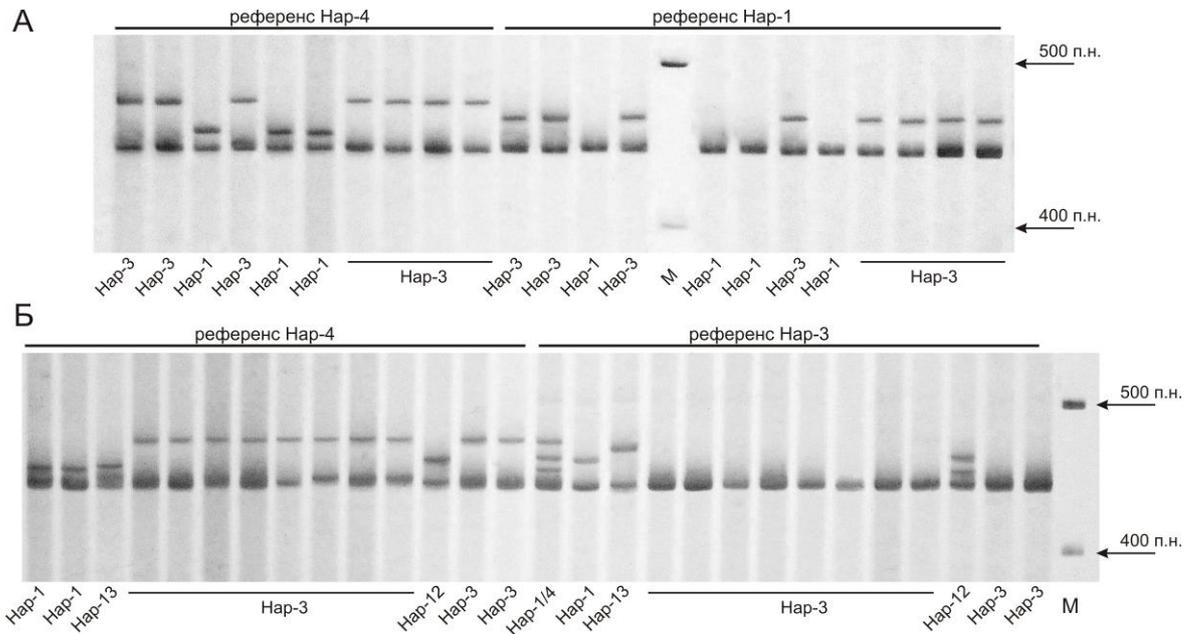


Рисунок 5. ПЦР-гетеродуплексный анализ для быстрой идентификации гаплотипов *Ppd-Alb* (Muterko et al. 2015c). Отсутствие гетеродуплексов указывает на гаплотип аналогичный референсному. М – маркер длины ДНК. (А) Гетеродуплексный анализ образцов гексаплоидной пшеницы с гаплогруппой АП (PI (168680, 295056, 520066, 159101, 294567, 294892, 352306, 272554, 352466, 355514, 168680, 295056, 520066, 159101, 294567, 294892, 352306, 272554), UA0300245, PI (352466, 355514, 326319, 428343)), в котором Нар-4 и Нар-1 используются в качестве референсных гаплотипов для гибридизации. (Б) Анализ 14 образцов тетраплоидной пшеницы (PI (233288, 352323, 466941, 190921), UA0300214, CIt_r (13712, 7688), PI (211705, 220356, 221422, 278596, 94721, 655432, 286070)) с использованием Нар-4 и Нар-3 в качестве референсных последовательностей при формировании гетеродуплексов. В центре электрофореграммы представлен гетерогенный образец *T. dicoccoides* (PI 233288), который, при гибридизации с Нар-3 образует два гетеродуплекса, соответствующие Нар-4/Нар-3 и Нар1/Нар3.

В анализируемом генетическом материале гаплогруппа АI преобладала в тетраплоидной пшенице, тогда как гексаплоидная пшеница характеризовалась примерно равным количеством образцов несущих гаплогруппы АI и АII. Тем не менее, альтернативные гаплогруппы *Ppd-A1b* представлены в различных видах гексаплоидной пшеницы в различном соотношении (Таблица 2). Среди гаплотипов гаплогруппы АII, гаплотип Нар-1 идентифицирован в 52% образцов, в то время как 45% образцов характеризовались гаплотипом Нар-3. Все образцы вида *T. sphaerococcum* несли ген *Ppd-A1b* с гаплотипом Нар-1. Четыре гаплотипа (Нар-1, Нар-3, Нар-12 и Нар-13) выявлены в тетраплоидной пшенице, при этом гаплотип Нар-3 был обнаружен в подавляющем количестве образцов (73%). В гексаплоидной пшенице были представлены только гаплотипы Нар-1 и Нар-3, с преобладанием образцов несущих Нар-1 (63%). Однако при исключении образцов вида *T. sphaerococcum*, фракция Нар-1 сокращается до 42%. В целом, сопоставив распределение альтернативных гаплотипов *Ppd-A1b* в полиплоидной пшенице можно заключить, что Нар-1 наиболее широко распространен именно в гексаплоидной пшенице (94 %, или 88 % при исключении образцов *T. sphaerococcum*). Гаплотипы Нар-12 (*T. durum*) и Нар-13 (*T. dicoccoides*) возникли, вероятно, позже чем Нар-1 и являются видоспецифичными.

Таблица 2. Распространение гаплотипов *Ppd-A1b* в диплоидной и полиплоидной пшенице (обобщенные данные, включая результаты *in silico* ПЦР).

Вид	Гаплотип (количество) процентное соотношение для данного вида
<i>T. urartu</i>	Нар-8 (28) 75.68%
	Нар-9 (3) 8.11%
	Нар-10 (6) 16.22%
<i>T. dicoccoides</i>	Нар-1 (7) 16.28%
	Нар-5 (2) 4.65%
	Нар-6 (5) 11.63%
	Нар-7 (2) 4.65%
	Нар-3 (7) 16.28%
	Нар-4 (19) 44.19%
	Нар-13 (2) 4.65%

Вид	Гаплотип (количество) процентное соотношение для данного вида
<i>T. dicoccum</i>	Нар-3 (2) 16.67% Нар-4 (10) 83.33%
<i>T. turgidum</i>	Нар-2 (8) 9.3% Нар-3 (22) 25.58% Нар-4 (52) 60.47% Нар-1 (4) 4.65%
<i>T. durum</i>	Нар-4 (85) 93.4% Нар-12 (4) 4.4% Нар-3 (2) 2.2%
<i>T. carthlicum</i>	Нар-3 (1) 5.56% Нар-4 (17) 94.44%
<i>T. polonicum</i>	Нар-4 (22) 100%
<i>T. timopheevii</i>	Нар-11 (5) 62.5% Нар-6 (2) 25% Нар-2 (1) 12.5%
<i>T. ispahanicum</i>	Нар-2 (2) 100%
<i>T. turanicum</i>	Нар-4 (7) 100% Нар-1 (9) 33.33%
<i>T. aestivum</i>	Нар-3 (6) 22.22% Нар-4 (12) 44.45%
<i>T. sphaerococcum</i>	Нар-1 (18) 100%
<i>T. compactum</i>	Нар-1 (4) 20% Нар-3 (6) 30% Нар-4 (10) 50%
<i>T. spelta</i>	Нар-1 (3) 13.64% Нар-3 (2) 9.09% Нар-4 (17) 77.27%
<i>T. macha</i>	Нар-3 (3) 30% Нар-4 (7) 70%
<i>T. vavilovii</i>	Нар-3 (2) 66.67% Нар-4 (1) 33.33%

Для повышения информативности анализа распространения гаплотипов *Ppd-A1b* в пшенице, полученные результаты были дополнены результатами анализа последовательностей фрагментов *in silico* ПЦР 426 образцов из базы данных GenBank (Таблица 2). Наибольшее количество различных гаплотипов (7 гаплотипов) выявлено у вида *T. dicoccoides* (дикая полба). В тетраплоидной пшенице гаплотип Нар-4 преобладает в видах *T. durum*, *T. polonicum* и *T. carthlicum*. Результаты филогенетического анализа гаплотипов *Ppd-A1b* и их

распространенности в различных видах пшеницы хорошо согласуются с существующими представлениями об эволюции рода *Triticum* (Рисунок 6).

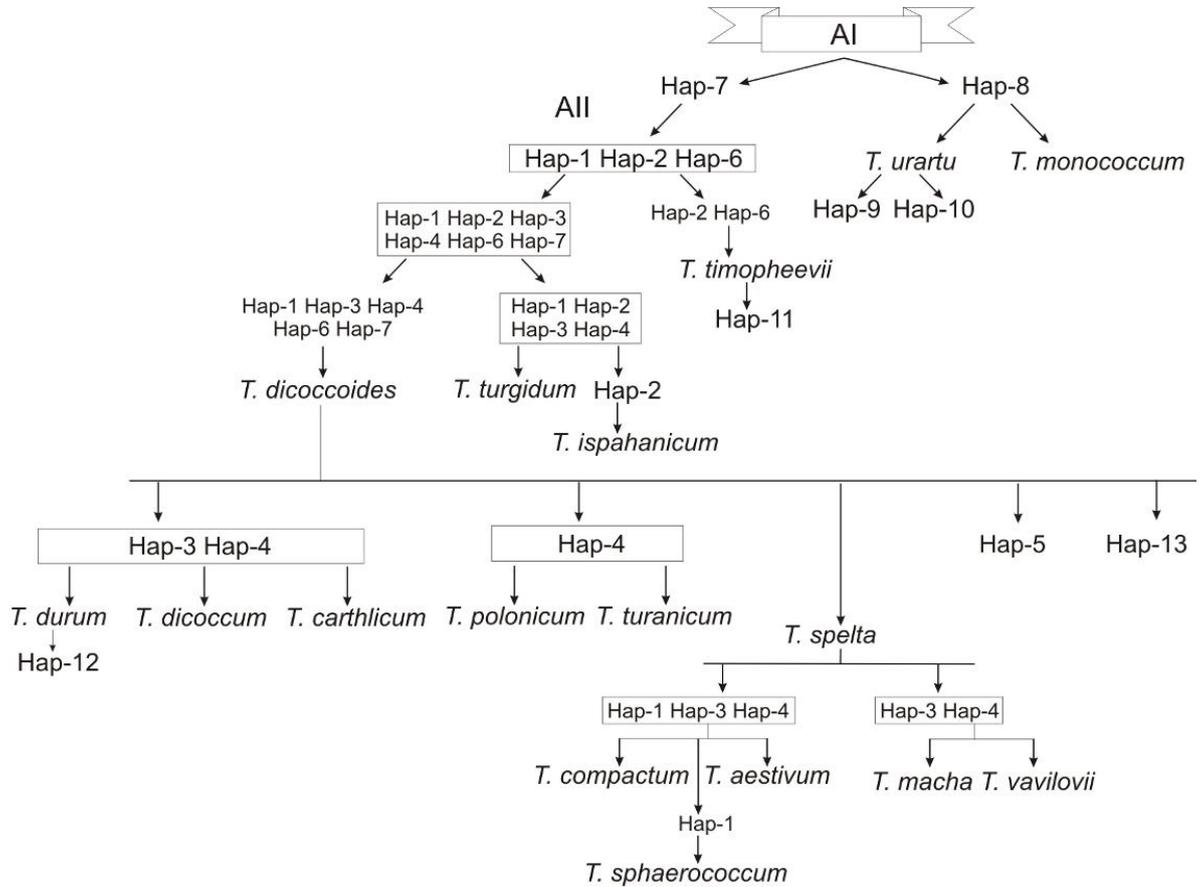


Рисунок 6. Интегрированная диаграмма результатов анализа филогении гаплотипов *Ppd-A1b* с результатами исследования их распространения в различных видах пшеницы (Muterko et al. 2015c).

Гаплогруппа AI имеет широкое географическое распространение и преобладает в северных и северо-западных регионах: Европа, Россия, Северная Африка, Эфиопия, Ближний Восток, Аргентина, Канада (Приложение 8). В противоположность этому, гаплогруппа AII преобладает в южных регионах таких как Индия, Пакистан, Израиль, Китай и США, и частично в Афганистане, Палестине и Турции.

3.1.4. Новые данные уточняют и корректируют существующие представления о структуре и эволюции гаплотипов гена *PPD-A1*

В предыдущих исследованиях Такенака и Кавахара в результате анализа первичной структуры участка генома, продолжительностью 5823-7076 п.н. в пределах которого локализован ген *PPD-A1* в диплоидной и тетраплоидной пшенице идентифицировали 67 гаплотипов (Takenaka et al. 2012; Takenaka et al. 2013). Они разделили эти гаплотипы на две гаплогруппы (AI и AII), основываясь на последовательности нуклеотидов длиной ~200 п.н., локализованной на 1 кб выше стартового кодона. Тем не менее, в результате *in silico* ПЦР, проведенного в настоящем исследовании, с праймерами предложенными для идентификации данных гаплогрупп, не удалось разделить выборку образцов строго на две гаплогруппы, поскольку было идентифицировано 11 ампликонов различной длины. В соответствии с критериями, предложенными Такенака и Кавахара для определения гаплогрупп *PPD-A1*, фрагменты ПЦР размером 235, 243 и 244 п.н. детектируют гаплогруппу AI, в то время как ампликоны длиной 146, 153, 156, 245, 248, 251, 256, 279 п.н. идентифицируют гаплогруппу AII. В настоящем исследовании гаплотипы *Ppd-A1b* были распределены по двум гаплогруппам на основании данных филогенетического анализа, реконструкции иерархической структуры межгаллельных ассоциаций и определения предполагаемого порядка дивергенции гаплотипов, что делает данный подход наиболее приближенным к естественному ходу событий. Как будет показано далее, правомерность данного утверждения подкреплена хорошей согласованностью полученных данных с существующими представлениями в различных аспектах происхождения и эволюции пшеницы. Кроме того, было обнаружено, что ОНП 248Т/С, который различает гаплотипы из гаплогрупп AI и AII модулирует кривизну молекулы ДНК и обуславливает, таким образом, различия в подвижности фрагментов ПЦР, детектирующих альтернативные гаплотипы, через полиакриамидный гель. В этой связи, гаплотипы гена *Ppd-A1b* могут быть безошибочно распределены на гаплогруппы в ходе электрофореза продуктов ПЦР в ПААГ, избегая секвенирование. Такенака и Кавахара также предполагали, что гаплогруппа AII является более древней, чем AI, поскольку все образцы однозерной пшеницы

характеризовались гаплогруппой АII. В тоже время они установили, что к гаплогруппе АII принадлежит в 2.5 раза меньше гаплотипов, чем к АI, для которых, при этом, характерно более узкое географическое и видовое распространение. Однако, поскольку однозернянки являются диплоидными предками А генома (в частности считается, что *T. urartu* является донором А генома для тетраплоидных (геномный состав ВВА^uA^u, GGA^uA^u) и гексаплоидных (геномный состав ВВА^uA^uDD) видов пшеницы) то вероятно, что их гаплогруппа должна преобладать в полиплоидной пшенице. В настоящем исследовании показано, что однозерная пшеница *T. urartu* принадлежит к гаплогруппе АI, которая наиболее широко распространена в пшенице, следовательно, более вероятно, что ее гаплотип-основатель является более древним, чем гаплотип основавший гаплогруппу АII. Кроме того, было обнаружено, что хотя *in silico* ампликоны образцов *T. monococcum* содержат инсерцию 4 п.н., комбинация аллелей из сегрегирующих позиций формирует гаплотип Нар-8, принадлежащий более древней гаплогруппе АI. Это также подтверждает существующее предположение об эволюционно близком отношении между видами *T. monococcum* и *T. urartu* (Johnson et al. 1976).

Выдвинутое в настоящем исследовании предположение о том, что гаплогруппа АI эволюционно старше АII основывается на следующих наблюдениях: (1) К гаплогруппе АI принадлежат все гаплотипы, специфические для однозерной пшеницы (*T. monococcum*, *T. urartu*) и она также преобладает в тетраплоидных видах, (2) Гаплогруппа АI включает в себя большее количество гаплотипов, (3) АI характеризуется наиболее широким видовым и географическим распространением, (4) это подтверждается результатами филогенетического анализа и порядком дивергенции гаплотипов. Кроме того, данный вывод также согласуется с географическим распространением гаплогруппы АI, которая преобладает в странах Плодородного Полумесяца, и является исключительной в Иордании (100% образцов имеют гаплогруппу АI), Ливан (100%), Иран (95%) и Ирак (82%), а, как известно, страны Плодородного Полумесяца являются центром происхождения и domestikации пшеницы (Kilian et al. 2009; Matsuoka 2011). В настоящем исследовании также показано, что гаплогруппа АI также широко распространена в северных регионах, тогда как АII преобладает в США и юго-восточных регионах, таких как Индия, Пакистан, Израиль. Кроме того, вид *T.*

sphaerococcum характеризующийся гаплотипом Нар-1 из гаплогруппы АII является эндемическим видом Индийского континента (Пакистан и северо-западная Индия) (Ellerton 1939). Таким образом, наблюдаемое географическое распространение гаплогрупп АI и АII (Рисунок 7) хорошо согласуется с существующими представлениями о географических направлениях по которым проходила доместикации пшеницы: на восток к Индии и на северо-запад к Средиземноморскому побережью и Европе (Kilian et al. 2009; Matsuoka 2011).

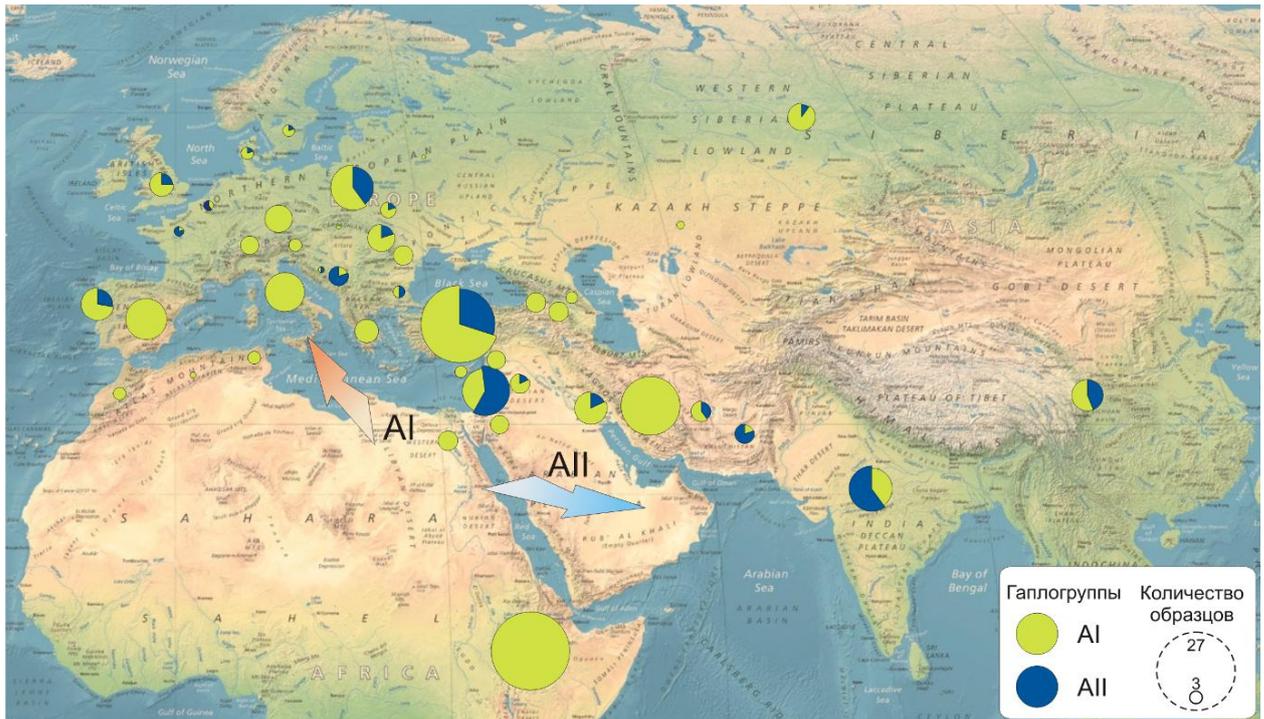


Рисунок 7. Географическое распространение гаплогрупп *Ppd-A1b* диплоидной, тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы (Muterko et al. 2015c). Стрелками обозначены два основных географических направления доместикации пшеницы.

Одомашнивание *T. turgidum* началось с дикой полбы *T. dicoccoides* (Matsuoka 2011). В настоящем исследовании гаплотип Нар-7 идентифицирован как предковый гаплотип для видов полиплоидной пшеницы и детектирован только в образцах *T. dicoccoides*. Кроме того, среди тетраплоидных видов только в образцах *T. turgidum* (4.65 %) и *T. dicoccoides* (16.28 %) встречался гаплотип Нар-1, который широко распространен в гексаплоидной пшенице. Данные результаты согласуются с происхождением гексаплоидной пшеницы от *T. dicoccoides* (линия *T. turgidum*) (Matsuoka 2011) параллельно видам *T. durum*, *T. polonicum* и *T. carthlicum*.

Резкое снижение разнообразия гаплотипов *Ppd-A1b* наблюдается при прохождении через "бутылочное горлышко" в связи с событиями аллополиплоидизации и видообразования (Рисунок 6). Известно, что аллополиплоидизация часто сопровождается снижением генетического разнообразия, обусловленным прохождением популяции через "бутылочное горлышко" сопровождающееся "эффектом основателя" (Haudry et al. 2007; Feldman et al. 2012). Как показано в настоящем исследовании, в тетраплоидной пшенице преобладает гаплогруппа AI. Однако после возникновения аллогексаплоидных видов пшеницы широкое распространение получает гаплогруппа AII. Известно, что эффект "бутылочного горлышка" и "эффект основателя" сопровождали происхождение таких видов как *T. shaerococcum* и *T. polonicum*. Все образцы вида *T. shaerococcum*, проанализированные в настоящем исследовании, обладали гаплотипом Нар-1 (гаплогруппа AII), который преобладает в гексаплоидной пшенице. Аналогично, все проанализированные образцы *T. polonicum* характеризовались гаплотипом Нар-4 (AI), преобладающим в тетраплоидной пшенице. Низкую генетическую вариабельность этих видов, а также видов *T. carthlicum* и *T. turanicum* можно объяснить их более поздним эволюционным происхождением. Репродуктивная изоляция (включая изоляцию, связанную с культивированием) также объясняет возникновение видоспецифических гаплотипов в *T. timopheevii* (Нар-11), *T. urartu* (Нар-8, Нар-9, Нар-10), *T. dicoccoides* (Нар-5, Нар-7, Нар-13), *T. durum* (Нар-12), а также специфической инсерции 4 п.н. в гаплотипе Нар-8 у *T. monosocum*.

3.1.5. Идентификация нового аллеля *Ppd-A1a.4*

В ходе ПЦР с парой праймеров durum_Ag5del_F2/durum_Ag5del_R2 в двух образцах *T. compactum* (PI 114638 и PI 164160) и двух образцах *T. spelta* (UA0300218, PI 348700) не удалось получить целевые продукты амплификации (Рисунок 8.A). Данное обстоятельство могло указывать на присутствие в области промотора гена *PPD-A1* протяженных делеций размером 1085, 1027 и 1117 п.н. которые характеризуют ранее идентифицированные аллели *Ppd-A1a.1*, *Ppd-A1a.2* и *Ppd-A1a.3*, соответственно. Однако доминантные аллели *Ppd-A1a.2* и *Ppd-A1a.3*

выявлены только в тетраплоидной пшенице и, вероятно, имеют позднее происхождение в сортах *T. durum* (Wilhelm et al. 2009; Bentley et al. 2011). Пара праймеров durum_Ag5del_F1/durum_Ag5del_R2 используется для идентификации аллелей *Ppd-A1a.2* и *Ppd-A1a.3* в ходе ПЦР (Wilhelm et al. 2009). Однако делеция размером 1085 п.н. в области промотора аллеля *Ppd-A1a.1* (который идентифицирован в гексаплоидной пшенице *T. aestivum*) охватывает сайт отжига прямого праймера durum_Ag5del_F1. Для идентификации аллеля *Ppd-A1a.1* ранее была предложена пара праймеров TaPpd-A1prodelF1/TaPpd-A1prodelR2 (Nishida et al. 2013). Однако выравнивание нуклеотидных последовательности 230 образцов выявило ряд полиморфных позиций в сайте отжига прямого праймера TaPpd-A1prodelF1 (ОНП: Т6А, С11Т, С12Т, Т20С). В этой связи был разработан новый праймер Ppd-A1proF, который отжигается на 47 п.н. выше праймера TaPpd-A1prodelF1. Пара праймеров Ppd-A1proF/durum_Ag5del_R2 была оптимизирована для проведения ПЦР, направленной на идентификацию всех известных доминантных аллелей *Ppd-A1a* (*Ppd-A1a.1*, *Ppd-A1a.2* и *Ppd-A1a.3*). В ходе данной ПЦР, фрагменты размером 405, 463 и 372 п.н. детектируют аллели *Ppd-A1a.1*, *Ppd-A1a.2* и *Ppd-A1a.3*, соответственно. В результате ПЦР анализа с данной парой праймеров двух образцов *T. spelta* и *T. compactum*, в последних выявлены фрагменты длиной 806 п.н. (Рисунок 8.А). Данные фрагменты были клонированы и секвенированы (GB: KJ767779, KJ767780). Анализ первичной структуры идентифицировал новый аллель гена *PPD-A1*, который содержит делецию размером 684 п.н. на участке промотора в позиции -302. Новый аллель, в соответствии с существующей номенклатурой (Nishida et al. 2013), был обозначен как *Ppd-A1a.4*.

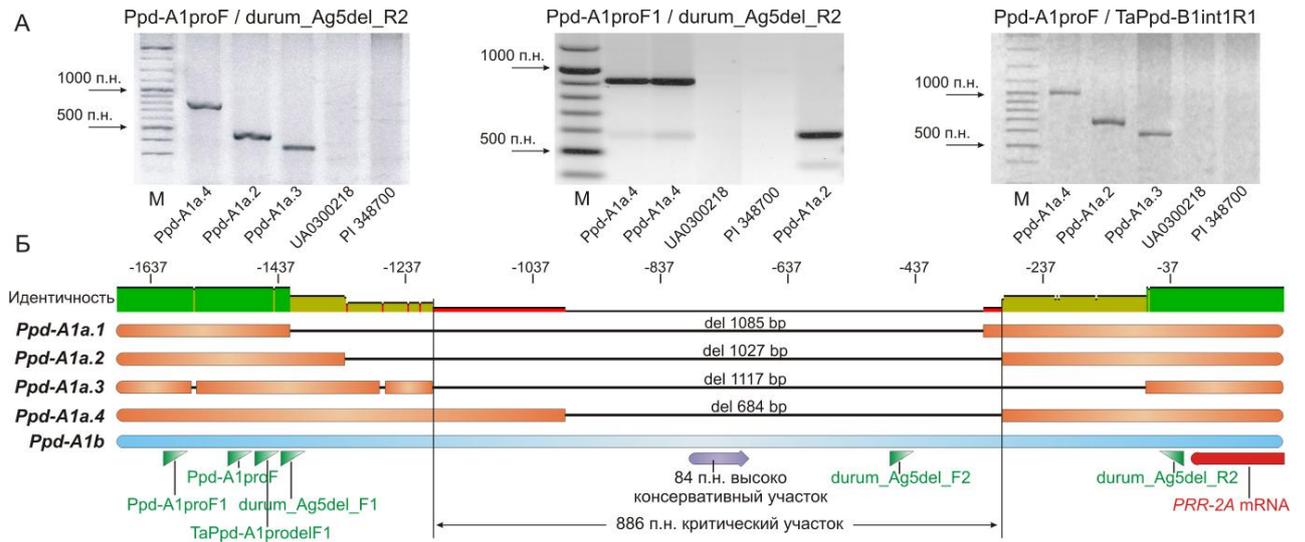


Рисунок 8. ПЦР-анализ участка промотора гена *PPD-A1* (Muterko et al. 2015c).

(А) Электрофорез в агарозных гелях продуктов амплификации образцов *T. compactum* (PI 114638, PI 164160), несущих аллель *Ppd-A1a.4* и образцов *T. spelta* (UA0300218, PI 348700) с парами праймеров: Ppd-A1proF / durum_Ag5del_R2, Ppd-A1proF1 / durum_Ag5del_R2 и Ppd-A1proF / TaPpd-B1int1R1. Образцы *T. durum* с *Ppd-A1a.2* (UA0200701) и *Ppd-A1a.3* (UA0201386) были использованы для тестирования разработанных ПЦР-маркеров. (Б) Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей области промотора доминантных аллелей *Ppd-A1a* и аллеля дикого типа *Ppd-A1b*. Указаны размеры делеций, локализация сайтов отжига праймеров и ранее обозначенного "критического участка".

Праймер Ppd-A1proF1 с сайтом отжига в позиции -1611 п.н. был разработан для расширения амплифицируемого участка в сторону 5' конца. В результате ПЦР с парой праймеров Ppd-A1proF1/durum_Ag5del_R2 были получены фрагменты длиной 908 и 565 п.н. для аллелей *Ppd-A1a.4* и *Ppd-A1a.2* (GB: KJ767781), соответственно. Однако, по-прежнему, отсутствовали ампликоны в образцах *T. spelta* (UA0300218 и PI 348700). Использование обратного праймера TaPpd-B1int1R1, который был ранее разработан для амплификации участка гена *PPD-B1*, но как показало выравнивание содержит только один ОНП, в сайте отжига в гене *PPD-A1*, было обусловлено необходимостью расширения анализируемой области в сторону 3' конца. Данный праймер отжигается в позиции 226-245 п.н., что позволяет охватить экзон-1 и 55 п.н. первого интрона гена *PPD-A1*. Пара праймеров Ppd-A1proF/TaPpd-B1int1R1 была оптимизирована для анализа образцов

UA0300218 и PI 348700 вида *T. spelta*. Тем не менее, в то время как фрагменты длиной 727, 636 и 1070 п.н. детектированы в образцах, несущих аллели *Ppd-A1a.2*, *Ppd-A1a.3* и *Ppd-A1a.4*, соответственно, в образцах *T. spelta* (UA0300218 и PI 348700) продукты амплификации не выявлены.

Для определения влияния обнаруженного полиморфизма в регуляторном участке гена *PPD-A1* на чувствительность к фотопериоду, образцы *T. compactum* (PI 114638) и *T. spelta* (PI348700) были выращены в тепличных условиях, без яровизации на продолжительном (16 ч) и укороченном (9.5 ч) фотопериоде, и генотипированы по серии гомеологичных генов *PPD1* с помощью соответствующих ДНК-маркеров. Ни один из известных доминантных аллелей генов *PPD-B1* и *PPD-D1* не выявлен в данных образцах. Образец *T. compactum* (PI 114638), выращенный на длинном дне, выколашивался на 18 дней раньше, чем на коротком. Не обнаружено разницы по времени выхода в трубку образца *T. spelta* (PI 348700) в альтернативных условиях фотопериода. Однако только на длинном дне время колошения образца PI 348700 составило 60 дней, тогда как на укороченном фотопериоде фаза колошения не была достигнута к концу эксперимента (110 дней). Данное наблюдение указывает на слабую чувствительность к фотопериоду образца *T. compactum*, несущего аллель *Ppd-A1a.4*, и сильную чувствительность к длинному дню образца *T. spelta* с мутантным геном *PPD-A1*.

В предыдущем исследовании Вильгельм и соавторы (Wilhelm et al. 2009) обозначили участок размером ~ 900 п.н. в области промотора генов *PPD1* как критический для регуляции их экспрессии. Делеция в 684 п.н., идентифицированная в аллеле *Ppd-A1a.4*, полностью захватывает высоко консервативную область (100 п.н.) и большую часть критического участка, за исключением 207 п.н. с 5' конца. Кроме того, данная делеция полностью перекрывается делецией 1027 п.н. в аллеле *Ppd-A1a.2*. Однако в отличие от последней, делеция в аллеле *Ppd-A1a.4* фланкирована динуклеотидным повтором ("GC"). Данное обстоятельство указывает на то, что делеция в промоторе *Ppd-A1a.4*, вероятно, произошла в результате негомологической репарации двухцепочечного разрыва ДНК с соединением концов, сопровождающимся одноцепочечным отжигом (Puchta 2005). Данный механизм образования делеций

характерен для большинства делеций, идентифицированных в генах *VRN1* (Cockram et al. 2007b) и, вероятно, для делеции в промоторе аллеля *Ppd-A1a.1* (Nishida et al. 2013). В то время как все четыре доминантных аллеля *Ppd-A1a* перекрывают общий участок между -986 и -336 п.н., делеция в аллеле *Ppd-A1a.4* является наиболее короткой из них (Рисунок 8.Б). Это приводит к сдвигу левой границы критического участка на 207 п.н. в направлении стартового кодона относительно ее предыдущей локализации, детерминированной 5' концом делеции в аллеле *Ppd-A1a.3*.

Поскольку в результате ПЦР анализа промотора *PPD-A1* в двух образцах *T. spelta* (UA0300218 и PI 348700) не удалось получить продукты амплификации, предполагается, что данные образцы содержат мутации в промоторе гена *PPD-A1*, которые охватывают сайты отжига праймеров или крупные инсерции, которые не могут быть амплифицированы при данных условиях ПЦР. Выращивание экспериментальных образцов в условиях продолжительного и сокращенного фотопериода показало, что данные мутации не оказывают влияния на снижение чувствительности к фотопериоду и определяют, таким образом, новый мутантный вариант рецессивного аллеля *Ppd-A1b*.

Известно, что для функционирования генов *PPD1* не характерна геномная специфичность. В этой связи доминантные аллели *PPD1* из различных геномов, содержащие сходные мутации, характеризуются также подобным снижением чувствительности к фотопериоду и сокращением периода до колошения в условиях короткого дня (Bentley et al. 2011; Shaw et al. 2012). Идентифицированный в настоящем исследовании новый аллель *Ppd-A1a.4* может быть использован как генетический источник для селекции раннеспелых сортов с низкой чувствительностью к фотопериоду. Кроме того, переопределение границ критического участка будет полезно в более точной идентификации регуляторных последовательностей в промоторе генов *PPD1*, которые к настоящему времени не установлены.

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

Исследование регуляторного участка промотора гена *PPD-B1* проводилось на генетическом материале 77 образцов пяти видов гексаплоидной и 103 образцах шести видов тетраплоидной пшеницы (Мутерко и др. 2013а; Мутерко и др. 2013б; Мутерко и др. 2014). В качестве контроля использован сорт мягкой пшеницы Chinese Spring.

3.2.1. Оптимизация ПЦР-анализа для исследования области промотора гена *PPD-B1*

В предыдущих исследованиях первичной структуры гена *PPD-B1* в тетраплоидной пшенице (Takenaka et al. 2012) был выявлен ряд мутаций на участке промотора, к четырем из которых предложены ДНК-маркеры. Кроме того, в зависимости от состава последовательности ДНК из 30 п.н., локализованной на участке -586 – -616, образцы были распределены на две гаплогруппы (VI и VII) (Takenaka et al. 2012). Однако в настоящее время отсутствует информация относительно молекулярно-генетических маркеров, которые можно было бы использовать для анализа области промотора гена *PPD-B1* по нескольким мутациям одновременно.

Пара праймеров TaPpd-B1proF1–TaPpd-B1int1R1 была разработана для исследования участка промотора гена *PPD-B1* у сортов мягкой пшеницы, и в частности, для детекции инсерции 308 п.н. в доминантном аллеле *Ppd-B1a.1* (Seki et al. 2011). Поскольку гексаплоидные и тетраплоидные виды пшеницы имеют общего предка В генома, не исключена возможность использования молекулярно-генетических маркеров, идентифицирующих аллели генов *PPD1*, разработанных для *T. aestivum*, в исследовании других видов пшеницы.

С целью установления возможности использования пары праймеров TaPpd-B1proF1–TaPpd-B1int1R1 для идентификации гаплогруппы *PPD-B1*, детекции мутаций на участке -1056 – +236 этого гена и прогнозирования размеров соответствующих продуктов амплификации, проведен *in silico* ПЦР-анализ 166

нуклеотидных последовательностей генов *PPD-B1* (*PRR-2B*) в 8 видах полиплоидной пшеницы (7 тетраплоидных видов (156 образцов) и вид *T. aestivum* (10 образцов) полученных из базы данных GenBank (Приложение 9). Согласно результатам анализа, составлена таблица (Таблица 3) иллюстрирующая соответствие длины продукта амплификации мутациям в области промотора и экзона-1 гена *PPD-B1*. Среди полиморфных по длине ампликонов для последующего анализа отбирались лишь те из них, которые отличались между собой на два и более нуклеотида. В качестве контроля, по отношению к которому определялся тип мутации (делеция или инсерция), использовалась нуклеотидная последовательность гена *PPD-2B* сорта Chinese Spring (Рисунок 9).

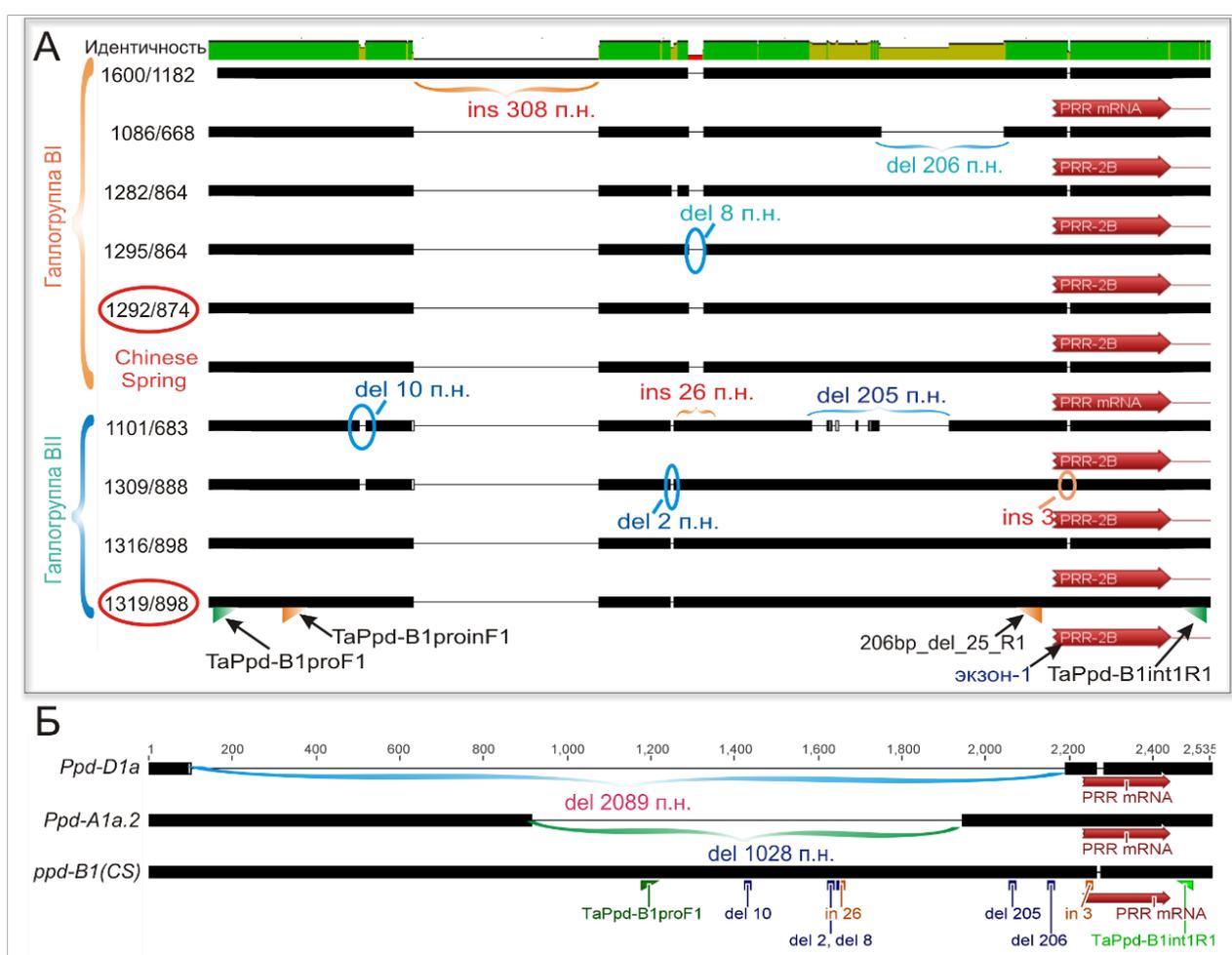


Рисунок 9. (А) Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей полиморфных *in silico* ампликонов, идентифицированных в ходе виртуального ПЦР-анализа. (Б) Локализация мутаций, выявленных в области промотора гена *PPD-B1*, относительно участка промотора, охваченного делециями в доминантных аллелях генов *PPD-A1* и *PPD-D1*.

Необходимость в референсной последовательности обусловлена потребностью в унификации исследуемых образцов для их последующего анализа. Как известно, сорт Chinese Spring содержит доминантный аллель *Ppd-B1a*. Однако снижение чувствительности к фотопериоду, характерное для данного сорта, детерминировано не мутациями в структуре гена *PPD-B1*, а наличием в геноме нескольких его функциональных копий (Diaz et al. 2012). Сама же нуклеотидная последовательность функциональных копий гена *PRR-2B* у сорта Chinese Spring идентична аналогичным последовательностям у сортов, которые являются носителями рецессивных аллелей *ppd-B1* (Beales et al. 2007; Diaz et al. 2012).

Для ампликонов, детектируемых в ходе виртуального ПЦР-анализа установлены следующие частоты: гаплогруппа VI: 1086 п.н. – 2.41%, 1282 п.н. – 0.6%, 1291 п.н. – 0.6%, 1292 п.н. – 66.27%, 1295 п.н. – 3.61% и 1600 п.н. – 0.6%; гаплогруппа VII: 1309 п.н. – 0.6%; 1316 п.н. – 3.61%; 1319 п.н. – 20.48%; 1101 п.н. – 0.6%. Таким образом, для каждой из гаплогрупп можно выделить наиболее характерные фрагменты, детектируемые в ходе ПЦР с парой праймеров TaPpd-B1proF1–TaPpd-B1int1R1. Для гаплогруппы VI это фрагменты длиной 1292 п.н. (частота встречаемости в группе составляет 89,4%), а для гаплогруппы VII – ампликоны размером 1319 п.н., с частотой встречаемости в группе 80,9%. Следует отметить, что нуклеотидная последовательность амплифицируемого участка характеризуется относительно высоким уровнем консервативности. Анализ первичной структуры данных фрагментов в 160 образцах показал наличие только трех ОНП (с частотой встречаемости в исходной выборке от двух образцов и более) и только среди ампликонов длиной 1292 п.н., при этом расщепление по каждой из этих мутаций происходит только у определенных видов. Так, фрагменты ПЦР размером 1292 п.н., детектируемые в образцах вида *T. durum* расщепляются по мутации G310A в соотношении 32:3, в образцах *T. dicoccum* расщепление 30:7 наблюдается по мутации G314A, а среди образцов вида *T. aestivum* расщепление выборки ампликонов того же размера, происходит по ОНП C427G в соотношении 2:7 (цифра в названии мутаций указывает позицию относительно начала ампликона).

3.2.2. Разработка ДНК-маркеров для идентификации гаплотипов и гаплогруппы гена *PPD-B1*

Несколькими годами позже, для идентификации все той же инсерции (308 п.н.) в аллеле *Ppd-B1a.1*, была предложена пара праймеров TaPpd-B1proinF1–TaPpd-B1proinR1 (Nishida et al. 2013), которая фланкирует участок промотора -892 – -580. Хотя целевые продукты амплификации, получаемые с использованием данной пары праймеров, имеют значительно меньший размер, что облегчает их детекцию, тем не менее, из анализа выпадают 580 п.н., охватывающие критический для регуляции транскрипции участок промотора. Данное обстоятельство делает пару праймеров TaPpd-B1proinF1–TaPpd-B1proinR1, возможно, более предпочтительной для идентификации аллеля *Ppd-B1a.1*, но неприемлемой для анализа полиморфизма гена *PPD-B1*. Пара праймеров 206bp_del_25_F2–206bp_del_25_R1 фланкирует участок -427 – -18 и детектирует делецию 206 п.н. в области промотора *PPD-B1*, идентифицированную в нескольких образцах дикой полбы (*T. dicoccoides*) (Takenaka et al. 2012). В этой связи возникло предположение относительно возможности использования комбинации прямого праймера TaPpd-B1proinF1 и обратного 206bp_del_25_R1 для амплификации области промотора -892 - -18, что дало бы возможность исследовать промотор гена *PPD-B1* сразу по восьми известным мутациям, а по размеру соответствующих продуктов амплификации определить их комбинации.

С целью установления возможности использования пары праймеров TaPpd-B1proinF1–206bp_del_25_R1 для исследования полиморфизма участка -892 – -18 гена *PPD-B1* и прогнозирования размеров соответствующих продуктов амплификации, проведен *in silico* ПЦР-анализ 166 образцов нуклеотидных последовательностей генов *PPD-B1* в семи тетраплоидных видах пшеницы (156 образцов) и 10 образцах вида *T. aestivum*, полученных из базы данных GenBank. Тип мутации определен относительно последовательности гена *PRR-2B* сорта Chinese Spring. Согласно результатам *in silico* ПЦР для каждой из гаплогрупп были выделены наиболее характерные продукты амплификации. Для гаплогруппы VI – это ампликон длиной 874 п.н. (частота встречаемости в группе составляет 95%), а

для гаплогруппы ВІІ – фрагмент размером 898 п.н., с частотой встречаемости в группе 95.3%.

3.2.3. Гаплотипы гена *PPD-B1*

Как известно, под гаплотипом понимают специфическую комбинацию аллелей, которые наследуются совместно (входят в состав одной группы сцепления). В процессе исследования установлено, что большинство продуктов амплификации детектируют не отдельные мутации, а их определенные комбинации (Таблица 3).

Таблица 3. Соответствие размера фрагментов ПЦР с парами праймеров TaPpd-B1proF1 / TaPpd-B1int1R1 и TaPpd-B1proinF1 / 206bp_del_25_R1 с комбинациями мутаций в области промотора и экзона-1 гена *PPD-B1*

Размер ампликона (п.н.), фланкированного парой праймеров		Тип мутации («-»– делеция; «+»– инсерция) относительно последовательнос ти CS*	Локализация мутаций относительно стартового кодона в последовательнос ти CS	Гаплогруппа
TaPpd- B1proF1 TaPpd- B1int1R 1	TaPpd- B1proinF1 206bp_del_25_ R1			
1282	864	-10	-601	ВІ
1292	874	–	–	
1295	874	+3	+17	
1086	668	-206	-88	
1600	1182	+308	-733	
1319	898	-2 +26 +3	-611 -586 +17	ВІІ
1316	898	-2 +26	-611 -586	
1309	888	-10 -2 +26 +3	-811 -611 -586 +17	
1101	683	-10 -2 +26 -205	-811 -611 -586 -180	

*CS – сорт Chinese Spring

Так, согласно результатам анализа ПЦР *in silico* отсутствуют ампликоны, подтверждающие наличие отдельно таких мутаций как делеции 2, 10, 205 п.н. или инсерция 26 п.н. в позициях гена *PPD-B1*: -611, -811, -180 и -586, соответственно. Все вышеупомянутые мутации встречались только в комбинациях между собой, что свидетельствует о вероятном отсутствии рекомбинационных процессов на этом участке генома в ходе его дивергенции. Следовательно, обнаруженные комбинации мутаций соответствуют индивидуальным гаплотипам. Предполагается, что поскольку мутации входят в состав одной рекомбинационной единицы, то возникновение очередной мутации будет всегда ассоциировано с мутациями, которые уже присутствовали на данном участке в момент дивергенции. Таким образом, сопоставляя и анализируя комбинации мутаций в разных гаплотипах можно определить ассоциативные связи между отдельными мутациями и установить филогенетические взаимоотношения между гаплотипами.

Названия гаплотипов состоят из большой буквы "В" (предложено авторами, которые впервые исследовали гаплогруппы гена *PPD-B1* (Takenaka et al. 2012) и цифр, которые указывают размер соответствующего ампликона, полученного в ходе ПЦР с парой праймеров TaPpd-B1proinF1-206bp_del_25_R1. В структуру гаплотипов входят семь аллелей, каждому из которых отвечает определенная позиция в области промотора гена *PPD-B1*, в которой детектирован полиморфизм по типу инсерция/делеция. Для каждого гаплотипа характерно наличие мутантного или интактного аллеля. Унификация аллелей – определение интактного или мутантного состояния – проведена относительно референсного гаплотипа В874 (носителем которого является сорт Chinese Spring), все аллели которого были приняты как интактные. Гаплотип В874 был выбран специально для сохранения типа мутаций, установленного в ходе унификации нуклеотидных последовательностей исследуемых ампликонов с референсной последовательностью ампликона сорта Chinese Spring. Названия аллелей состоят из цифр, которые указывают расстояние от сегрегирующей позиции (сайта локализации делеции/инсерции) до стартового кодона референсной последовательности гена *PPD-B1* и заглавных букв, указывающих на интактный ("I") или мутантный ("M") тип. Авторы, которые впервые исследовали

гаплогруппы гена *PPD-B1*, в качестве гаплотипов приняли отдельные аллели сегрегирующих позиций этого гена (Takenaka et al. 2012). Однако, например, для таких аллелей как 180М или 811М в исходной выборке не обнаружено других комбинаций, кроме как с аллелями 586М, 611М, поскольку ассоциированы с ними (возникли последовательно в одной филетической линии (Рисунок 10) в одной единице рекомбинации).

3.2.4. Филогенетический анализ гаплотипов *PPD-B1*

Ассоциативные связи между аллелями, полученные из матрицы смежности рассчитанной методом МА, отображены в виде направленного древовидного графа (Рисунок 10.А). В структуре дерева межаллельных ассоциаций можно выделить две пары смежных узлов (586I-611I и 586M-611M), указывающих на наличие двух пар взаимозависимых аллелей, образование которых обусловлено их одновременным возникновением или отсутствием в исходной выборке гаплотипов, которые соответствуют переходным формам. Дерево межаллельных ассоциаций дает возможность по наличию определенного аллеля (мутации) прогнозировать наличие ряда других аллелей, с которыми он ассоциирован. Достоверность данного утверждения в большей степени зависит от качества исходной выборки гаплотипов, отсутствия рекомбинационных процессов на участке локализации аллелей, из которых формируются гаплотипы, а также филогенетических взаимосвязях между аллелями. Например, аллель 180М ассоциирован по меньшей мере с тремя аллелями (811М, 611М, 586М), поэтому по наличию делеции 205 п.н. в позиции -180 (аллель 180М), можно с высокой долей вероятности прогнозировать делеции 10 и 2 п.н. в позициях -811 и -611 соответственно, а также инсерцию 26 п.н. в позиции -586 гена *PPD-B1*. Кроме того, дерево межаллельных ассоциаций предоставляет информацию, которая в дальнейшем используется для расчета филогенетической структуры гаплотипов, исследования их генеалогии и определении гипотетического направления эволюции.

Для исследования филогенетических отношений между гаплотипами часто используют их отображение в виде "сети гаплотипов". Неукорененная квазимедианная сеть гаплотипов (Рисунок 10.Б) рассчитана по алгоритму MJ и

оптимизирована методом максимального правдоподобия. Топология дерева гаплотипов, полученная методом МА, аналогична топологии сети гаплотипов (Рисунок 10.В). Дерево гаплотипов соответствует дереву аллелей, поскольку появление новой мутации (нового аллеля) сопровождается возникновением новой комбинации мутаций (аллелей), а, следовательно, и нового гаплотипа. Однако, в отличие от сети гаплотипов, дерево ориентировано, поскольку содержит корень, потому отображает не только филогенетические отношения между гаплотипами и их генеалогическую структуру, но также предоставляет информацию о порядке (последовательности) их дивергенции в процессе эволюции.

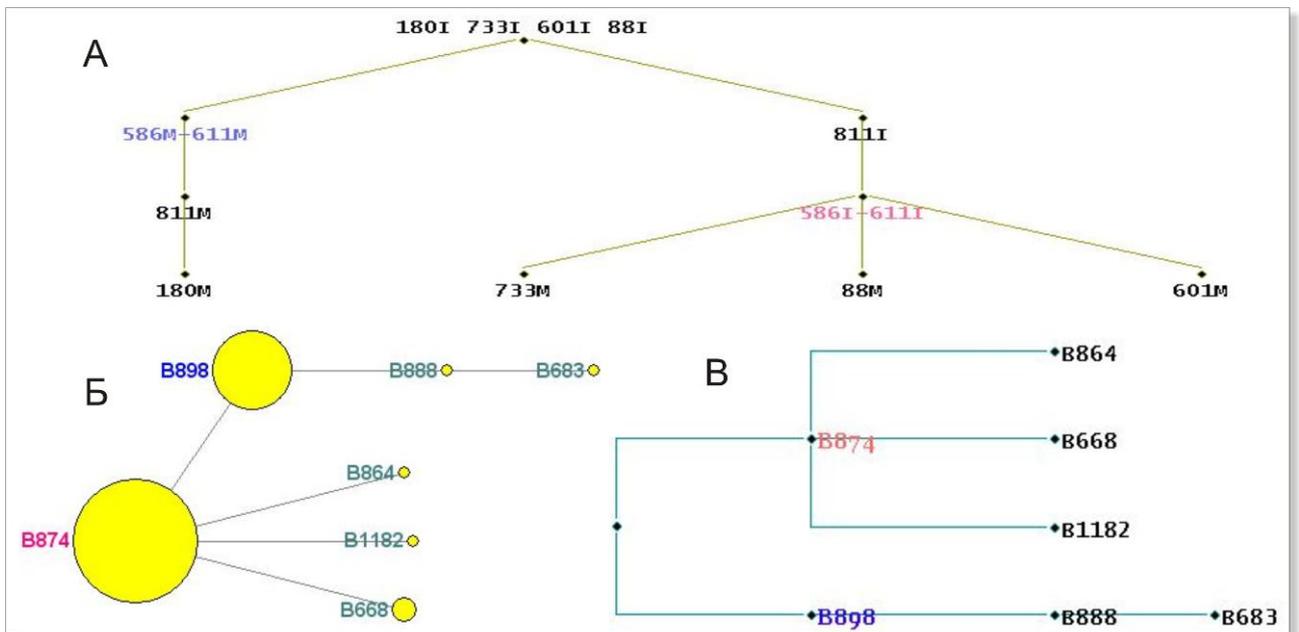


Рисунок 10. Межаллельные ассоциации и филогенетическая структура гаплотипов *PPD-V1* (Мутерко и др. 2014). (А) Иерархия межаллельных ассоциаций. (Б) Сеть гаплотипов построенная методом МН. (В) Дерево гаплотипов основанное на матрице смежности, рассчитанной из межаллельных ассоциаций.

Предполагается, что чем больше времени прошло с момента возникновения гаплотипа, тем большую он имеет распространенность и количество производных гаплотипов (при одинаковых условиях действия эволюционных факторов). Таким образом, наибольшая распространенность и количество производных гаплотипов будет присуще именно гаплотипам, из которых образовались гаплогруппы во время первичной дивергенции. Это утверждение справедливо, если наиболее распространенные гаплотипы отличаются между собой по одному аллелю или

нескольким сцепленным аллелям, то есть разошлись в результате бифуркации одного узла и имеют больше всего производных гаплотипов. Действительно, гаплотипы В874 и В898, характеризующиеся наибольшей распространенностью и количеством производных гаплотипов, отличаются между собой парой взаимозависимых аллелей (586I-611I / 586M-611M). В этой связи, предполагается, что именно В874 и В898 являются гаплотипами первичной дивергенции, в результате которой образовались гаплогруппы VI и VII, соответственно. Это утверждение согласуется с предыдущим установлением гаплогрупп гена *PPD-B1* (Takenaka et al. 2012). Если скорость эволюции гаплотипов одинакова, то среди гаплотипов первичной дивергенции исходный гаплотип имеет большую распространенность и количество производных гаплотипов. Согласно данному предположению, наиболее вероятным общим предком (корнем дерева гаплотипов) является гаплотип В874, поскольку именно для него характерна наибольшая распространенность (69,28%) и количество производных гаплотипов (В864, В668, В1182). Предполагается, что первичная дивергенция состоялась одновременно по аллелям 586I и 611I и вызвана возникновением делеции 2 и инсерции 26 п.н. в позициях -611 и -586 соответственно.

3.2.5. Распространение гаплотипов *PPD-B1* в различных видах гексаплоидной и тетраплоидной пшеницы

Полученные в результате *in silico* ПЦР данные предполагают возможность использования пар праймеров TaPpd-B1proF1–TaPpd-B1int1R1 и TaPpd-B1proinF1–206bp_del_25_R1 для анализа области промотора гена *PPD-B1* в различных видах тетраплоидной пшеницы, детекции гаплотипов, гаплогруппы и ряда мутаций на данном участке, а также предоставили информацию относительно длины соответствующих маркерных ампликонов. В этой связи проведена их апробация данного ПЦР-анализа на генетическом материале 11 видов полиплоидной пшеницы, для большинства из которых исследование гена *PPD-B1* проводится впервые (Приложение 10).

Установлено, что все проанализированные образцы пшеницы видов *T. carthlicum* и *T. dicocum* характеризуются гаплогруппой VI (гаплотип В874).

Однако текущий объем выборки образцов (13 и 12, соответственно) не позволяет сделать вывод о том, что для данных видов гаплогруппа VI является специфичной. Более того, в предыдущем исследовании (выборка 5 и 45 образцов, соответственно) был обнаружен образец *T. carthlicum* и 2 образца вида *T. dicocum* которые принадлежат к гаплогруппе VII (Takenaka et al. 2012). Остальные виды тетраплоидной пшеницы (*T. polonicum*, *T. turgidum*, *T. dicoccoides* и *T. durum*) оказались гетерогенными по гаплогруппе *PPD-B1*. Так, виды *T. polonicum* и *T. durum* по гаплогруппе *PPD-B1* расщепляются почти в равном соотношении. Среди образцов вида *T. turgidum* 88% содержат гаплотип B874 (VI), а 12% – B898 (VII). Вид *T. dicoccoides* расщепился не только по гаплогруппе *PPD-B1* (4 генотипа принадлежат к гаплогруппе VI, 7 – к VII), но и показал полиморфизм в гаплогруппе VII. В частности, идентификация продуктов амплификации длиной 1309 п.н. в образце PI 272582 и 1101 п.н. в образце PI 466941 при использовании пары праймеров TaPpd-B1proF1–TaPpd-B1int1R1 свидетельствует о наличии дополнительных мутаций в области промотора (делеции 10 и 205 п.н.) и экзона-1 (делеция 3 п.н.) гена *PPD-B1* относительно последовательности типичного представителя гаплогруппы VII с длиной ампликона 1319 п.н. Идентичность гаплотипов B888 и B683 в данных образцах *T. dicoccoides* верифицирована путем секвенирования соответствующих фрагментов ПЦР.

Все исследованные образцы пяти видов гексаплоидной пшеницы характеризовались фрагментами ПЦР одинаковой длины, детектирующей гаплотип B874 (гаплогруппа VI). Полученные данные хорошо согласуются с результатами предыдущего исследования 260 сортов мягкой пшеницы вида *T. aestivum* в ходе которого, наблюдали лишь продукты амплификации, размеры которых (1292 п.н. и 1600 п.н. (аллель *Ppd-B1a.1*) в ходе ПЦР с парой праймеров TaPpd-B1proF1–TaPpd-B1int1R1) характеризуют гаплотипы из гаплогруппы VI (Seki et al. 2011).

Фрагменты ПЦР, детектирующие принадлежность соответствующих генотипов *PPD-B1* к гаплогруппе VII, содержат комбинации из 3–4 мутаций, при этом две из них (делеция 2 п.н. и инсерция 26 п.н. на участке промотора) присутствуют во всех этих комбинациях. Отдельные мутации, которые входят в состав соответствующих гаплогрупп, могут иметь разнообразное влияние на

фенотип, и хотя влияние это до сих пор не исследовалось (за исключением инсерции 300 п.н. в аллеле *Ppd-B1a.1*), они, вероятно, могут иметь потенциал ценного генетического ресурса в селекции пшеницы. Так, все детектируемые мутации локализованы в критическом участке промотора гена *PPD-B1* (Рисунок 9.Б), то есть изменения в нуклеотидной последовательности в аналогичных участках генов ортологической серии *PPD1* вызывают изменение чувствительности к фотопериоду (Beales et al. 2007; Nishida et al. 2013; Wilhelm et al. 2009). Инсерция 3 п.н. в экзон-1 обуславливает возникновение сразу двух миссенс-мутаций – вместо одного гистидина образуется два глутамина, что может отразиться на активности белка PRR-2В. Не исключено и плеiotропное действие мутаций гена *PPD-B1* на фенотип, подобно тому, как это наблюдалось в исследовании гаплотипов гена *PPD-D1* (Guo et al. 2010; Huang et al. 2012). Установление влияния каждой из этих мутаций по отдельности или их комбинаций на фенотип может оказаться полезным в "тонкой настройке" генотипа пшеницы к условиям окружающей среды. Кроме того, пары праймеров TaPpd-B1proF1–TaPpd-B1int1R1 и TaPpd-B1proinF1–206bp_del_25_R1 можно использовать для анализа полиморфизма области промотора гена *PPD-B1* в различных видах *Triticum*, а также для получения полиморфных, кодоминантных ДНК-маркеров в генетическом анализе твердой пшеницы.

Следует отметить, что ПЦР с парой праймеров TaPpd-B1proF1–TaPpd-B1int1R1 имеет ряд недостатков, выявленных в настоящем исследовании, к которым можно отнести, во-первых, низкую специфичность и связанную с ней критичность условий амплификации, в частности температуру и время денатурации и отжига. Во-вторых, большой размер фрагментов, что обуславливает едва заметную разницу в десять нуклеотидов и делает невозможными детекцию разницы в пять и менее нуклеотидов, даже при условии электрофореза в полиакриламидных гелях с высокой разрешающей способностью. Наконец, наличие неспецифических продуктов амплификации меньшего размера, способствует их более эффективному накоплению, по сравнению с целевыми ампликонами, размеры которых превышают более чем в два раза. Всех этих недостатков лишена ПЦР с парой праймеров TaPpd-B1proinF1–206bp_del_25_R1. И несмотря на то, что при использовании данной ПЦР из анализа выпадает почти половина участка

фланкируемого предыдущей парой праймеров, тем не менее, она позволяет идентифицировать все те же гаплотипы *PPD-B1*, обусловленные альтернативными комбинациями мутаций в области промотора этого гена, что и ПЦР с парой праймеров TaPpd-B1proF1–TaPpd-B1int1R1 (Таблица 3). Однако, в обоих случаях (ПЦР с парой праймеров TaPpd-B1proF1–TaPpd-B1int1R1, также как и с праймерами TaPpd-B1proinF1–206bp_del_25_R1) отсутствует возможность выявления делеции 914 п.н. на участке промотора гена *PPD-B1* (Takenaka et al. 2012), поскольку данная делеция охватывает сайт отжига праймера TaPpd-B1proinF1. Тем не менее, вероятное присутствие данной делеции может быть установлено по отсутствию целевых продуктов амплификации, которое может являться основанием для проведения ПЦР-анализа с использованием специфических для данной делеции пары праймеров.

3.3. Анализ генов *VRN* характеризующихся низким аллельным разнообразием

3.3.1. Оценка распространенности нуль-аллелей генов *ZCCT1*

Известно, что мутации в консервативных сайтах ССТ-домена хотя и устраняют влияние мутантных белков ZCCT (*VRN2*) на подавление экспрессии локуса *VRN3*, тем не менее, даже такие мутантные белки *VRN2* способны вступать в конкурентное взаимодействие с другими ССТ-домен-содержащими белками (Li et al. 2011). Наличие нуль-аллелей обуславливает отсутствие продукта трансляции соответствующего гена *ZCCT1*, что полностью устраняет любое конкурентное взаимодействие с другими белками, содержащими ССТ-домен. В связи с этим, можно предположить, что наличие нуль-аллелей генов *ZCCT1* может отразиться на показателях тех признаков, которые непосредственно или опосредствовано регулируются генами, кодирующими ССТ-домен-содержащие белки, вступающие в конкурентное взаимодействие с белками ZCCT. Однако исследование нуль-аллельных вариантов генов *ZCCT1* проводилось только в сортах *T. aestivum* L. (Zhu et al. 2011), и в настоящее время отсутствует информация относительно их идентификации у представителей других видов полиплоидной пшеницы. В этой связи актуальным является идентификация и оценка распространенности нуль-аллельных мутантов по генам *ZCCT1* среди представителей различных видов гексаплоидной и тетраплоидной пшеницы.

Для идентификации нуль-аллелей генов *ZCCT1* ранее был предложен ПЦР-тест в котором при использовании пары праймеров, в течении одной реакции, можно провести анализ по всем гомеологичным генам *ZCCT1* одновременно (Zhu et al. 2011). В ходе ПЦР-анализа с использованием пары праймеров V2ABD-F1 и V2ABD-R2 амплифицируют участок промотора генов *ZCCT1*, который имеет различную протяженность в гомеологичных генах *ZCCT1*. При этом установлена достоверная корреляция, обусловленная высокой консервативностью нуклеотидных последовательностей сайтов отжига праймеров, между отсутствием определенного (характерного) продукта амплификации и полной делецией (нуль-аллелем) соответствующего гена *ZCCT1* (Zhu et al. 2011). Таким образом, ДНК-

маркеры, детектируемые в ходе данного ПЦР-анализа являются доминантными и не позволяют обнаружить гетерозиготу по нуль-аллелям данного гена *ZCCT1*.

В настоящем исследовании, анализ распространенности нуль-аллельных вариантов генов *ZCCT1* проводился для 77 образцов пяти видов гексаплоидной и 104 образцов шести видов тетраплоидной пшеницы из 56 стран (Мутерко и др. 2013в). Образец вида *Aegilops speltoides* Tausch (SS геном) был использован в качестве контроля.

В результате исследования 77 образцов гексаплоидной пшеницы обнаружены нуль-аллельные варианты генов *ZCCT1* в А, В и D геномах (Таблица 4). Нуль-аллельные варианты гена *ZCCT-A1* детектированы с наибольшей частотой у вида *T. macha* (60%), носители которых, согласно паспортным данным, имеют озимый тип развития. Два представителя вида *T. compactum* (из Казахстана (PI 262666) и Киргизстана (PI 41023)) были двойными мутантами по нуль-аллелям генов *ZCCT-A1* и *ZCCT-D1* (Рисунок 11). Только один образец вида *T. spelta* оказался носителем нуль-аллеля *ZCCT-B1*. Не идентифицировано ни одного нуль-аллельного варианта по генам *ZCCT1* у таких видов гексаплоидной пшеницы как *T. sphaerococcum* и *T. vavilovii*.

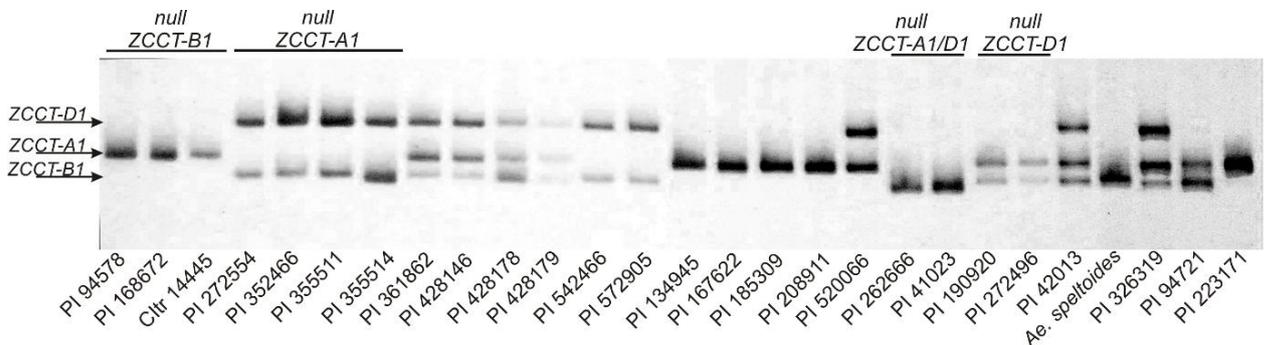


Рисунок 11. Электрофореграмма разделения продуктов амплификации области промотора генов *ZCCT1*, в ходе ПЦР-анализа дискриминирующего нуль-аллельные варианты этого гена в гомеологичных геномах полиплоидной пшеницы. Образец *Ae. speltoides* использован в качестве референсного носителя гена *ZCCT-B1*.

Среди анализируемых образцов пяти видов тетраплоидной пшеницы не выявлено ни одного нуль-аллельного мутанта по гену *ZCCT-A1*. Нуль-аллели гена *ZCCT-B1* наиболее широко распространены у вида *T. polonicum* (45%). В пшенице

видов *T. dicocum* и *T. dicoccoides* нуль-аллельных вариантов генов *ZCCT1* не обнаружено.

Таблица 4. Идентификация нуль-аллелей генов *ZCCT1* в гексаплоидной и тетраплоидной пшенице

Нуль-аллель	Образцы
<i>ZCCT-A1</i>	<i>T. spelta</i> (PI 168680, PI 295056) <i>T. macha</i> (PI 272554, PI 352466, PI 355511, PI 355514, PI 542466, PI 572905) <i>T. compactum</i> (PI 262666, PI 41023)
<i>ZCCT-B1</i>	<i>T. spelta</i> (PI 520066) <i>T. carthlicum</i> (PI 168672) <i>T. durum</i> (PI 94578) <i>T. turgidum</i> (CItr 14445, PI 213571) <i>T. polonicum</i> (PI 134945, PI 167622, PI 185309, PI 208911, PI 223171, PI 254214, PI 272564, PI 384265, UA0300219)
<i>ZCCT-D1</i>	<i>T. compactum</i> (PI 262666, PI 41023)

Количество функциональных генов *ZCCT1* характеризуется дозовым влиянием на темп развития и, согласно существующим представлениям об эпистатическом взаимодействии с другими генами *VRN*, может потенциально оказывать влияние на ряд агрономически ценных признаков, таких как морозоустойчивость, продолжительность яровизации, время колошения и прочие показатели, зависящие от функционирования регуляторной петли, сформированной генами *VRN* (Muterko et al. 2015a). На сегодняшний день не выявлено представителей мягкой пшеницы, яровой генотип которых был бы обусловлен рецессивной гомозиготой по всем генам *ZCCT*. Данное обстоятельство, вместе с отсутствием источника естественных мутантов, значительно замедляет исследование локуса *VRN2* в гексаплоидной пшенице. Установленные в настоящем исследовании нуль-аллельные варианты могут быть полезны в качестве природного генетического источника мутантов в исследовании влияния отдельных генов *ZCCT1* на качественные и количественные показатели агрономически ценных признаков пшеницы.

3.3.2. Анализ участка промотора гена *VRN-B3*

Ранее, для детекции интактного участка промотора гена *VRN-B3* и доминантного аллеля *Vrn-B3a* методом ПЦР-анализа, были предложены две пары праймеров (Yan et al. 2006). Отдельные маркеры разработаны для идентификации аллелей *vrn-B3b* и *Vrn-B3c* (Chen et al. 2013). Пара праймеров FT-B-INS-F и FT-B-INS-R амплифицирует фрагменты размером 1200 п.н. в доминантном аллеле *Vrn-B3a*, тогда как прямой праймер FT-B-NOINS-F или FT-B-NOINS-F2 в комбинации с обратным праймером FT-B-NOINS-R амплифицируют фрагменты длиной 1142 или 691 п.н., соответственно, в рецессивном аллеле *vrn-B3* с интактным промотором. Вероятно, что данные праймеры могут быть также использованы для идентификации рецессивного аллеля *vrn-B3b* по наличию ампликонов размером 2032 или 1581 п.н. Обратный праймер FT-B-INS-R отжигается на 524 п.н. выше сайта отжига праймера FT-B-NOINS-R, что приводит к существенному сокращению исследуемого участка промотора. При этом из анализа выпадает критическая для регуляции область, локализованная вблизи сайта инициации транскрипции. В этой связи, для идентификации всех известных 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 данной ПЦР, фрагменты длиной 690 и 1581 п.н. идентифицируют рецессивные аллели *vrn-B3* и *vrn-B3b*, тогда как ампликоны размером 1768 и 1744 п.н. детектируют доминантные аллели *Vrn-B3a*. Таким образом, в отличие от предыдущих доминантных ДНК- маркеров, предлагаемая маркерная система является кодоминантной.

Оптимизированная мультиплекс-ПЦР была протестирована в исследовании области промотора гена *VRN-B3* в 178 образцах шести тетраплоидных и пяти гексаплоидных видов пшеницы. В результате анализа не выявлено доминантных аллелей *VRN-B3* ни в одном из проанализированных образцов. В ходе электрофореза продуктов амплификации образца PI 225271 вида *T. spelta* детектирован фрагмент, размер которого, относительно маркера длины ДНК, составил около 1600 п.н. В результате проведения ПЦР-анализа с отдельными парами праймеров для доминантного и рецессивного аллелей было установлено,

что данный фрагмент амплифицируется с парой праймеров VRN4-B-NOINS-F2 и VRN4-B-NOINS-R, используемой в предложенной мультиплекс-ПЦР для детекции рецессивных аллелей гена *VRN-B3*. Секвенирование и анализ первичной структуры ампликонов длиной 1600 п.н. подтвердил идентичность аллеля *vrn-B3b*.

Полученные результаты подтверждают узкую распространенность доминантных аллелей *VRN-B3* не только в сортах мягкой пшеницы вида *T. aestivum* (Yan et al. 2006; Zhang et al. 2008; Iqbal et al. 2011; Chen et al. 2013; Derakhshan et al. 2013), но также и в других гексаплоидных и тетраплоидных видах. В предыдущих исследованиях аллель *vrn-B3b* идентифицирован в одном сорте мягкой пшеницы *T. aestivum* из Китая (Chen et al. 2013), а также, исходя из результатов ПЦР-анализа, вероятно в пяти сортах из Ирана (Derakhshan et al. 2013). В настоящем исследовании аллель *vrn-B3b* выявлен в образце вида *T. spelta* из Ирана, что свидетельствует о вероятном происхождении этого аллеля именно на данной географической территории и повышает вероятность его выявления именно в Иранских образцах гексаплоидной пшеницы.

3.3.3. Идентификация гена *VRN-D4*

Поскольку ген *VRN-D4* образовался в результате дупликации гена *VRN-A1* в коротком плече хромосомы 5D, он не характерен для тетраплоидных видов пшеницы, у которых D геном отсутствует. Присутствие или отсутствие гена *VRN-D4* различает его доминантный и рецессивный аллели, соответственно.

Для идентификации гена *VRN-D4* оптимизирована аллель-специфическая ПЦР (АС-ПЦР) с прямым праймером Ex4F2m3, разработанным для анализа гаплотипов экзона-4 гена *VRN-A1*, и аллель-специфическим обратным праймером V4/R2m3, разработанным к ОНП (C/A) в четвертом экзоне, различающим гены *VRN-D4* и *VRN-A1* (Kirpes et al. 2015). В ходе ПЦР-анализа 77 образцов пяти видов гексаплоидной пшеницы, целевой фрагмент размером 264 п.н., детектирующий ген *VRN-D4*, выявлен только у образцов вида *T. sphaerococcum*, при этом только у тех из них, которые не несут доминантные аллели генов *VRN1* (*VRN-B1* (1 образец) или *VRN-D1* (2 образца), поскольку все проанализированные образцы *T. sphaerococcum* рецессивны по *VRN-A1*).

Полученные результаты АС-ПЦР хорошо согласуются с широко распространенным мнением, что яровой тип развития *T. sphaerococcum* определен главным образом геном *VRN-D4* (Kippes et al. 2015).

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

Исследование аллельного разнообразия, структуры и функции генов *VRN* имеет ключевое значение в селекции пшеницы, поскольку их экспрессия влияет на ряд агрономически ценных признаков, определяющих адаптивность и урожайность культуры в условиях окружающей среды конкретного географического региона. Однако из-за особенностей распространения в пшенице аллелей различных генов *VRN*, а также их различного влияния на фенотип, наиболее актуальным является исследование генов гомеологической серии *VRN1* (Muterko et al. 2015a).

В настоящем исследовании регуляторные участки генов *VRN1* анализировались в различных видах тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы с целью оценки их генетического разнообразия и идентификации новых аллельных вариантов. Явление аномально медленной миграции изогнутых фрагментов ДНК в полиакриламидном геле было использовано в качестве базового подхода для выявления полиморфизма в регуляторном участке области промотора. В результате индивидуального генотипирования экспериментальных образцов, с помощью соответствующих ДНК-маркеров, была получена наиболее полная информация по аллельному состоянию мажорных генов *VRN* в полиплоидной пшенице (*VRN1*, *VRN-B3*, *VRN-D4*), что укрепило наблюдаемую ассоциативную связь между генотипом и фенотипом в экспериментальных растениях, а также позволило предсказать возможное влияние выявленных мутаций в регуляторных участках генов *VRN1* на фенотип.

В процессе исследования генов *VRN1* было проанализировано 178 образцов 6 видов гексаплоидной и 6 видов тетраплоидной пшеницы из 57 стран (Приложение 11, 12, 14, 15).

3.4.1. Анализ регуляторных областей гена *VRN-A1*

3.4.1.1. Идентификация нового варианта аллеля *Vrn-A1a*

В ходе электрофореза продуктов амплификации промотора гена *VRN-A1* в образцах *T. compactum* и *T. dicocum* идентифицировано две комбинации фрагментов (Рисунок 12.А): (1) 853 + 944 п.н., (2) 853 + 924 + 944 п.н., которые, в соответствии со спецификацией ПЦР с парой праймеров VRN1AF/VRN1-INT1R, детектируют варианты доминантного аллеля *Vrn-A1a* (Yan et al. 2004a). Вторая комбинация фрагментов отличается от первой наличием дополнительно ампликона длиной 924 п.н. и ранее не была охарактеризована. Идентифицированные по трем комбинациям фрагментов ПЦР варианты аллеля *Vrn-A1a* были обозначены как *Vrn-A1a.1* и *Vrn-A1a.2*, соответственно.

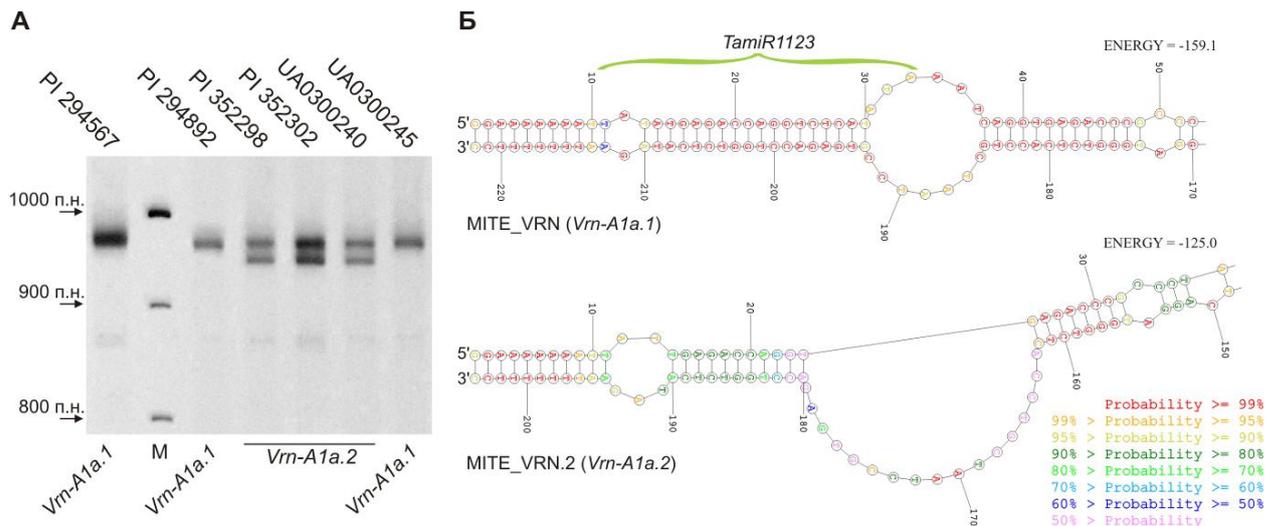


Рисунок 12. Идентификация и анализ аллельных вариантов *Vrn-A1a*, детектируемых в ходе ПЦР с парой праймеров VRN1AF/VRN1-INT1R (Muterko et al. 2016a). (А) Электрофорез в ПААГ фрагментов ПЦР участка промотора *Vrn-A1a* в образцах *T. compactum* (фрагмент 853 п.н. характеризуется очень низкой эффективностью амплификации). М – маркер длины ДНК. (Б) Участок прогнозируемой вторичной структуры РНК MITE_VRN и MITE_VRN.2 из аллелей *Vrn-A1a.1* и *Vrn-A1a.2*, соответственно. Обозначена часть последовательности, участвующая в формировании структуры шпильки, необходимой для процессирования *TamiR1123* микроРНК.

Ранее, Ян и соавторы идентифицировали два варианта *Vrn-A1a* (Yan et al. 2004a), обозначенные здесь как *Vrn-A1a.1* и *Vrn-A1a.3*, в яровых образцах гексаплоидной пшеницы вида *T. aestivum*. Тогда же было показано, что эти аллели содержат дубликацию области промотора и частично транскрибируемой последовательности гена *VRN-A1*. В настоящем исследовании аллель *Vrn-A1a.1* выявлен не только в гексаплоидной, но также и в тетраплоидной пшенице вида *T. dicoccum* (UA0300183, UA0300013), тогда как новый вариант *Vrn-A1a.2* наблюдался только в образцах гексаплоидной пшеницы (Приложение 11), что вероятно свидетельствует о его более позднем происхождении. Кроме того, идентификация в аллеле *Vrn-A1a.2* дополнительной копии участка промотора и частично транскрибируемой последовательности позволяет предположить, что образцы несущие *Vrn-A1a.2* содержат не менее двух копий гена *VRN-A1* на геном.

Ампликон размером 924 п.н., детектируемый в аллеле *Vrn-A1a.2*, был клонирован и секвенирован (GB: KR782255). В результате анализа первичной структуры данного фрагмента идентифицирована делеция 16 п.н. и 4 однонуклеотидных делеции в последовательности МГЭ MITE_VRN, инсерцированного в промотор гена *VRN-A1* (аллель *Vrn-A1a.1*, GB: AY616458). В недавнем исследовании было показано, что MITE-VRN (инсерцированный в промотор *Vrn-A1a.1*) процессирует последовательность микроРНК из 23 п.н. (*TamiR1123*) (Yu et al. 2014), которая комплементарна ранее идентифицированной *miR507* (Yao et al. 2007). Для определения влияния делеции 16 п.н. на способность формировать стабильную шпильку, которая необходима для последующего процессинга микроРНК, была проанализирована вторичная структура РНК молекулы. В результате анализа установлено, что данная делеция не только охватывает 30% последовательности кодирующей *TamiR1123*, но также нарушает формирование вторичной структуры шпильки (Рисунок 12.Б), что делает невозможным дальнейший процессинг микроРНК.

Особенности первичной структуры и последовательности инсерционного сайта характеризуют MITE_VRN как транспозон семейства Mutator-like (MULE) (Yu et al. 2014). Известно, что представители этого семейства МГЭ могут предоставлять альтернативный промотор для транскрипции (Ferguson et al. 2012). Кроме того, многие последовательности, кодирующие микроРНК, содержат мотив

ТАТА-боксы и транскрибируются РНК полимеразой II (Xie et al. 2005; Parizotto et al. 2004). В любом случае, промотор должен располагаться выше последовательности, кодирующей *TamiR1123*, поскольку активность транскрипции *TamiR1123* позитивно коррелирует с транскрипционным уровнем *Vrn-A1a.1* (Yu et al. 2014). Это справедливо в случае если *TamiR1123* и *Vrn-A1a* транскрибируются одним продуктом. Для исследования возможности совместного считывания MITE_VRN и целевого гена одним транскриптом, с промотора, локализованного в MITE_VRN, методом BLASTn проведен поиск последовательности MITE_VRN в базе данных пшеничных EST. В результате поиска было идентифицировано 9 транскриптов из 6 кластеров (Ta.98996, Ta.153105, Ta.11542, Ta.127802, Ta.219174, Ta.125868) с гомологией не менее 82% и покрытием >77% (из них 6 образцов покрывали последовательность MITE_VRN более чем на 90%). В то время как в 7 транскриптах MITE_VRN был локализован в пределах мРНК, начало двух транскриптов соответствовало позиции 24 п.н. в последовательности MITE_VRN. Результаты BLAST анализа предполагают, что альтернативный промотор может быть локализован в последовательности MITE_VRN в пределах 24 п.н. от его начала. Возможность самого продукта *TamiR1123* прямо или косвенно влиять на транскрипцию *VRN-A1* кажется маловероятной, поскольку аллель *Vrn-A1a* не является единственным источником *TamiR1123*, которые также присутствуют в образцах озимой пшеницы (Yu et al. 2014).

3.4.1.2. Идентификация нового аллеля *Vrn-A1i*

Электрофорез в ПААГ фрагментов ПЦР участка промотора *VRN-A1*, которые в агарозном геле детектировали рецессивный аллель *vrn-A1* (713 п.н.), выявил разницу в скорости миграции ампликонов. Более подвижные ампликоны мигрировали рядом с фрагментами 705 п.н., амплифицированными в образце *T. monosocum*, несущем аллель *vrn-A^m1* (Рисунок 13.А). Фрагменты ПЦР из двух образцов *T. turgidum* (PI 208912, PI 221422), образца *T. durum* (PI 74830) и референсного образца *T. monosocum* (PI 428170) были клонированы и секвенированы (GB: KM016789-KM016792). Анализ первичной структуры подтвердил идентичность аллеля *vrn-A^m1* в образце *T. monosocum* и выявил ОНП в

последовательности А-тракта VRN-бокса гена *VRN-A1* в образцах *T. turgidum* и *T. durum* (Рисунок 13.Б). В соответствии с существующей номенклатурой (Yan et al. 2004a), новый аллель гена *VRN-A1* обозначен как *Vrn-A1i*.

Трансверсия аденина в цитозин в последовательности VRN-бокса аллеля *Vrn-A1i* приводит к деструкции А-тракта (A_3 вместо A_5) и ликвидации индуцированного им локального изгиба молекулы ДНК. Кроме того, данная мутация сопровождается увеличением гибкости на данном участке, поскольку жесткие динуклеотидные шаги "АА" сменяются более гибкими динуклеотидными шагами "АС" и "СА". Анализ распределения кривизны и локальных углов изгиба молекулы ДНК на данном участке показал, что изменения в структуре А-тракта приводят к выпрямлению молекулы, придавая фрагментам ПЦР детектирующим аллель *Vrn-A1i* форму, отличную от формы фрагментов, идентифицирующих рецессивный аллель *vrn-A1* (Приложение 13). Эти изменения сопровождаются повышением скорости миграции фрагментов *Vrn-A1i* через ПААГ по сравнению с ампликонами *vrn-A1*, которые мигрируют аномально медленно вследствие их большей кривизны, детерминированной интактным А-трактом в последовательности VRN-бокса (Рисунок 13.А).

3.4.1.3. Идентификация новых вариантов аллеля *Vrn-A1b*

Следующим важным результатом, полученным в ходе электрофореза в полиакриламидных гелях продуктов амплификации гена *VRN-A1* с парой праймеров VRN1AF/VRN1-INT1R, является выявление различной подвижности фрагментов длиной, близкой к маркеру, детектирующему аллель *Vrn-A1b* (Рисунок 13.А). Данное различие не наблюдалось при разделении ампликонов в агарозных гелях или в неоптимизированных (для различения молекул ДНК с различной кривизной) условиях ПАГЭ.

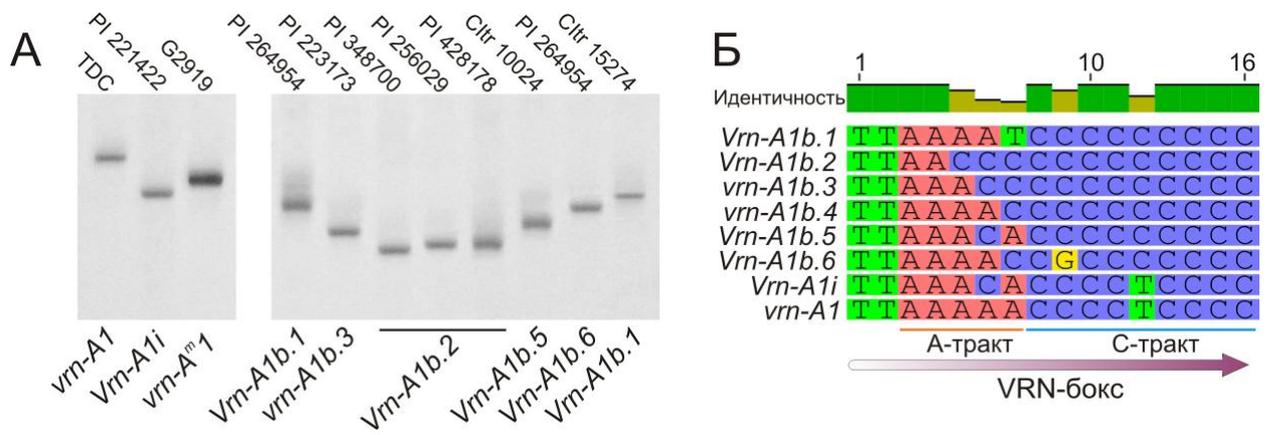


Рисунок 13. Идентификация новых аллельных вариантов гена *VRN-A1* (Muterko et al. 2016a). (А) Дискриминация аллелей *Vrn-A1i* и вариантов *Vrn-A1b* в оптимизированных условиях проведения электрофореза в ПААГ. (Б) Мутации в последовательности VRN-бокса, отличающие *Vrn-A1i* и варианты *Vrn-A1b* от рецессивного аллеля *vrn-A1*. Первичная структура VRN-бокса аллельных вариантов *Vrn-A1b* и *Vrn-A1i* характеризуется полиморфизмом А-тракта, тогда как VRN-бокc в аллелях *Vrn-A1b.5* и *Vrn-A1b.6* отличается от VRN-бокса аллелей *Vrn-A1i* и *vrn-A1b.4*, соответственно, только ОНП в С-обогащенном сегменте.

Полиморфные ампликоны были клонированы и секвенированы (GB: KM047641-KM047652, KT692944, KT692945). В результате множественного выравнивания секвенированных последовательностей с референсной последовательностью доминантного аллеля *Vrn-A1b* (GB: AY616461) было идентифицировано 6 вариантов этого аллеля. Все аллельные варианты *Vrn-A1b* содержат три общие особенности, а именно делецию протяженностью 20 п.н. в позиции -137 п.н. от стартового кодона, делецию тимина, фланкирующего 5' VRN-бокса и транзицию "Т->С" в С-обогащенном сегменте VRN-бокса. Пять вариантов (*Vrn-A1b.1-b.5*) отличались друг от друга полиморфизмом А-тракта, локализованным в пределах VRN-бокса (Рисунок 13.Б). Данные варианты обозначены как *Vrn-A1b.1* (А-тракт = "AAAAT"), *Vrn-A1b.2* (А-тракт мутировал к "AACCC"), *vrn-A1b.3* (А-тракт мутировал к "AAACC"), *vrn-A1b.4* (А-тракт мутировал к "AAAAC") и *Vrn-A1b.5* (А-тракт мутировал к "AAACA"). Вариант *Vrn-A1b.6* несет дополнительную трансверсию "С->G" в С-обогащенном сегменте VRN-бокса по сравнению с аллелем *vrn-A1b.4*. В данной классификации вариантов *Vrn-A1b*, вариант *Vrn-A1b.1* соответствует оригинальному аллелю *Vrn-A1b*, впервые

идентифицированному Yan и соавторами (Yan et al. 2004a). Следует отметить, что фрагменты ПЦР аллелей *vrn-A1b.3* и *Vrn-A1b.5*, а также аллелей *vrn-A1b.4* и *Vrn-A1b.6* мигрировали через ПААГ с подобной скоростью, что подчеркивает важность длины А-тракта VRN-бокса в определении наблюдаемого изменения в подвижности фрагментов ДНК в геле. В целом, трансверсии "А->С" в пределах А-тракта сопровождаются сокращением его длины и как следствие уменьшением кривизны ДНК молекулы на данном участке, что приводит к выпрямлению молекулы и подавлению эффекта аномально медленной миграции соответствующих фрагментов ПЦР в полиакриламидном геле.

3.4.1.4. Новый аллель *Vrn-A1j*

В ходе ПАГЭ продуктов амплификации участка промотора и экзона-1 гена *VRN-A1* у двух образцов *T. compactum* (PI 262666, PI 41023) выявлено по два целевых фрагмента. Один из них (713 п.н.) идентифицировал рецессивный аллель *vrn-A1*, тогда как другой фрагмент в условиях низкой температуры мигрировал близко к ДНК-маркерам, детектирующим доминантный аллель *Vrn-A1b.6*. Последний был выделен из геля и секвенирован (GB: KU738894). Анализ нуклеотидной последовательности выявил делецию 54 п.н. на участке -140 - -87 относительно сайта инициации транскрипции рецессивного аллеля *vrn-A1* (Рисунок 14). В соответствии с существующей номенклатурой, новый аллель обозначен как *Vrn-A1j*.

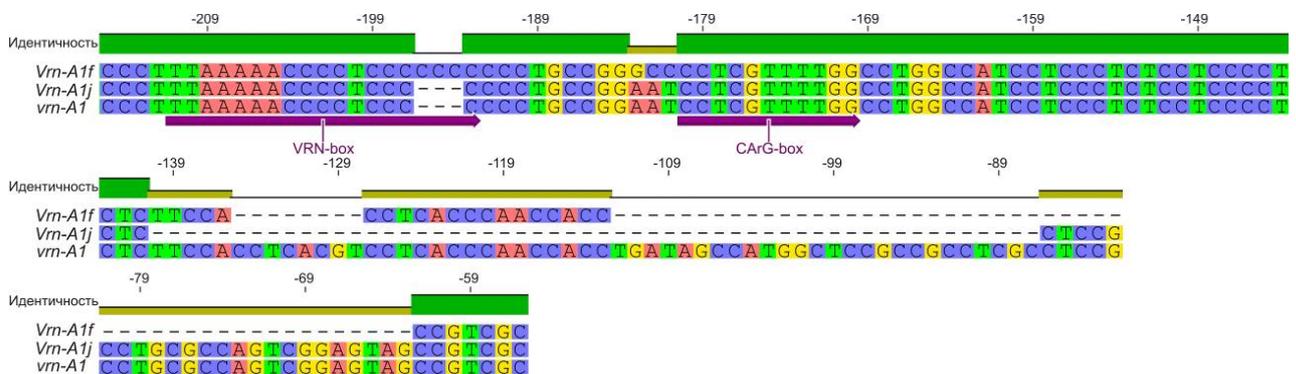


Рисунок 14. Локализация мутаций в области промотора, идентифицированного в настоящем исследовании аллеля *Vrn-A1j*.

Хотя делеция в аллеле *Vrn-A1j* на 63% перекрывается делецией 58 п.н., ранее идентифицированной в аллеле *Vrn-A1f* (Golovnina et al. 2010), тем не менее, она отличается от последней протяженностью и расположением (Рисунок 14). В частности, последовательность *Vrn-A1j* содержит интактные 24 п.н. на 3' конце, но делетированные 15 п.н. в середине и 5 п.н. на 5' конце относительно делеции *Vrn-A1f*. Кроме того, аллель *Vrn-A1f* несет также мутации, локализованные выше делеции (Golovnina et al. 2010). Данные различия между *Vrn-A1j* и *Vrn-A1f*, вероятно, будут полезны в фундаментальных исследованиях структуры и функции генов *VRN1*, в частности, при локализации регуляторных сайтов на участке промотора.

3.4.1.5. Новый аллель *Vrn-A1k*

Фрагменты ПЦР, амплифицируемые с парой праймеров VRN1AF и VRN1-INT1R в образцах PI 276015 и PI 191091 вида *T. dicoccum*, мигрировали в ПААГ близко к ампликонам ~ 760 п.н., что соответствует фрагментам, детектирующим аллель *Vrn-A1a*. Однако, данный аллель ранее идентифицирован в ограниченном количестве образцов мягкой пшеницы *T. aestivum* (Yan et al. 2004a) и не наблюдался в видах тетраплоидной пшеницы. Кроме того, гаплотип Ex4C.s экзона-4 *VRN-A1*, идентифицированный в данных образцах *T. dicoccum* (GB: KU844093), не специфичен для аллеля *Vrn-A1a*, который, в свою очередь, имеет гаплотип Ex4C.f. Анализ последовательности ДНК области промотора, экзона-1 и интрона-1 гена *VRN-A1* в образцах PI 191091 и PI 276015 выявил инсерцию 42 п.н. в позиции -122 п.н. в области промотора (Рисунок 15). Новый аллель гена *VRN-A1* был обозначен как *Vrn-A1k* (GB: KX874608).

Участок промотора, содержащий инсерцию, не перекрывается мутациями, ранее выявленными в аллельных вариантах *VRN-A1*, что делает новый аллель *Vrn-A1k* перспективным в идентификации регуляторных сайтов, а также в исследовании ассоциации полиморфизма различных участков промотора с активностью экспрессии генов *VRN1*.

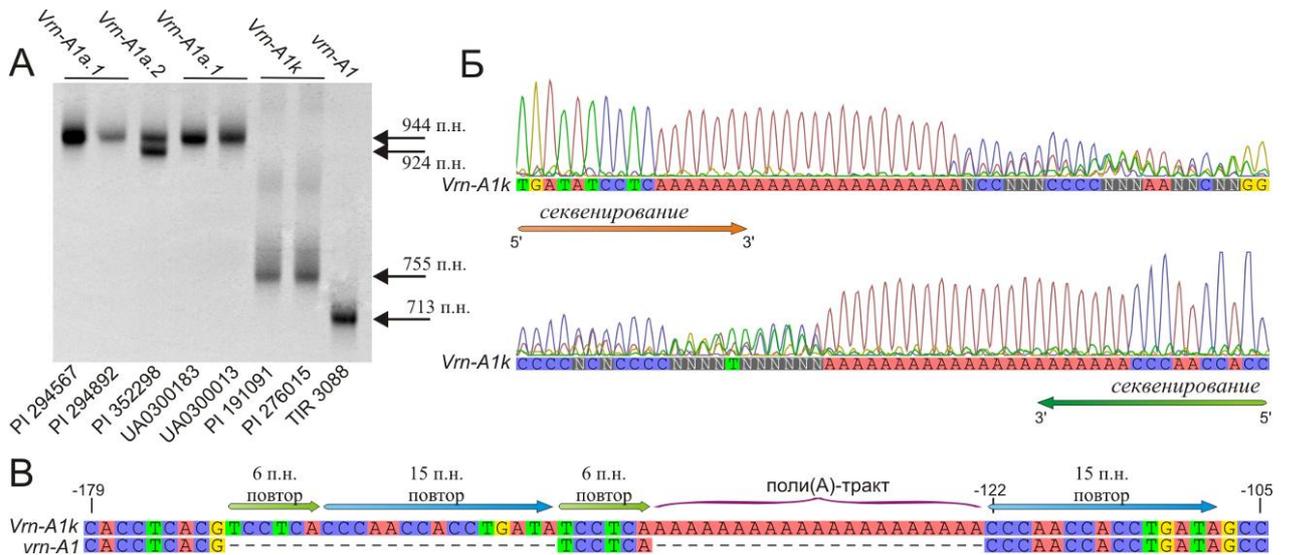


Рисунок 15. Идентификация и анализ первичной структуры аллеля *Vrn-A1k* (Мутерко и др. 2017). (А) Электрофорез продуктов ПЦР с праймерами VRN1AF и VRN1-INT1R в образцах, несущих варианты аллеля *Vrn-A1a*, аллели *Vrn-A1k* и *vrn-A1*. (Б) Секвенограммы продуктов амплификации аллеля *Vrn-A1k*, полученные для обеих цепей ДНК. (В) Локализация и структура 42 п.н. инсерции в промоторе *Vrn-A1k*.

В первичной структуре инсерции можно выделить поли-А-тракт из 21 п.н., фланкированный 15-ти нуклеотидным прямым повтором (CCCAACCACCTGATA). Мотиву этого повтора, локализованному со стороны 5' конца, предшествует 6-ти нуклеотидный прямой повтор (TCCTCA) (Рисунок 15.В). Примечательно, что расшифровка секвенограммы следующей за поли-А-трактом не представляется возможной как в прямом, так и в обратном направлении, вследствие наложения спектров флюоресценции (Рисунок 15.Б), что указывает на полиморфизм протяженности поли-А-тракта среди ампликонов. Данное предположение подтверждается наблюдением на электрофореграмме распределения продуктов ПЦР данного участка *VRN-A1k* в ПААГ, шлейфа, представленного ампликонами большей длины и их гетеродуплексами, начиная от целевого фрагмента и выше (Рисунок 15.А). Интересно, что дивергенция ампликонов происходит при длине поли-А-тракта более 21 п.н., которая соответствует приблизительно двум виткам спирали ДНК.

3.4.1.6. Анализ распространения аллелей *VRN-A1* в полиплоидной пшенице

Аллели гена *VRN-A1*, несущие мутации в области промотора, и аллели, несущие мутации в области интрона-1, распространены неравномерно в различных видах полиплоидной пшеницы (Приложение 11). В частности, около 74 % образцов несли аллели с мутациями в промоторе и только 26 % содержали протяженную делецию (7.2 кб) в первом интроне гена *VRN-A1* (аллель *Vrn-A1c* (*Langdon*)). Аллель *Vrn-A1c* (*Langdon*) детектирован только в образцах тетраплоидной пшеницы и преобладал у видов *T. durum* и *T. polonicum*. Доминантный аллель *Vrn-A1a* идентифицирован в шести образцах гексаплоидной пшеницы *T. compactum*, а также в тетраплоидной пшенице вида *T. dicoccum*. Новый аллель *Vrn-A1i* выявлен только в тетраплоидной пшенице, в 5 образцах *T. turgidum* и образце *T. durum*.

Различные варианты аллеля *Vrn-A1b* были широко распространены как в тетра- так и в гексаплоидных видах пшеницы (80 и 77 % от аллелей несущих мутации в области промотора для тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы, соответственно). Альтернативные варианты аллеля *Vrn-A1b* были представлены во всех образцах видов *T. spelta* и *T. dicoccoides*, несущих мутации в промоторе гена *VRN-A1*. Интересно, что из шести вариантов аллеля *Vrn-A1b*, канонический вариант *Vrn-A1b.1* был детектирован только в 8% случаев, тогда как в оставшихся 92 %, т.е. в подавляющем большинстве случаев, наблюдались новые варианты *Vrn-A1b.2-b.6*. Так, аллель *Vrn-A1b.2* идентифицирован во всех яровых образцах вида *T. dicoccoides* и в 42% образцов вида *T. dicoccum*. Аллель *vrn-A1b.3* преобладал в тетраплоидной пшенице *T. turgidum* (40% образцов несли этот аллель). Аллель *Vrn-A1b.6* выявлен во всех образцах *T. polonicum* с мутантным промотором гена *VRN-A1*. Оригинальный аллель *Vrn-A1b* (вариант *Vrn-A1b.1*) обнаружен только в двух образцах *T. durum* и 3 образцах *T. turgidum*. В гексаплоидной пшенице новые варианты *Vrn-A1b* были представлены практически во всех исследованных видах за исключением *T. sphaerococcum*. Наибольшее разнообразие вариантов аллеля *Vrn-A1b* выявлено среди образцов вида *T. spelta*, в котором идентифицировано три варианта этого аллеля, *Vrn-A1b.2*, *vrn-A1b.3* и *Vrn-A1b.6*.

Доминантный аллель *Vrn-A1e*, ранее идентифицированный в тетраплоидной пшенице *T. dicoccum* (Yan et al. 2004a), детектирован в образце *T. dicoccum* (GB: KT361213), а также двух образцах *T. carthlicum*.

Интересно, что новые аллели *VRN-A1*, идентифицированные в настоящем исследовании по изменению скорости миграции соответствующих фрагментов ПЦР через ПААГ (изменению кривизны и гибкости молекул ДНК), были более широко представлены в случайной выборке образцов различных видов полиплоидной пшеницы, чем известные аллели *VRN-A1*. Это может свидетельствовать о вероятном вовлечении этих аллелей в естественный отбор как полезного для организма признака.

3.4.2. Анализ регуляторных участков гена *VRN-B1*

3.4.2.1. Идентификация новых полиморфных вариантов гена *VRN-B1*

В результате анализа области промотора гена *VRN-B1* установлено, что почти все образцы вида *T. carthlicum* (за исключением PI 168672) содержат инсерцию ретротранспозона (аллель *Vrn-B1(ins)*), тогда как оставшиеся образцы характеризовались интактным промотором *VRN-B1*. Однако при определенных условиях электрофореза в полиакриамидном геле, усиливающих аномально медленную миграцию изогнутых молекул ДНК, идентифицирована разница в подвижности фрагментов ПЦР, детектирующих интактный промотор *VRN-B1* (Рисунок 16.А). Данные варианты последовательности промотора были обозначены как *VRN-B1.f*, *VRN-B1.m* и *VRN-B1.s*, в соответствии с наблюдаемой скоростью миграции соответствующих фрагментов ПЦР через ПААГ ("f" = fast, "m" = medium, "s" = slow). Наблюдаемые различия в подвижности ампликонов детектировались только в полиакриамидном геле и усиливались при снижении конформационной динамики и стабилизации формы молекул ДНК.

Для проведения более детального исследования, ампликоны *VRNB1.f*, *VRN-B1.m* и *VRN-B1.s* были клонированы и секвенированы (GB: KR782252-KR782254, KT361212). В результате анализа первичной структуры ампликонов аллеля *VRN-*

B1.s идентифицированы 8 ОНП (T102C, G174A, A297C, T341G, +360C, +370C, C558T, C729G) и три коротких делеции протяженностью 7 п.н. ("GGAAAAA"), 3 п.н. ("GTA") и 2 п.н. ("TT") относительно варианта *VRN-B1.f*, который соответствует рецессивному аллелю *vrn-B1* с интактным промотором. Аллель *VRN-B1.m* отличается от *VRN-B1.s* отсутствием делеции в 7 п.н. Кроме того, установлено что ОНП C654G и A693G, идентифицированные относительно *VRN-B1.f*, ассоциированы с аллелем *VRN-B1.m* (Рисунок 16.Б).

3.4.2.2. Полиморфизм на участке промотора гена *VRN-B1* приводит к изменению локальной кривизны ДНК молекулы

По сравнению с аллелем *VRN-B1.f*, аллель *VRN-B1.s* содержит три делеции длиной 2, 3 и 7 п.н., тогда как аллель *VRN-B1.m* отличается от *VRN-B1.s* отсутствием делеции 7 п.н. Однако, несмотря на то, что мутации в аллеле *VRN-B1.s* в общей сложности приводят к сокращению длины ампликона на 10 п.н., фрагменты *VRN-B1.s* длиной 958 п.н. мигрируют через ПААГ намного медленнее чем фрагменты *VRN-B1.f* длиной 968 п.н. (Рисунок 16.А). Так, разница между фрагментами ПЦР, детектирующими аллели *VRN-B1.s* и *VRN-B1.f*, измеренная относительно маркера длины ДНК, в условиях, усиливающих аномально медленную миграцию искривленных молекул ДНК через ПААГ составляла более 100 п.н. Аналогично ампликоны *VRN-B1.m* длиной 965 п.н. мигрировали в полиакриламидных гелях быстрее, чем ампликоны *VRN-B1.s* (958 п.н.), но медленнее чем *VRN-B1.f* (968 п.н.). Как было показано ранее, изогнутые молекулы ДНК характеризуются аномально медленной миграцией в ПААГ, но не в агарозных (Marini et al. 1982; Diekmann 1989), что главным образом обусловлено протяженностью и локализацией А-трактов (Diekmann 1992; Koo et al. 1986; Hagerman 1990).

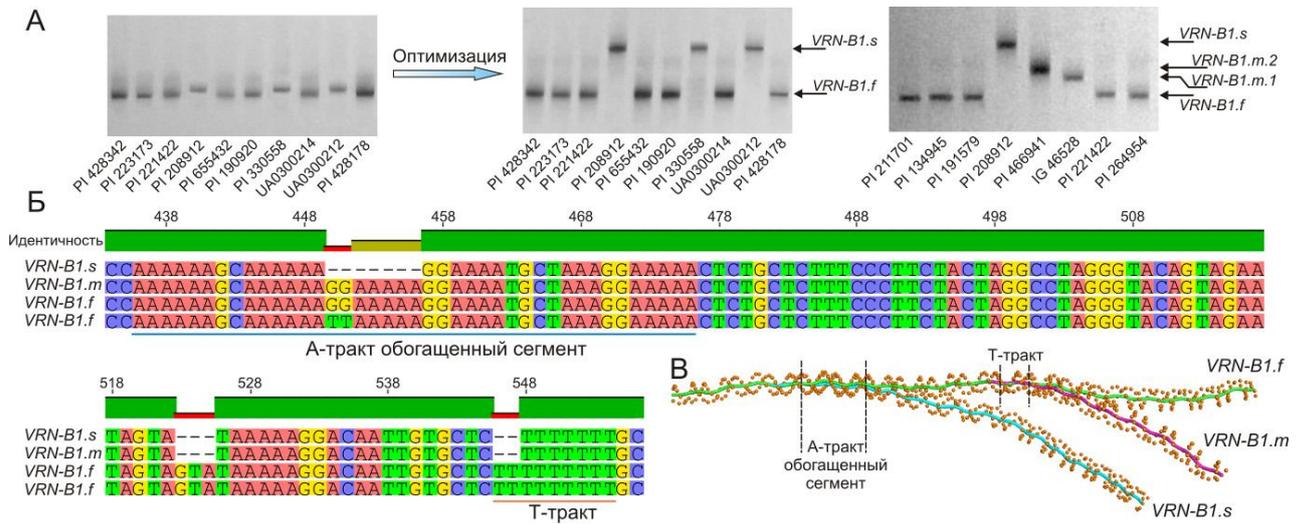


Рисунок 16. Идентификация и анализ мутаций в области промотора *VRN-B1*, различающие три аллельных варианта этого гена (Muterko et al. 2016a). (А) Идентификация вариантов *VRN-B1* в ходе ПЦР с парой праймеров Pr1 и Pr2. Разделение фрагментов ПЦР в условиях низкой конформационной динамики молекул ДНК способствует надежной дискриминации альтернативных вариантов последовательности промотора *VRN-B1*. 1 – не оптимизированный ПАГЭ при комнатной температуре без охлаждения в 10 % геле (моно/бис-акриламид 29:1) при 5 В/см; 2 – те же ампликоны сепарированы в ПААГ оптимизированном для низкотемпературных условий; 3 – оценка вклада изгибов молекулы ДНК, обусловленных делециями 7, 3 и 2 п.н. в аномально медленную миграцию фрагментов *VRN-B1.s* и *VRN-B1.m*; наблюдается расщепление *VRN-B1.m* на 2 варианта. (Б) Сравнение последовательностей ДНК центрального участка ампликонов, детектирующие варианты *VRN-B1*. Данный участок содержит 3 делеции в аллеле *VRN-B1.s*, две из которых, локализованные в А-тракт обогащенном сегменте и Т-тракте, обуславливают возникновение локальных изгибов и приводят к увеличению кривизны молекулы ДНК. Позиции п.н. обозначены относительно начала ампликона *VRN-B1.f*. (В) Суперпозиция предсказываемых пространственных структур молекул ДНК для фрагментов ПЦР, детектирующие альтернативные варианты последовательности промотора гена *VRN-B1*. Обозначены места локализации изгибов ДНК, обусловленные делециями 7 и 2 п.н. в А-тракт обогащенном сегменте и Т-тракте.

Делеции 7 п.н. и 2 п.н. локализованы в последовательностях А-трактов, которые в свою очередь, расположены вблизи центра фрагмента. Оба этих фактора вносят существенный вклад в изменение кривизны молекулы ДНК, приводя к наблюдаемой аномально медленной миграции фрагментов *VRN-B1.s* и *VRN-B1.m* через ПААГ по сравнению с фрагментами *VRN-B1.f*. Делеция 2 п.н. сокращает протяженность Т-тракта с 9 до 7 п.н. Как ранее было показано Коо и соавторами (Коо et al. 1986), с сокращением длины А-тракта кривизна ДНК молекулы усиливается, пока его длина больше 7 п.н., сокращение кривизны происходит из-за антифазной компенсации эквивалентных изгибов в противоположном направлении. Следовательно, сокращение длины Т-тракта с 9 до 7 нуклеотидов сопровождается увеличением локальной кривизны данного сегмента молекулы ДНК, что объясняет вклад делеции 2 п.н. в аномально медленную миграцию фрагментов *VRN-B1.s* и *VRN-B1.m*. Более дистальная делеция 7 п.н. локализована в А-тракт-богатом сегменте, охватывающем участок промотора от -549 до -509 п.н. относительно стартового кодона интактной последовательности *VRN-B1* (*VRN-B1.f*). Данный участок содержит 6 А-трактов, которые разделены динуклеотидными шагами "GC" или "GG". Изгибы, индуцируемые первым, третьим и пятым А-трактом, компенсируются изгибами, обусловленными вторым, четвертым и шестым А-трактом, соответственно, которые ориентированы в противоположном направлении. В результате кривизна данного участка незначительна. Однако в фрагменте *VRN-B1.s* четвертый А-тракт не компенсирован противоположным изгибом третьего А-тракта вследствие его отсутствия из-за делеции 7 п.н (Рисунок 16.Б). Это приводит к увеличению локальной кривизны молекулы ДНК и еще большему замедлению фрагментов *VRN-B1.s* в полиакриамидном геле по сравнению с ампликонами *VRN-B1.m*. Детектирован полиморфизм динуклеотидных шагов, разделяющих второй и третий А-тракты в промоторе *VRN-B1.f* в разных видах пшеницы. В результате сравнения этого участка в 15 образцах, доступных в GenBank, было установлено, что последовательности, полученные из видов *T. dicoccoides* и *T. turgidum*, содержат динуклеотид "GG", тогда как последовательности *VRN-B1.f* в видах *T. aestivum*, *T. durum*, *T. polonicum* и *T. carthlicum* содержат динуклеотид "TT".

Для определения вклада делеции 7 п.н. в А-тракт-богатом сегменте в изменение кривизны молекулы ДНК и наблюдаемого замедления ампликонов *VRN-B1.s* в ПААГ, фрагменты ПЦР образцов PI 208912 (*VRN-B1.s*), PI 466941 (*VRN-B1.m*), IG 46528 (последовательность которого соответствует *VRN-B1.m* (GB: KM586665)) и PI 191579 (*VRN-B1.f*) были проанализированы в одинаковых условиях электрофореза (Рисунок 16.А). В результате анализа установлено, что вклад 7 п.н. делеции в замедление ампликонов *VRN-B1.s* лишь незначительно (5-10 %) преобладает над вкладом делеции 2 п.н. в Т-тракте. Таким образом, обе делеции вносят практически равноценный вклад в замедление фрагментов ПЦР, детектирующих *VRN-B1.s* при их миграции через ПААГ. Кроме того было обнаружено, что ампликоны, полученные в образце IG 46528 (*VRN-B1.m.1*), мигрируют незначительно быстрее, чем ампликоны из образца PI 466941 (*VRN-B1.m.2*), при том, что оба образца характеризуются последовательностью аллеля *VRN-B1.m*. Выравнивание нуклеотидных последовательностей данных ампликонов выявили делецию тимина в позиции 230 п.н. от начала ампликона и трансверсию G341T нарушающую короткий А-тракт ("АТТ") в последовательности *VRN-B1.m.1*, что, возможно, объясняет наблюдаемую разницу в подвижности альтернативных фрагментов аллеля *VRN-B1.m*.

Следует отметить, что вариабельность участка промотора гена *VRN-B1*, включающая делеции 7, 3 и 2 п.н., была выявлена в параллельном исследовании *T. dicoccoides* (Shcherban et al. 2015). Однако в настоящем исследовании впервые оценено распространение вариантов последовательности промотора *VRN-B1* в многочисленных видах полиплоидной пшеницы, предложен быстрый и надежный метод их идентификации, а также проводится исследование возможной ассоциации данных аллелей с фенотипом.

3.4.2.3. Распространение аллелей *VRN-B1* в полиплоидной пшенице

Анализ распространения вариантов *VRN-B1* с альтернативными последовательностями промотора показал, что аллель *VRN-B1.f* широко распространен как в озимой, так и яровой полиплоидной пшенице, тогда как аллель *VRN-B1.s* идентифицирован преимущественно в образцах, которые согласно

паспортным или экспериментальным данным, характеризовались яровым типом развития. Распространение вариантов *VRN-B1* среди видов гексаплоидной пшеницы не одинаково. Так аллель *VRN-B1.s* выявлен только в образцах вида *T. compactum* и *T. spelta*. Резкое снижение аллельного разнообразия вариантов промотора *VRN-B1*, вероятно, связанное с эффектом "бутылочного горлышка" и "эффектом основателя", сопровождавшие видообразование, наблюдалось в таких видах как *T. macha*, *T. vavilovii* и *T. sphaerococcum*, где все анализируемые образцы несли вариант *VRN-B1.f*. В тетраплоидной пшенице все виды за исключением образцов *T. carthlicum*, содержащих инсерцию МГЭ в области промотора, характеризовались более равномерным распределением вариантов *VRN-B1*, среди которых преобладал аллель *VRN-B1.f*. Аллель *VRN-B1.m* детектирован только в двух образцах *T. dicoccoides* (PI 352322, PI 466941). Интересно, что все образцы *T. polonicum*, несущие аллель *Vrn-A1c*, ассоциированы с *VRN-B1.s*, тогда как образцы этого вида, содержащие аллель *Vrn-A1b.6*, характеризуются вариантом *VRN-B1.f*. Аналогично, вариант *VRN-B1.s* идентифицирован в образцах *T. spelta* с *Vrn-A1b.2*.

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* (Рисунок 17). Данный вариант ПЦР детектирует фрагменты длиной 1531, 1091, 1055 и 705 п.н. в аллелях *vrn-B1*, *Vrn-B1a*, *Vrn-B1b* и *Vrn-B1c*, соответственно. Доминантные аллели *VRN-B1* с мутантным интроном-1 преобладали в гексаплоидных видах пшеницы (Приложение 11). 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*. В гексаплоидной пшенице аллель *Vrn-B1c* выявлен в образцах видов *T. spelta* (33 %), *T. macha* (один образец) и *T. sphaerococcum* (один образец), тогда как *Vrn-B1a* идентифицирован только в образцах вида *T. compactum* (50 %).

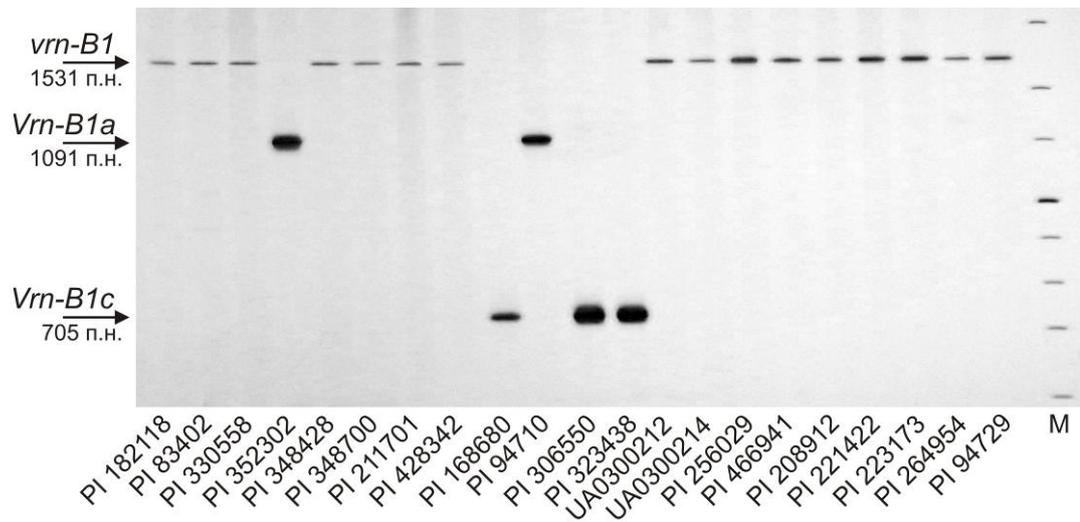


Рисунок 17. ПЦР-анализ первого интрона гена *VRN-B1* в различных видах тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы (Muterko et al. 2016a). Обозначены целевые фрагменты ПЦР, идентифицирующие различные аллельные варианты гена *VRN-B1*.

Таким образом, доминантный аллель *Vrn-B1c* более широко распространен в тетраплоидной и гексаплоидной пшенице, чем аллели *Vrn-B1a* или *Vrn-B1b*. Кроме того, в большинстве случаев, образцы несущие доминантные аллели гена *VRN-B1* также содержат доминантные аллели гена *VRN-A1* (дигенно-доминантные). Интересно, что все образцы *T. compactum*, доминантные по *VRN-B1*, характеризовались аллелем *Vrn-B1a*, тогда как аналогичные образцы *T. spelta* несли исключительно аллель *Vrn-B1c*.

3.4.3. Особенности детекции новых аллелей генов *VRN-A1* и *VRN-B1*

Различие в кривизне и гибкости молекул ДНК, вызванное мутациями в последовательности VRN-боксов аллельных вариантов гена *VRN-A1* или делециями в А-трактах в вариантах промотора *VRN-B1* приводит к модуляции скорости миграции соответствующих фрагментов ПЦР. Более 25 лет назад было показано, что аномальная миграция изогнутых молекул ДНК в полиакриламидных гелях позволяет детектировать незначительную последовательность-специфическую вариабельность структуры ДНК (Diekmann 1989). В настоящем исследовании было обнаружено, что чувствительность скорости миграции фрагментов ПЦР через

ПААГ к кривизне молекул ДНК является хорошим основанием для разработки простого и быстрого способа дискриминации новых аллелей генов *VRN-A1* и *VRN-B1*. Тем не менее, идентификация этих вариантов требует специфических условий проведения электрофореза. Следовательно, данные условия были оптимизированы для получения минимальных потерь в разрешающей способности при электрофорезе, запущенном как при низкой, так и при комнатной температуре.

Например, как видно из рисунка 16.А, при обычных условиях проведения нейтрального ПАГЭ разница между фрагментами, детектирующими альтернативные варианты последовательности промотора гена *VRN-B1*, является незначительной или вовсе отсутствует, тогда как оптимизация ПАГЭ приводит к появлению четких различий между ними. К примеру, электрофорез в агарозных или полиакриамидных гелях при стандартных условиях не позволяет обнаружить разницу между вариантами *Vrn-A1b*. В результате, аллели *vrn-A1b.3* и *vrn-A1b.4*, ассоциированные с озимым типом развития, могут быть ошибочно идентифицированы как известный доминантный аллель *Vrn-A1b*, который ассоциирован с яровым типом развития. Данная ситуация уже неоднократно наблюдалась в предыдущих исследованиях аллельного разнообразия гена *VRN-A1* в тетраплоидной и гексаплоидной пшенице, вводя в заблуждение самих исследователей и порождая ошибочные предположения (Derakhshani et al. 2013; Shcherban et al. 2015).

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

Согласно паспортным данным почти все образцы, в которых детектирован аллель *vrn-A1b.3* характеризуются озимым типом развития. Исключение составляли только два образца *T. spelta* (PI 306550, PI 323438), в которых также присутствует аллель *Vrn-B1c* (обуславливает отсутствие потребности в яровизации). Часть образцов, несущих аллель *vrn-A1b.3* были выращены в теплице в отсутствии яровизации на удлиненном фотопериоде (>15 ч) и генотипированы с использованием ДНК-маркеров к генам *VRN* (Таблица 5). Образцы PI 428342, PI 655432 и UA0300214 (*vrn-A1b.3*, *VRN-B1.f*) не вышли в трубку до окончания

эксперимента (120 дней). Только образец *T. turgidum* PI 223173 (*vrn-A1b.3*, *VRN-B1.s*) характеризовался поздним колошением (128 дней). Полученные результаты подтверждают сохранение потребности в яровизации и озимый тип развития для образцов с аллелем *vrn-A1b.3*. Аналогично образец *T. dicoccoides* (PI 466941), несущий аллель *vrn-A1b.4*, в соответствии с паспортными данными является озимым, и это было подтверждено экспериментально (не вышел в трубку до завершения эксперимента, 120 дней). В отличие от последних, образцы, несущие аллели *Vrn-A1b.2* и *Vrn-A1b.5* согласно паспорту, являются яровыми и это было подтверждено экспериментально путем их выращивания в теплице без яровизации. Тем не менее, почти все образцы с *Vrn-A1b.2* несут также *VRN-B1.s* и/или доминантные аллели других генов *VRN1* (*VRN-B1/D1*). Только образцы PI 428178 (*T. macha*) и PI 190920 (*T. dicoccum*) были исключением.

Таблица 5. Генотип и сроки колошения экспериментальных образцов пшеницы выращенных на удлиненном фотопериоде (16 ч) и без яровизации.

Вид	ID	VRN генотип	Колошение (±2 дня)
<i>T. sphaerococcum</i>	PI 182118	<i>vrn-A1/vrn-B1 (VRN-B1.f)/vrn-D1/vrn-B3</i>	53
	PI 83402	<i>vrn-A1/vrn-B1 (VRN-B1.f)/Vrn-D1a/vrn-B3</i>	72
<i>T. spelta</i>	PI 168680	<i>vrn-A1b.3/Vrn-B1c (VRN-B1.f)/vrn-D1/vrn-B3</i>	67
	PI 330558	<i>Vrn-A1b.2/vrn-B1 (VRN-B1.s)/Vrn-D1s/vrn-B3</i>	59
	PI 348428	<i>Vrn-A1b.2/vrn-B1 (VRN-B1.s)/Vrn-D1s/vrn-B3</i>	61
	PI 348700	<i>Vrn-A1b.2/vrn-B1 (VRN-B1.s)/Vrn-D1s/vrn-B3</i>	60
<i>T. compactum</i>	PI 211701	<i>vrn-A1/vrn-B1 (VRN-B1.f)/Vrn-D1s/vrn-B3</i>	77
<i>T. vavilovii</i>	PI 428342	<i>vrn-A1b.3/vrn-B1 (VRN-B1.f)/vrn-D1/vrn-B3</i>	-
<i>T. dicoccum</i>	UA0300212	<i>Vrn-A1b.5/vrn-B1 (VRN-B1.s)/vrn-B3</i>	46
	UA0300214	<i>vrn-A1b.3/vrn-B1 (VRN-B1.f)/vrn-B3</i>	-
<i>T. dicoccoides</i>	PI 256029	<i>Vrn-A1b.2/vrn-B1 (VRN-B1.s)/vrn-B3</i>	66*
	PI 466941	<i>vrn-A1b.4/vrn-B1 (VRN-</i>	-

Вид	ID	VRN генотип	Колошение (±2 дня)
		<i>B1.m.2)/vrn-B3</i>	
<i>T. turgidum</i>	PI 208912	<i>Vrn-A1i/vrn-B1 (VRN-B1.s)/vrn-B3</i>	77
	PI 221422	<i>Vrn-A1i/vrn-B1 (VRN-B1.f)/vrn-B3</i>	102
	PI 223173	<i>vrn-A1b.3/vrn-B1 (VRN-B1.s)/vrn-B3</i>	128
	PI 264954	<i>Vrn-A1b.1/vrn-B1 (VRN-B1.f)/vrn-B3</i>	68
<i>T. durum</i>	PI 94729	<i>Vrn-A1c/vrn-B1 (VRN-B1.f)/vrn-B3</i>	54
	PI 74830	<i>Vrn-A1i/vrn-B1 (VRN-B1.s)/vrn-B3</i>	76
	PI 655432	<i>vrn-A1b.3/vrn-B1 (VRN-B1.f)/vrn-B3</i>	-
<i>T. carthlicum</i>	PI 532505	<i>vrn-A1/Vrn-B1(ins)/vrn-B3</i>	61

* PI 256029, содержит *Vrn-A1b.2*, вышел в трубку на 7 дней раньше, чем PI 264954, несущий *Vrn-A1b.1*

Два образца, в которых идентифицирован аллель *Vrn-A1i* (PI 208912 и PI 74830), согласно паспорту, являются яровыми, тогда как четыре других – озимыми. Однако при выращивании данных яровых и озимых (PI 221422) образцов все они выколашивались без яровизации, хотя даты колошения были значительно более поздними, чем у образцов моногенно-доминантных по *VRN-A1* или *VRN-B1*. Образец PI 221422 (озимый по паспорту) выколосился на 25 дней позже, чем образцы PI 208912, PI 74830 (яровые по паспорту), при этом генотипирование этих образцов не выявило у них доминантных аллелей генов *VRN-B1* и *VRN-B3*. В связи с этим предполагается, что снижение чувствительности к яровизации и факультативный тип развития для образцов, несущих *Vrn-A1i*.

Образец *T. dicocum*, несущий аллель *Vrn-A1b.5* (UA0300212) выколашивался на 22 дня раньше, чем *Vrn-A1b.1* (PI 264954). Аналогично, образцы с *Vrn-A1i* PI 208912 и PI 74830 выколашивались на 25 дней раньше, чем образец PI 221422. Аллель *Vrn-A1b.5* характеризуется мутацией VRN-бокса, аналогичной аллелю *Vrn-A1i*, но также содержит дополнительные мутации общие для всех вариантов аллеля *Vrn-A1b*. Интересно, что во всех случаях более ранние образцы (UA0300212, PI 208912, PI 74830) несли *VRN-B1.s*. Кроме того, *VRN-B1.s* был детектирован в образце PI 223173, который показал позднее колошение, в отличие от озимых образцов, также несущих аллель *vrn-A1b.3*, но имеющих аллель *VRN-B1.f*. Данные наблюдения предполагают ассоциацию между *VRN-B1.s*, снижением чувствительности к яровизации и ранним колошением. Хотя влияние мутаций в

аллеле *VRN-B1.s* на время колошения кажется маловероятным, поскольку данные мутации локализованы на значительном расстоянии от стартового кодона, они могут действовать как дистальный энхансер или сайленсер. Кроме того, мы также не можем исключать, что значительные изгибы в молекуле ДНК, наблюдаемые в области промотора *VRN-B1.s*, могут способствовать взаимодействию между удаленным энхансером и регуляторными сайтами в промоторе гена *VRN-B1*, активируя транскрипцию через выпетливание ДНК. Наконец в недавнем исследовании была выявлена ассоциация инсерции в участок промотора гена *VRN-D1*, которая локализована на 600 п.н. выше сайта инициации транскрипции (что более чем на 60 п.н. выше А-тракт обогащенного сегмента) с повышением уровня транскрипции этого гена (Zhang et al. 2015). Тем не менее, в то время как фенотипический эффект мутаций, идентифицированных в промоторе *VRN-B1.s* и *VRN-B1.m*, требует дальнейшего изучения, альтернативные аллельные варианты *VRN-B1* могут быть использованы в качестве полиморфных кодоминантных ДНК-маркеров в генетическом анализе и MAS.

Кроме того, было обнаружено, что образец UA0300212 (*Vrn-A1b.5*, *VRN-B1.s*) выколашивался на 30 дней раньше, чем PI 208912 и PI 74830 (с генотипом *Vrn-A1i*, *VRN-B1.s*). Эта разница приблизительно соответствует разнице во времени колошения, полученной для образцов PI 264954 (*Vrn-A1b.1*, *VRN-B1.f*) и PI 221422 (*Vrn-A1i*, *VRN-B1.f*), которая составляла 34 дня. В обоих случаях, в сравниваемых образцах не выявлено доминантных аллелей *VRN-B1* и *VRN-B3*, они несут тот же аллель *VRN-B1* и отличаются только аллелями *VRN-A1* с общей особенностью - транзиция "Т->С" в последовательности С-богатого участка, локализованного в пределах VRN-бокса.

Согласно паспортным данным, образцы *T. compactum* PI 262666 и PI 41023, несущие аллель *Vrn-A1j*, характеризуются яровым типом развития. Однако в ходе ДНК-маркерного анализа установлено, что данные образцы также содержат доминантные аллели *Vrn-B1a* и *Vrn-D1a*. Образцы *T. compactum* PI 262666, PI 41023 (*vrn-A1/Vrn-A1j/Vrn-B1a/Vrn-D1a*), PI 278541 (*vrn-A1/Vrn-B1a/vrn-D1*) и PI 186391 (*vrn-A1/vrn-B1/Vrn-D1a*) выращивались в тепличных условиях на удлинённом фотопериоде (24 ч) и без яровизации. Носители аллеля *Vrn-A1j* выколосились на 52 и 84 дня раньше образцов, моногенно-доминантных по *Vrn-B1a* и *Vrn-D1a*,

соответственно. Тем не менее, необходимо проведение генетического анализа для подтверждения ассоциации аллеля *Vrn-A1j* со снижением чувствительности к яровизации.

Образцы *T. dicoosum* PI 191091 и PI 276015, в которых детектирован аллель *Vrn-A1k*, согласно паспорту, являются яровыми. Кроме того, по результатам ДНК-маркерного анализа не обнаружено доминантных аллелей *VRN-B1* и *VRN-B3* в данных образцах *T. dicoosum*. В этой связи, предполагается, что инсерция в промоторе аллеля *Vrn-A1k* обуславливает снижение потребности в яровизации и факультативный тип развития. Образец PI 191091, выращенный в теплице, без предварительной яровизации, на 24 часовом фотопериоде выколосился на 92 день, что согласуется с паспортным временем цветения (99 дней). Генотипирование данного образца с использованием ДНК-маркеров к известным аллелям генов *VRN1* и *VRN-B3* подтвердило наличие аллеля *Vrn-A1k* и рецессивных аллелей генов *VRN-B1* и *VRN-B3*.

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

Полиморфизм четырех участков промотора отличает рецессивный аллель *vrn-A1* от аллельных вариантов *Vrn-A1b*. Сюда относятся полиморфизм А-тракта и С-богатого сегмента в VRN-боксе, делеция 20 п.н. и делеция "Т" выше и ниже VRN-бокса, соответственно. Установлено, что делеция выше, точно также, как и делеция 20 п.н. ниже VRN-бокса, вероятно, не критичны для индукции транскрипции этого аллеля в отсутствие яровизации, поскольку идентифицированы только в вариантах *Vrn-A1b* и отсутствуют в других доминантных аллелях *VRN1* с мутантным VRN-боксом, таких как *Vrn-A1i*, *Vrn-A^m1g*, *Vrn-A^m1a*. Кроме того, аллели *vrn-A1b.3* и *vrn-A1b.4*, также несущие эти мутации, идентифицированы исключительно в озимых образцах. В этой связи предполагается, что именно полиморфизм VRN-бокса определяет снижение чувствительности к яровизации образцов с доминантными аллельными вариантами *Vrn-A1b*. Тем не менее, нельзя исключать того, что влияние мутаций вне VRN-бокса, проявляется только в ассоциации со специфическими мутациями внутри VRN-бокса. Ранее VRN-бокс был предложен как альтернативный регуляторный сайт ответа на яровизацию генов *VRN1* (Pidal et

al. 2009). В результате множественного выравнивания большинства известных аллелей гена *VRN-A1*, несущих мутации в области промотора, которые влияют на потребность пшеницы в яровизации (*Vrn-A1a*, *Vrn-A1b*, *Vrn-A^m1a*, *Vrn-A1d*, *Vrn-A1e*, *Vrn-A^m1g*, *Vrn-A1h* и *Vrn-A1i*) установлено, что все они содержат мутации в последовательности VRN-бокса, такие как ОНП, инсерции/делеции или его полное удаление (Рисунок 18). Этот результат подчеркивает важность последовательности VRN-бокса в регуляции транскрипции *VRN1* и в ответе пшеницы на яровизацию.

Интересно, что мутации в новых доминантных аллелях *Vrn-A1j* и *Vrn-A1k*, в отличие от большинства известных доминантных аллелей гена *VRN-A1*, несущих мутации в области промотора, локализованы 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.

В целом, полиморфизм VRN-бокса обусловлен, главным образом, мутациями в первичной структуре А-тракта и С-богатого сегмента. Настоящее исследование предполагает, что мутации в обоих этих участках влияют на экспрессию генов *VRN1*. В частности, это влияние проявлялось в наличии или отсутствии потребности в яровизации и различии в сроках колошения образцов с мутантным VRN-боксом гена *VRN-A1*. 5'-конец VRN-бокса содержит Т-повтор и А-тракт. Ранее отмечалось, что хотя эта последовательность имеет значительное сходство с ТАТА-боксом, кажется маловероятным, что данный участок играет хоть какую-нибудь существенную роль в инициации транскрипции *VRN1*, поскольку доминантные аллели, в которых VRN-бокс полностью поглощен делецией, характеризуются таким же уровнем экспрессии *VRN1*, как и интактный ген. Действительно, область промотора, содержащая А-тракт и Т-повтор ("ТТААААА"), показывает хорошую корреляцию с ТАТА-боксом, в соответствии с позиционными весовыми матрицами (Bucher 1990). Кроме того, на данном участке предсказывается ТАТА-бокс при анализе более чем 1500 п.н. выше стартового кодона генов *VRN1* из А, В и D геномов с использованием различных инструментов для предсказания промоторов генов растений, таких как TSSP (Solovyev et al.

2003), NSITE-PL (Solovyev et al. 2010) и PlantCARE (Lescot et al. 2002). В последнем случае последовательность "ТТТААААА" была идентифицирована как коровый элемент промотора гена *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gpc2)* в *Zea mays*. Тем не менее, VRN-бокс в аллелях *Vrn-A1d*, *Vrn-A1e* и *Vrn-A^m1g* полностью делетирован. Предполагается, что транскрипция этих аллелей инициируется с альтернативного промотора, который локализован выше VRN-бокса. В любом случае, где бы не располагался промотор (до или в структуре VRN-бокса), вероятно, что при наличии интактного VRN-бокса транскрипция блокирована гипотетическим репрессором, который связывается с последовательностью этого регуляторного элемента.

Обычно, считается, что аффинность белка к ДНК включает в себя аддитивный вклад нуклеотидов, локализованных внутри целевой последовательности. Однако детерминированные первичной структурой особенности пространственной организации молекулы ДНК и ее деформируемость являются компонентами так называемого "косвенного считывания" ("indirect readout"), основного источника неаддитивности при специфическом ДНК-белковом узнавании (Travers 1995). К примеру, ТАТА-боксы, содержащие 3-4 консервативных аденина имеют жесткую, контекстно-независимую кооперативную структуру, связывание белка с которой лучше описывается неаддитивной моделью ближайшего соседа (Faiger et al. 2007). В соответствии с этой моделью, ТАТА-связывающиеся белки (ТВР)/ТАТА-бокс система является специфическим ДНК-белковым комплексом, где ДНК конформация используется только в крайнем случае, а взаимодействие осуществляется главным образом посредством "косвенного считывания" (Kim et al. 1993; Nikolov et al. 1996; Juo et al. 1996; Patikoglou et al. 1999). В частности, среди структурных сигналов для распознавания ТАТА-бокса ТВР может выступать угол торсионного закручивания двойной спирали в середине ТАТА-бокса, а также распознавание глобальной гибкости молекулы ДНК (Bareket-Samish et al. 2000). Однако, в случае с полиморфизмом А-тракта, выявленном в настоящем исследовании, аддитивные и неаддитивные компоненты не могут быть четко разделены, поскольку нуклеотидная последовательность (длина) А-тракта (аддитивный компонент) определяет гибкость и пространственную структуру (форму) молекулы ДНК на данном участке (неаддитивный компонент).

Аллельные варианты *Vrn-A1b*, ассоциированные с озимым и яровым типом развития, а также аллели *vrn-A1* и *Vrn-A1i*, отличающиеся друг от друга только одним или несколькими ОНП в последовательности А-тракта VRN-бокса, ассоциированы с различной потребностью в яровизации и различием во времени колошения пшеницы. В этой связи предполагается, что именно полиморфизм А-тракта в VRN-боксе вносит основной вклад в модуляцию экспрессии гена *VRN1*. В настоящее время уже очевидным является факт, что в связи с уникальной структурой и способностью влиять на локальную кривизну ДНК, А-тракты предоставляют общий генетический механизм для регуляции активности промотора с помощью различных транскрипционных факторов и тонкой настройки экспрессии на предсказуемой основе, с разрешением, которое может быть даже выше, чем достигаемое за счет редактирования сайтов связывания с транскрипционными факторами (Raveh-Sadka et al. 2012). Функциональная активность таких элементов промотора, главным образом, зависит от их внутренней структуры, а не от взаимодействия с специфичными к последовательности, ДНК-связывающими белками (Iyer et al. 1995). В настоящем исследовании показано, что полиморфизм А-тракта в VRN-боксе сопровождается изменением кривизны и гибкости молекул ДНК (Рисунок 18). Следовательно, нельзя исключать, что данное изменения кривизны и гибкости ДНК может оказывать влияние на силу связывания гипотетических белков или их комплексов, подавляющих транскрипцию *VRN1* с регуляторной последовательностью VRN-бокса (или фланкирующих его участков). Например, ранее было показано, что наличие А-трактов, фланкирующих CArG-бокс может способствовать формированию петли ДНК, связывающей некоторые MADS-домен содержащие транскрипционные факторы, и оказывать, таким образом, влияние на специфичность ДНК-связывания с комплексами более высоких порядков (Muñío et al. 2014). С другой стороны, симуляция молекулярной динамики и экспериментальные данные установили, что малая бороздка А-тракта содержит высоко-гидратированные сайты, что указывает на потенциальную способность этих динуклеотидных шагов обеспечивать сайты для водородных связей при ДНК-белковом взаимодействии (Yonetani et al. 2009).

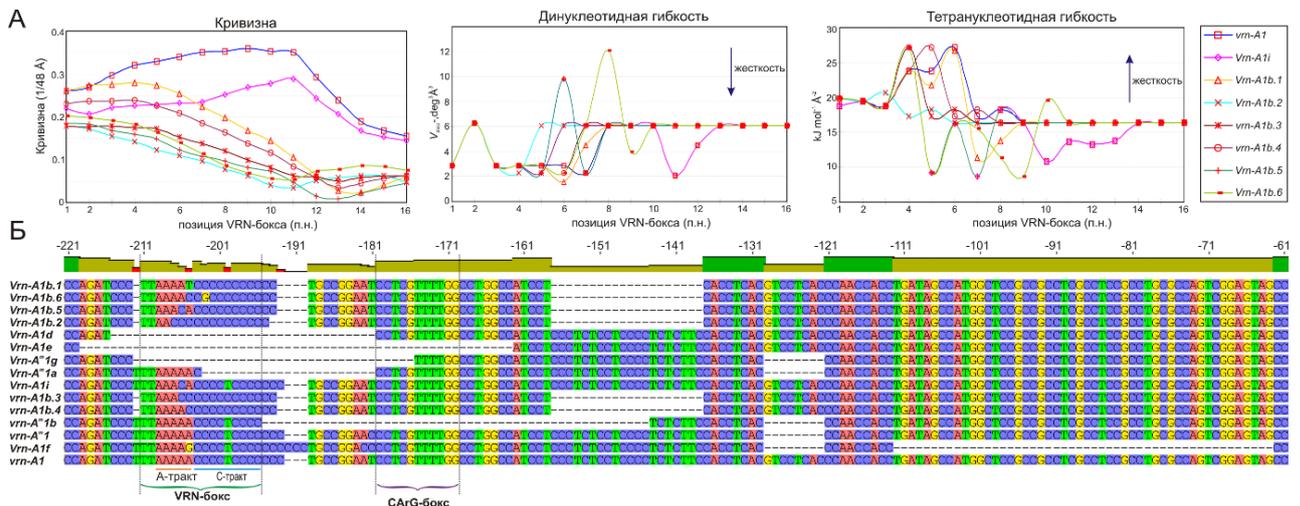


Рисунок 18. Полиморфизм VRN-бокса различает аллели *VRN-A1* (Muterko et al. 2016a). (A) Распределение локальной кривизны, динуклеотидной гибкости и тетрануклеотидной жесткости в последовательности VRN-бокса аллелей *Vrn-A1i* и *Vrn-A1b1-b6*. (Б) Множественное выравнивание аллелей *VRN-A1*, несущих мутации в области промотора (за исключением аллеля *Vrn-A1a*). Позиции в п.н. обозначены относительно стартового кодона рецессивного аллеля *vrn-A1*.

Также нельзя недооценивать важность С-богатого сегмента в последовательности VRN-бокса. Так транзиция "Т->С" была выявлена только в аллеле *Vrn-A1b* и следовательно детектирована как в "яровых" (*Vrn-A1b.1*, *Vrn-A1b.2*, *Vrn-A1b.5*, *Vrn-A1b.6*), так и "озимых" (*vrn-A1b.3*, *vrn-A1b.4*) вариантах. Однако ранее было показано, что делеция 20 п.н. в промоторе аллеля *Vrn-A^m1a* ассоциирована с яровым типом развития (Yan et al. 2003). Данная делеция включает часть С-богатого сегмента VRN-бокса (С3 вместо С4ТС4), охватывая сайт локализации транзиции "Т->С" и 12 п.н. ниже. В настоящем исследовании выявлена почти 30-дневная разница в сроках колошения между образцами, несущими рецессивные аллели генов *VRN-B1* и *VRN-B3* (Таблица 5), но последовательность VRN-бокса в гене *VRN-A1* различающиеся по транзиции "Т->С" в С-богатом сегменте (аллели *Vrn-A1b.5* и *Vrn-A1i*), при этом поздноцветущий фенотип характеризовался интактным С-богатым сегментом (аллель *Vrn-A1i*). Кроме того, доминантный аллель *Vrn-A1b.6* отличается от рецессивного *vrn-A1b.4* только одним ОНП в пределах С-богатого сегмента. Наконец, почти все доминантные аллели *VRN1* с мутантным VRN-боксом содержат мутации в последовательности С-богатого сегмента. Только *Vrn-A1i* имеет интактный С-

богатый участок, и он ассоциирован с поздним колошением. Эти результаты подчеркивают важность С-обогащенного участка в VRN-боксе в регуляции транскрипции гена *VRN-A1*. Известно, что гуанин- и цитозин-богатые участки ДНК способны образовывать неканонические структурные конформации, включающие вторичные структуры, образованные четырехцепочечной ДНК, а именно G-квардуплексы и i-мотивы. Эти структуры вовлечены в контроль экспрессии генов посредством регулирования транскрипционной активности (Du et al. 2008; Verma et al. 2008), а также посттранскрипционной регуляции (Bugaut et al. 2012). В этой связи можно предположить, что С-богатый участок VRN-бокса регулирует транскрипцию *VRN1* посредством образования структуры квардуплекса, которая дестабилизируется транзицией "Т->С" (в аллельных вариантах *Vrn-A1b*) или не может быть сформирована в связи с делецией нуклеотидной последовательности (в аллеле *Vrn-A^m1a*), приводя к активации транскрипции *VRN1*. Например, мутационная дестабилизация G-квардуплекса, локализованного в промоторе гена *C-MYC* (онкоген человека), сопровождается активацией транскрипции этого гена, обусловленной дестабилизацией ДНК-белкового комплекса, в котором белок является репрессором транскрипции (Siddiqui-Jain et al. 2002). Более того, существует мнение, что G-тракты характеризуются транскрипционными свойствами, которые практически идентичны таковым в А-трактах (Iyer et al. 1995), что может служить основой для возможного взаимодействия С-богатого участка и А-тракта VRN-бокса. Хотя и с меньшим подобием, по сравнению с мотивом квадруплекса, С-обогащенный участок (также как и последовательность, охваченная делецией 20 п.н. ниже VRN-бокса в вариантах аллеля *Vrn-A1b*) ассоциирован с коровым элементом промотора известным как Y-тракт ("Y Patch"), СТ-богатый участок, часто наблюдаемый в растительных ТАТА-боксах промоторов (Yamamoto et al. 2007). К примеру, около 50% коровых промоторов риса содержат один или более Y-трактов (Civán et al. 2009). Тем не менее, функциональная роль данного элемента, как и влияние полиморфизма его первичной структуры на регуляцию транскрипции, окончательно не установлены.

3.4.6. Полиморфизм гена *VRN-D1*

Аллельное разнообразие по гену *VRN-D1* в пшенице значительно уже, чем гомеологичных генов *VRN-A1* и *VRN-B1*. Единственный доминантный аллель *Vrn-D1a*, идентифицированный в сортах *T. aestivum*, содержит протяженную делецию в первом интроне и ассоциирован с яровым типом развития (Fu et al. 2005). Делеции в интроне-1 гена *VRN-D1*, ассоциированные со снижением чувствительности к яровизации, идентифицированы также в вероятном диплоидном доноре D генома мягкой пшеницы *Aegilops tauschii* Coss (Takumi et al. 2011). Интересно, что данные делеции были ассоциированы с яровым типом развития только в условиях длинного дня (фотопериод >15 ч) и не влияли на время колошения в полевых условиях. Однако в настоящее время достоверно не выявлено мутаций в области промотора гена *VRN-D1*, которые обуславливают снижение чувствительности к яровизации сопоставимое с мутацией в интроне-1 аллеля *Vrn-D1a* (Yan et al. 2004a; Fu et al. 2005; Zhang et al. 2015). Тем не менее, ряд мутаций идентифицирован в промоторе гена *VRN-D1* в озимых и яровых сортах *T. aestivum* (Takumi et al. 2011; Golovnina et al. 2010; Zhang et al. 2012; Zhang et al. 2015). Так, аллель *Vrn-D1b* (мутантный вариант аллеля *Vrn-D1a*) характеризуется ОНП С->А в последовательности CA_nG-бокса, а также содержит протяженную делецию в интроне-1, идентичную делеции в аллеле *Vrn-D1a* и ассоциирован с более поздним, чем *Vrn-D1a*, колошением (Zhang et al. 2012). Аллель *Vrn-D1c* содержит инсерцию 174 п.н. в позиции -601 п.н. и характеризуется более высокой транскрипционной активностью в отсутствии яровизации, чем аллель *Vrn-D1b*, но все же намного более низкой, чем аллель *Vrn-D1a*, и ассоциирован с остаточной потребностью в яровизации и факультативным типом развития (Zhang et al. 2015).

В этой связи актуальным является анализ полиморфизма регуляторных участков промотора и первого интрона гена *VRN-D1* в различных видах гексаплоидной пшеницы с целью идентификации новых аллелей этого гена. В настоящем исследовании, регуляторные участки в области промотора и первого интрона гена *VRN-D1* проанализированы в 77 образцах пяти видов гексаплоидной пшеницы из 35 стран (Приложение 12.).

3.4.6.1. Анализ полиморфизм области промотора гена *VRN-D1*

Пара праймеров VRN1DF и VRN1-INT1R фланкирует участок промотора (-722 - 0 п.н.), экзон-1 и часть первого интрона (+185 - +248 п.н.) гена *VRN-D1*. Прямой праймер является специфичным к D геному, тогда как обратный праймер был ранее разработан для амплификации гена *VRN-A1* (Yan et al. 2004a). Однако выравнивание последовательностей гомеологичных генов *VRN1* показало, что сайт отжига данного праймера консервативен во всех трех генах. В этой связи данная комбинация праймеров была оптимизирована для ПЦР-анализа области промотора *VRN-D1*. В ходе электрофореза продуктов амплификации идентифицированы два типа фрагментов ПЦР (~1020 п.н.) с различной подвижностью в ПААГ (Рисунок 19). Быстро мигрирующий фрагмент выявлен в четырех образцах вида *T. spelta* (UA0300304, PI 272573, PI 306550 и PI 323438) и образце *T. macha* (PI 428178). Полиморфные ампликоны были клонированы и секвенированы (GB: KF939526-KF939529). В результате множественного выравнивания секвенированных ампликонов с референсными последовательностями гена *VRN-D1* (GB: AB630962, AB630964 и AY616454) выявлен ряд полиморфных позиций. Для более детального исследования данного участка проведен *in silico* ПЦР с парой праймеров VRN1DF / VRN1-INT1R и нуклеотидных последовательностей гена *VRN-D1*, полученных из базы данных GenBank. Идентифицированы *in silico* ампликоны длиной 1012, 1018 и 1020 п.н. в образцах вида *Aegilops tauschii* и фрагменты размером 1020 п.н. в образцах гексаплоидной пшеницы (*T. aestivum*). Среди ампликонов длиной 1020 п.н. выявлено 9 сегрегирующих сайтов: G66C, T281C, A394G, C633T, G735A, A747G, G780A и G868A. Однако данный полиморфизм не представлен в идентифицированных в настоящем исследовании быстро мигрирующих фрагментах. Вместо этого, последние характеризовались делециями 1 п.н. в позициях 50 и 52 п.н., инсерцией тимина в позиции 346 п.н. и транзицией T->C в позиции 30 п.н. Инсерция тимина в позиции 346 п.н. происходит на участке T-тракта и приводит к увеличению его длины до 8 п.н. (T-тракт = (T)₈). В результате анализа распределения кривизны молекул ДНК фрагментов ПЦР, детектирующих альтернативные гаплотипы *VRD-D1* (ампликоны длиной 1019 и 1020 п.н.), установлено, что увеличение длины T-тракта на 1 динуклеотидный шаг (T₇->T₈)

приводит к уменьшению локальной кривизны и выпрямлению молекулы (Рисунок 19). Таким образом, наблюдаемая разница в скорости миграции фрагментов ПЦР, детектирующих альтернативные гаплотипы *VRN-D1* не может быть объяснена только делецией 1 п.н. и в большей степени обусловлена изменением протяженности Т-тракта, сопровождающимся модуляцией кривизны молекулы ДНК.

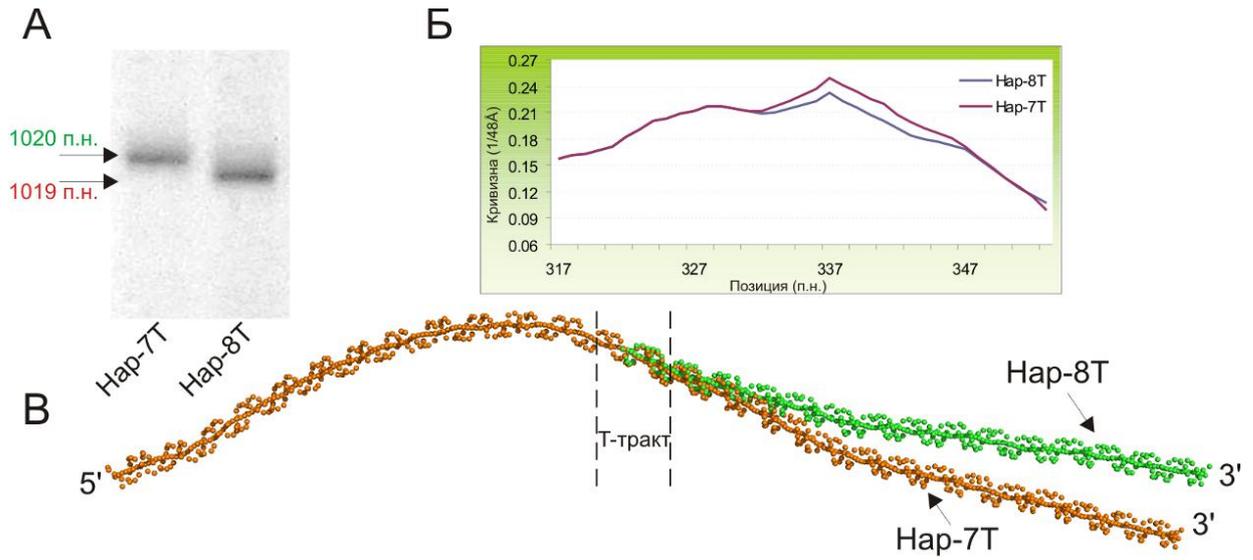


Рисунок 19. Анализ области промотора гена *VRN-D1*. (А) Идентификация гаплотипов Har-7Т и Har-8Т в ходе ПЦР с парой праймеров VRN1DF - VRN1-INT1R. (Б) Распределение предсказываемой кривизны молекулы ДНК на участке локализации полиморфного Т-тракта. (В) Предсказываемая форма молекул ДНК альтернативных гаплотипов *VRN-D1* в области локализации полиморфного Т-тракта.

Следует отметить, что ни одна из этих мутаций не затрагивает цис-активные регуляторные участки (такие как CArG, VRN, или G боксы), предполагая, что данные мутации гена *VRN-D1* не влияют на изменение его чувствительности к яровизации. Гаплотипы гена *VRN-D1*, различающиеся по продолжительности данного Т-тракта, были обозначены как Har-7Т (интактная последовательность, детектированная в медленно мигрирующих ампликонах, 1020 п.н.) и Har-8Т (мутантная последовательность, идентифицированная в быстро мигрирующих ампликонах, 1019 п.н.).

3.4.6.2. Идентификация нового аллеля *Vrn-D1s*

Мультиплекс ПЦР с праймерами *Intr1/D/F*, *Intr1/D/R3* и *Intr1/D/R4* была использована для исследования участка первого интрона (Рисунок 20). Пара праймеров *Intr1/D/F* и *Intr1/D/R4* фланкирует участок длиной 997 п.н. в интактном интроне-1 (рецессивный аллель *vrn-D1*), тогда как фрагменты ПЦР размером 1670 п.н. детектируются при амплификации с парой праймеров *Intr1/D/F* и *Intr1/D/R3* доминантного аллеля *Vrn-D1a*, несущего делецию продолжительностью 4.2 кб (Fu et al. 2005). В ходе электрофореза продуктов амплификации детектирован полиморфизм длины целевых фрагментов. Фрагмент ПЦР длиной 977 п.н., детектирующий рецессивный аллель *vrn-D1*, был представлен в 66 образцах, в семи образцах размер ампликонов составил 1671 п.н., что указывает на доминантный аллель *Vrn-D1a*, и только в четырех образцах идентифицирован ранее не наблюдавшийся фрагмент длиной 1841 п.н.. В результате разделения мультиплекс ПЦР и проведение анализа с отдельными комбинации праймеров (парных реакций), было установлено, что фрагменты 1841 п.н. амплифицируются парой праймеров *Intr1/D/F* и *Intr1/D/R4*. Следовательно, инсерция произошла в интактный участок первого интрона гена *VRN-D1* в аллеле дикого типа (*vrn-D1*). Данные ампликоны были клонированы и секвенированы (GB: KF800714). Анализ первичной структуры показал наличие инсерции МГЭ (DTA_Chimera_KF800714) размером 844 п.н. в позиции +1044 п.н. гена *VRN-D1* (от 859 до 1702 п.н. относительно начала интрона-1 в нуклеотидной последовательности *vrn-D1* сорта Triple Dirk C (GB: AY747606)). Поскольку данные ампликоны идентифицированы преимущественно в образцах *T. spelta*, новый аллель был обозначен как *Vrn-D1s*. Аллель *Vrn-D1s* детектирован в трех образцах вида *T. spelta* (из Испании и Англии) и одном образце *T. comractum* (из Турции), что свидетельствует о распространении данного аллеля за пределы вида *T. spelta*.

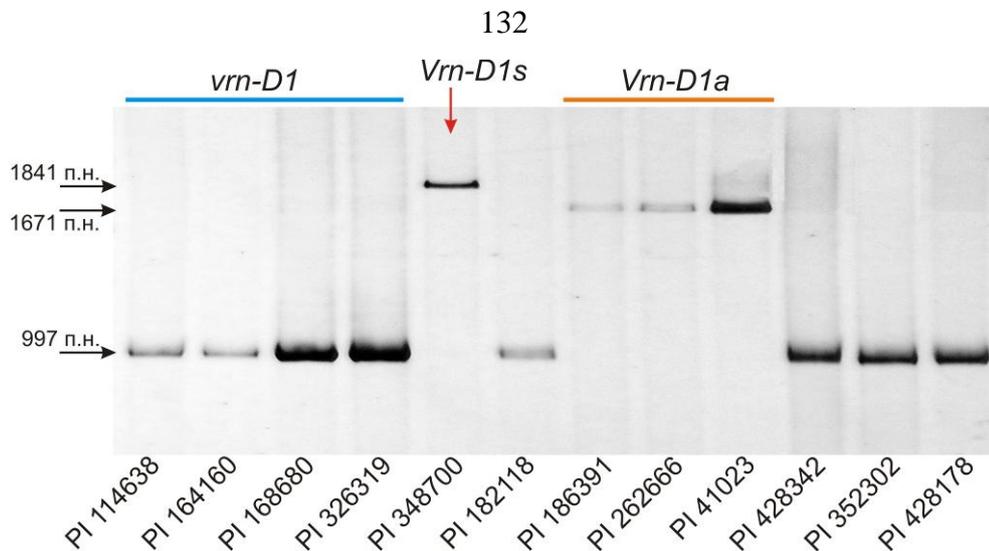


Рисунок 20. Электрофорез в ПААГ продуктов мультиплекс-ПЦР участка первого интрона гена *VRN-D1* с праймерами *Intr1/D/F*, *Intr1/D/R3* и *Intr1/D/R4* (Muterko et al. 2015b). Обозначены 3 типа фрагментов длиной 977, 1671 и 1841 п.н. соответствующие рецессивному аллелю *vrn-D1*, доминантному аллелю *Vrn-D1a* и новому аллелю *Vrn-D1s*.

В предыдущем исследовании участок первого интрона генов *VRN1* протяженностью 4.2 кб был обозначен как критический в регуляции потребности пшеницы и ячменя в яровизации (Fu et al. 2005). Предполагается, что на данном участке локализованы сайты связывания с гипотетическим репрессором, который подавляется яровизацией (Fu et al. 2005; von Zitzewitz et al. 2005) или он вовлечен в поддержание подавленного состояния хроматина (Diallo et al. 2012; Oliver et al. 2009). Наконец, он важен для посттранскрипционной регуляции экспрессии генов *VRN1* (Xiao et al. 2014; Kippes et al. 2015). Границы "критического участка" определены делецией с наиболее дистальной, относительно начала интрона, позицией 3' конца (делеция в аллеле *Vrn-A1c* тип IL369) и делецией с наиболее удаленным 5' концом (делеция в аллеле *Vrn-D1a*) (Fu et al. 2005). Мутации в пределах данного участка приводят к снижению чувствительности к яровизации, тогда как делеции или инсерции МГЭ ниже данного участка не влияют на яровизационный ответ (Fu et al. 2005). Однако, позже, в образцах диплоидной пшеницы *T. monosocum* были идентифицированы инсерции МГЭ в доминантных аллелях *Vrn-A^mIf* и *Vrn-A^mIh*, локализованные на 200 п.н. выше предполагаемого критического участка и ассоциированные с активацией транскрипции гена *VRN-A1* в отсутствие яровизации (Dubcovsky et al. 2006). Аналогично, инсерции МГЭ на

данном участке интрона-1 гена *VRN-H1* также ассоциированы с отсутствием потребности в яровизации у ячменя (Cockram et al. 2007a; Cockram et al. 2007b). Наконец, исследования MADS-боксов кодирующих генов арабидопсиса показали, что инсерции МГЭ в первом интроне могут влиять на регуляторные участки, расположенные вблизи сайта инсерции (Liu et al. 2004). Все эти данные предполагают, что критический участок в интроне-1 генов *VRN1* может быть в последующем расширен в сторону 5' конца. Инсерция МГЭ в аллеле *Vrn-D1s* локализована на 87 п.н. выше от инсерции МГЭ в аллелях *Vrn-A^m1f* и *Vrn-A^m1h* (Рисунок 21).

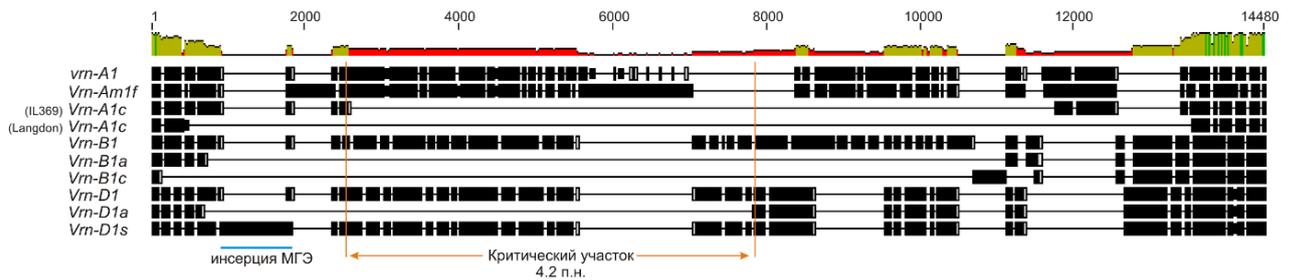


Рисунок 21. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей первого интрона различных аллелей генов *VRN1* (Muterko et al. 2015b). Аллели генов *VRN1*, содержащие в первом интроне протяженные делеции (*Vrn-A1c* (тип IL 369, Langdon) – 5.5 кб, 7.2 кб, *Vrn-B1a* – 6.8 кб, *Vrn-B1c* – 6.8 + 0.8 кб, *Vrn-D1a* – 4.2 кб) или инсерции МГЭ (*Vrn-A^m1f* – 493 п.н.) ассоциированы с яровым типом развития. Указана локализация инсерции транспозона в первый интрон аллеля *Vrn-D1s* и ранее обозначенные границы критического в регуляции экспрессии генов *VRN1* участка.

Образцы *T. spelta*, несущие аллель *Vrn-D1s*, также содержат доминантный аллель *Vrn-A1b.2*, тогда как в образце *T. compactum*, также обладающим аллелем *Vrn-D1s*, методом ДНК-маркерного анализа не выявлено доминантных аллелей генов *VRN-A1*, *VRN-B1* и *VRN-B3*. Данный образец *T. compactum* (PI 211701) и контрольный образец *T. sphaerococcum* (PI 83402), который согласно ДНК-маркерному анализу является моногенно-доминантным по *Vrn-D1a*, были выращены в тепличных условиях без яровизации при 16 часовом фотопериоде. Образец PI 211701 с *Vrn-D1s* выколосился на 5 дней позже образца PI 83402 с *Vrn-D1a* (77 и 72 дня до колошения, соответственно, Таблица 5). В этой связи

предполагается, что аллель *Vrn-D1s*, вероятно, является доминантным и ассоциирован со снижением чувствительности к яровизации. Полученный результат, в свою очередь, позволяет пересмотреть границы "критического участка". Предполагается, что новые границы "критического участка" в первом интроне генов *VRN1* определены позицией инсерции транспозона в аллеле *Vrn-D1s* и позицией 5' конца делеции в аллеле *Vrn-D1a*.

3.5. Полиморфизм транскрибируемого участка гена *VRN-A1* в границах экзон-3 - экзон-7

Несмотря на то, что с момента выявления полиморфизма в кодирующей области гена *VRN-A1*, ассоциированного с изменением количественных показателей агрономически ценных признаков пшеницы, прошло почти 10 лет, в настоящее время отсутствуют данные об исследовании экзона-4 и экзона-7 *VRN-A1* в видах полиплоидной пшеницы отличных от *T. aestivum*. Часто, четвертый и седьмой экзоны *VRN-A1* анализировали отдельно, не учитывая возможного влияния мутаций в каждом из них на результаты исследования. Во многих случаях не была учтена вариабельность количества копий *VRN-A1*, притом, что более 90% озимых сортов *T. aestivum* содержат 2-3 копии этого гена (Würschum et al. 2015), различающиеся комбинациями типов четвертого и седьмого экзонов (Diaz et al. 2012). Например, сорт Hereward, содержащий три копии гена *VRN-A1*, характеризуется гаплотипами Ex4C7T, Ex4T7T, Ex4T7T, в то время как для сорта Malacca с двумя копиями *VRN-A1* идентифицированы гаплотипы Ex4C7T и Ex4T7T в каждой копии соответственно (Diaz et al. 2012). Кроме того, согласно результатам исследования первичной структуры гена *VRN-D4*, только 4 ОНП отличают его от гена *VRN-A1* (Kirpes et al. 2015), при этом, используя ранее предложенные методы анализа, не представляется возможным различить экзоны 4 и 7 генов *VRN-A1* и *VRN-D4*. Наконец, идентификация гаплотипов экзона-4 и экзона-7 *VRN-A1* имеет ряд ограничений, которые препятствуют активному исследованию влияния соотношения копий гена *VRN-A1* с различным типом экзонов 4 и 7 на фенотип, а также масштабному генотипированию селекционных образцов пшеницы. В этой связи, были усовершенствованы методы анализа гаплотипов четвертого и седьмого экзонов гена *VRN-A1*, и проведено масштабное исследование данного участка генома в генетическом материале 158 образцов пяти видов гексаплоидной и шести видов тетраплоидной пшеницы (Приложение 14).

3.5.1. ДНК-маркеры для идентификации типа экзона-4 гена *VRN-A1*

В результате анализа первичной структуры четвертого экзона гена *VRN-A1*, установлено, что транзиция нуклеотидов в полиморфном сайте, различающем различные типы экзона-4, обуславливает нарушение А-тракта длиной 5 п.н. (A(T)₄) (Рисунок 22).

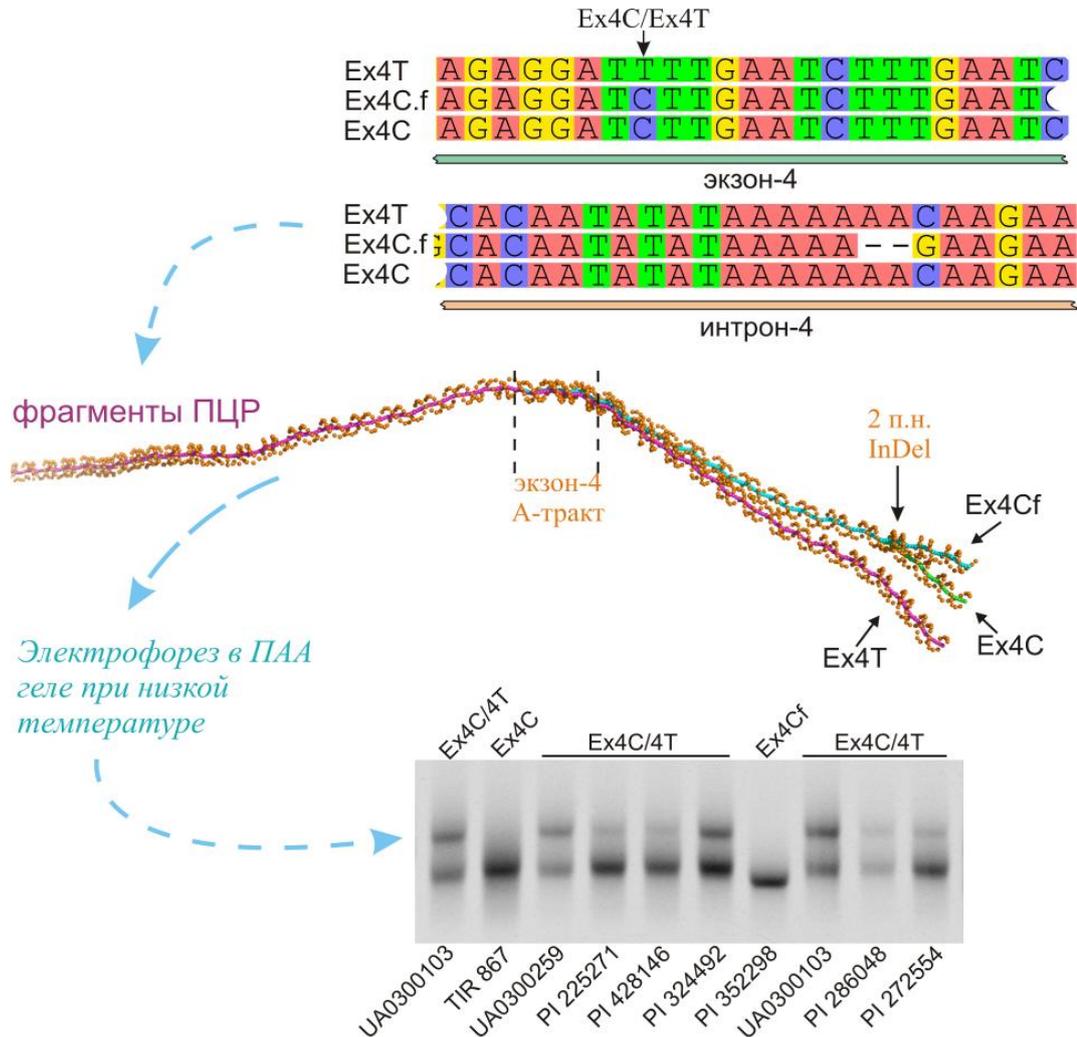


Рисунок 22. Схематическое представление разработки кодоминантных ДНК-маркеров, детектирующих альтернативные гаплотипы экзона-4 *VRN-A1*, основанных на модуляции кривизны ДНК (Мутерко и др. 2017).

В настоящей работе неоднократно отмечалось, что адениновые тракты являются основными индукторами локальных изгибов ДНК, которые суммарно определяют её макроскопическую кривизну (Koo et al. 1986). Фрагменты ДНК с высокой макроскопической кривизной мигрируют через ПААГ медленнее, чем неизогнутые молекулы той же длины (Marini et al. 1982). При этом длина А-трактов

и локализация изгибов имеют ключевое значение (Koo et al. 1986; Diekmann 1992). В этой связи, разница в скорости миграции фрагментов ПЦР с различной кривизной, обусловленной полиморфизмом А-тракта, была использована для идентификации гаплотипов четвертого экзона *VRN-A1*.

Пара праймеров Ex4F2m3 и Ex4R, охватывающая часть интрона-2, экзон-3, интрон-4 и половину четвертого интрона *VRN-A1*, оптимизирована для проведения ПЦР-анализа. В частности, для повышения специфичности связывания праймера Ex4F2m3 с участком гена *VRN1* из А генома, некоплементарный нуклеотид был введен в третью позицию от 3' конца данного праймера. Поскольку существует линейная зависимость относительной мобильности изогнутых фрагментов ДНК в полиакриламидном геле от квадрата их кривизны (Koo et al. 1988), фрагменты ДНК одинаковой длины могут быть достоверно различимы в ходе электрофореза, если амплитуда модуляции их кривизны будет максимальна. Пара праймеров Ex4F2m3 / Ex4R подобрана таким образом, что локализация полиморфного аденинового тракта смещена к центру молекулы. Такое расположение локального изгиба задает оптимальную амплитуду модуляции макроскопической кривизны фрагментов ДНК, а, следовательно, и их скорости миграции через ПААГ. Локализация изгиба вблизи центра фрагмента обуславливает более симметричное распределение макроскопической кривизны и сглаживает зависимость сопротивления матрице геля от ориентации молекулы.

Во фрагментах ПЦР, детектирующих гаплотип Ex4T (GB: KU844091) А-тракт локализован в центральной части молекулы, что обуславливает их аномально медленную миграцию в ПААГ, вследствие более сильного изгиба (Рисунок 22). У ампликонов, идентифицирующих гаплотип Ex4C (GB: KU844092, KT983448), А-тракт нарушен в результате транзиции тимина в цитозин, нивелирующей кривизну ДНК в данной области. Относительно маркера длины ДНК, разница между ампликонами, идентифицирующими альтернативные гаплотипы экзона-4 *VRN-A1*, превышала 50 п.н. и не наблюдалась в агарозных гелях, а также в не оптимизированных условиях электрофореза в полиакриламидных гелях. Таким образом, интактный и мутантный гаплотипы экзона-4 гена *VRN-A1* были достоверно различимы, подтверждая высокую эффективность ДНК-маркеров нового типа.

Фрагменты ПЦР, идентифицирующие интактную последовательность экзона-4 *VRN-A1*, в ряде образцов обладали более высокой подвижностью в ПААГ (Рисунок 22). Новый вариант гаплотипа Ex4C, обозначенный Ex4C.f, содержит трансверсию цитозина в гуанин и делецию 2 п.н. в четвертом интроне гена *VRN-A1* (GB: KT983449). Делеция 2 п.н. локализована в адениновом тракте и сопровождается его сокращением с 7 до 5 п.н., сглаживая, таким образом, локальный изгиб и распрямляя молекулу (Рисунок 22).

3.5.2. Идентификация типа экзона-4 гена *VRN-A1* в различных видах пшеницы

Анализ экзона-4 *VRN-A1* в идентифицированных в исследованном генетическом материале доминантных аллелях *Vrn-A1a/b/c/e/i*, а также в большинстве известных аллелей гена *VRN-A1*, доступных из публичных баз данных, включая аллели характерные для диплоидной пшеницы (*Vrn-A^m1a/b/f/g/h*), показал, что все известные доминантные аллели этого гена характеризуются экзон-4 интактного типа, гаплотип Ex4C или Ex4C.f (Таблица 6). Гаплотип Ex4Cf идентифицирован в доминантных аллелях *Vrn-A1a* (варианты *Vrn-A1a.1* и *Vrn-A1a.2*), *Vrn-A1e* и *Vrn-A1i*, а также двух образцах тетраплоидной пшеницы *T. dicoccoides* и образцах гексаплоидной пшеницы *T. spelta* и *T. aestivum* с рецессивным аллелем *vrn-A1* (Таблица 6).

Таблица 6. Гаплотипы экзона-4 в различных аллелях *VRN-A1*, идентифицированных в исследуемом генетическом материале.

Аллель	Гаплотип экзона-4 и 7 гена <i>VRN-A1</i>	Тетраплоидная пшеница	Гексаплоидная пшеница
<i>vrn-A1</i>	Ex4C.f/Ex7C	2	2
	Ex4C.m/ Ex7T	0	5
	Ex4C.s/ Ex7C	10	8
	Ex4C.sph/4T	0	3
	Ex4C.m/4T/ Ex7T	0	46
	Ex4T/ Ex7T	0	1
<i>Vrn-A1a</i>	Ex4C.f/ Ex7C	2	6
<i>Vrn-A1b.1-6</i>	Ex4C.s/ Ex7C	35	11
<i>Vrn-A1e</i>	Ex4C.f/ Ex7C	3	0
<i>Vrn-A1i</i>	Ex4C.f/ Ex7	5	0

Аллель	Гаплотип экзона-4 и 7 гена <i>VRN-A1</i>	Тетраплоидная пшеница	Гексаплоидная пшеница
<i>Vrn-A1j</i>	Ex4C/4T/Ex7T	2	0
<i>Vrn-A1k</i>	Ex4C.s/ Ex7C	2	0
<i>Vrn-A1c (Langdon)</i>	Ex4C.s/ Ex7C	17	0

Мутантный тип экзона-4 (Ex4T) выявлен только в гексаплоидной пшенице, в образцах с интактным промотором и интроном-1 гена *VRN-A1* (рецессивный аллель), а также в образцах *T. compactum*, несущих аллель *Vrn-A1j* (Таблица 6). Исключая один образец (TRI 290, GB: KX874601), гаплотип Ex4T детектирован только в комбинации с гаплотипом Ex4C, что также характерно для аллеля *Vrn-A1j*. В этой связи, предполагается, что мутантный четвертый экзон *VRN-A1* ассоциирован с наличием не менее двух копий этого гена, характеризующихся различными типами экзона-4, на геном. Тетраплоидная пшеница всех исследованных видов характеризовалась исключительно диким типом четвертого экзона *VRN-A1* (гаплотипы Ex4C и Ex4C.f). Образцы гексаплоидной пшеницы, несущие рецессивный аллель *vrn-A1* и только гаплотип Ex4C были не многочисленны и наблюдались преимущественно в *T. sphaerococcum* и западноевропейских сортах *T. aestivum* (Приложение 14).

3.5.3. Полиморфизм интрона-4 гена *VRN-A1*

Более десяти адениновых трактов локализовано в интроне-4 гена *VRN-A1*, что повышает вероятность возникновения в них мутаций, а, следовательно, и вероятность модуляции кривизны ДНК на данном участке. Для улучшения информативности анализа и выявления новых гаплотипов гена *VRN-A1*, анализируемый участок был расширен на 200 п.н. С этой целью разработан специфичный к ДНК последовательности *VRN-A1* праймер Ex4AR245m3 и оптимизирована ПЦР в комбинации с Ex4F2m3.

Ампликоны пяти различных гаплотипов гена *VRN-A1* (GB: KX874600-KX874607) были идентифицированы в ходе электрофореза в полиакриламидном геле продуктов ПЦР с парой праймеров Ex4F2m3 / Ex4AR245m3 (Рисунок 23). В результате анализа первичной структуры ампликонов идентифицирован

полиморфизм А-тракта в интроне-4 гена *VRN-A1*, обуславливающий расщепление интактного гаплотипа Ex4C на четыре варианта: Ex4C.f, Ex4C.m, Ex4C.s и Ex4C.sph. Гаплотипы Ex4C.s и Ex4C.f характеризуются минимальной протяженностью А-тракта равной 7 п.н. Длина аденинового тракта в новых гаплотипах Ex4C.m и Ex4C.sph увеличена соответственно до 8 и 9 п.н. Протяженность А-тракта в интроне-4 гена *VRN-A1* с мутантным экзоном-4 (Ex4T) соответствует его длине в четвертом интроне гаплотипа Ex4C.m (8 п.н.).

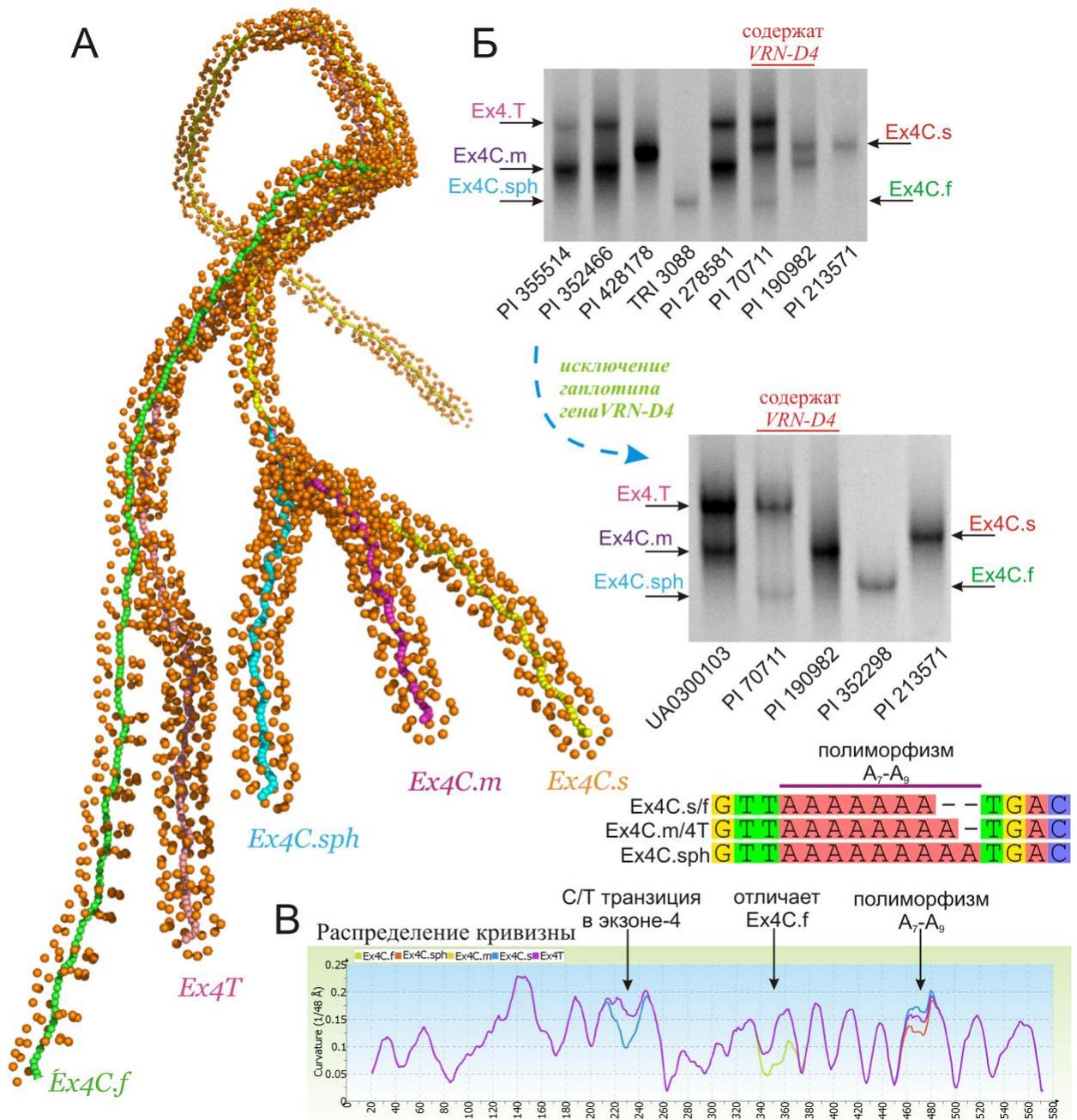


Рисунок 23. Гаплотипы *VRN-A1* по участку экзон-3 – экзон-7, идентифицируемые в ходе ПЦР-анализа с парой праймеров Ex4F2m3 / Ex4AR245m3 (Мутерко и др. 2017). (А) Суперпозиция предсказываемых

пространственных структур фрагментов ДНК, соответствующих различным гаплотипам *VRN-A1*. (Б) Электрофорез в ПААГ ампликонов, детектирующих гаплотипы *VRN-A1* и *VRN-D4* (В) Распределение кривизны ДНК в фрагментах ПЦР различных гаплотипов гена *VRN-A1*.

Все пять гаплотипов характеризуются различной кривизной амплифицируемого участка, что позволяет проводить их регистрацию по различию в скорости миграции соответствующих фрагментов ДНК в ПААГ. Повышение подвижности ампликонов в геле, обусловленное увеличением протяженности А-тракта (7 → 9 п.н.), явно указывало на уменьшение кривизны ДНК (Рисунок 23). При этом подвижность ампликонов *Ex4C.f* сопоставима с подвижностью фрагментов ПЦР гаплотипа *Ex4C.sph*. Полиморфные А-тракты в фрагментах ДНК гаплотипов *Ex4C.f* и *Ex4C.sph*, расположены на одинаковом расстоянии от центра, следовательно, в случае равенства порождаемых ними изгибов, будут оказывать подобное влияние на подвижность фрагментов через гель. Наблюдаемое различие в скорости миграции ампликонов гаплотипов *Ex4C.f*, *Ex4C.m*, *Ex4C.s* и *Ex4C.sph* в ПААГ позволяет предположить, что макроскопическая кривизна фрагмента ДНК с А-трактом длиной 5 п.н. соответствует глобальной кривизне фрагмента, содержащего А-тракт протяженностью 9 п.н. Таким образом, максимальная кривизна аденинового тракта детектируется при его длине 7 п.н. и убывает при дальнейшем увеличении или уменьшении его протяженности (при прочих равных условиях).

Гаплотипы *Ex4C.sph* и *Ex4C.m*, идентифицированы исключительно в гексаплоидной пшенице, при этом *Ex4C.sph* выявлен только у представителей вида *T. shaerococcum* (GB: KX874600) в комбинации с *Ex4T* (Таблица 6). Следовательно, гексаплоидная пшеница содержит все идентифицированные в настоящем исследовании гаплотипы четвертого экзона и интрона гена *VRN-A1*, среди которых гаплотипы *Ex4C.sph* и *Ex4C.m* отличают гексаплоидные виды от тетраплоидных, а гаплотип *Ex4C.sph* отличает вид *T. sphaerococcum*. Гаплотип *Ex4T* ассоциирован с гаплотипом *Ex4C.m*, который детектирован в одиночном представлении в ряде образцов вида *T. aestivum* и *T. sphaerococcum*. Следовательно, предполагается дивергенция гаплотипа *Ex4T* из *Ex4C.m* в гексаплоидной пшенице.

Гаплотипы идентифицированные в образцах вида *T. shaerococcum* включают в себя гаплотипы генов *VRN-A1* и *VRN-D4*, которые не различимы при данных условиях анализа. С целью избирательной идентификации гаплотипов *VRN-A1* в образцах вида *T. shaerococcum*, содержащих ген *VRN-D4* и детектирующих более одного целевого фрагмента ПЦР (гаплотипы Ex4Cs, Ex4T и Ex4C.sph в образцах PI 324492, PI 70711 и PI 277142, а также Ex4Cs и Ex4C.m в PI 278650 и PI 190982), разработан праймер Ex4FoutV4 специфичный к гену *VRN-A1*, с низким сродством к последовательности *VRN-D4*, обусловленным ОНП и намерено введенным некомплементарным нуклеотидом в третью позицию от 3' конца праймера. Хотя последовательность сайта отжига Ex4FoutV4 различается между генами *VRN1* из А, В и D геномов двумя однонуклеотидными полиморфизмами, локализованными вблизи центра, фрагменты ПЦР генов *VRN-B1* и *VRN-D1*, при использовании общего для *VRN1* генов пшеницы обратного праймера, не детектировались и при понижении температуры отжига < 56°C. Тем не менее, праймер Ex4FoutV4 был применен в ПЦР-анализе образцов *T. shaerococcum* в комбинации со специфичным к *VRN-A1* обратным праймером – Ex4AR. В ходе электрофореза продуктов ПЦР в ПААГ, фрагменты, детектирующие гаплотип Ex4C.s не обнаружены (Рисунок 23). Таким образом, ген *VRN-A1* в образцах PI 324492, PI 70711 и PI 277142 представлен гаплотипами Ex4T и Ex4C.sph, образцы PI 278650 и PI 190982 содержат ген *VRN-A1* с гаплотипом Ex4C.m, а ген *VRN-D4* во всех пяти образцах *T. shaerococcum* характеризуется гаплотипом Ex4Cs.

При использовании пары праймеров Ex4FoutV4 / Ex4AR, в результате сдвига границ амплифицируемой области гена *VRN-A1*, локальный изгиб, продуцируемый полиморфным А-трактом в интроне-4, смещается к центру молекулы, вследствие чего, подвижность фрагментов Ex4C.f, обладающих большим изгибом, чем у Ex4C.sph, снижается. Кроме того, поскольку зависимость мобильности фрагментов в ПААГ от их длины является экспоненциальной, предполагается, что модуляция кривизны более протяженных фрагментов ДНК оказывает более сильное влияние на амплитуду скорости их миграции через гель, чем модуляция кривизны коротких фрагментов.

Таким образом, в результате повышения информативности ПЦР-анализа выборка гаплотипов гена *VRN-A1* была обогащена новыми вариантами, а в

образцах гексаплоидной пшеницы с интактным экзоном-4 *VRN-A1* удалось получить расщепление по гаплотипу интрона-4 этого гена. Повысилась точность идентификации гаплотипа Ex4C.f. Гаплотип Ex4C.m позволил определить филогенетическую линию, в которой дивергировал экзон-4 *VRN-A1* (произошел гаплотип Ex4T) и была осуществлена последовательная мультипликация этого гена в две, а затем три копии.

3.5.4. Полиморфизм экзона-7

АС-ПЦР дискриминирующая гаплотипы экзона-7 была проведена в виде мультиплекс реакции с использованием аллель-специфических обратных праймеров (Ex7/C/R2m4, Ex7/T/R2m3) и общим форвард-праймером (Ex7Fm4), специфичным к А геному пшеницы. Фрагмент ПЦР длиной 319 п.н. идентифицирует гаплотип дикого типа (Ex7C), в то время как фрагмент размером 332 п.н. маркирует мутантный гаплотип Ex7T (Рисунок 24). Разница в размере фрагментов (13 п.н.), обусловленная различной протяженностью аллель-специфических праймеров (19 и 32 нук. для Ex7/C/R2m4 и Ex7/T/R2m3 соответственно), хорошо заметна при электрофорезе в ПААГ, что позволяет идентифицировать альтернативные гаплотипы экзона-7 в гетерозиготных пробах в ходе одной реакции (Рисунок 24). При амплификации участка гена *VRN-A1*, охватывающего полиморфные сайты экзона-4 и экзона-7 одновременно (ПЦР с праймерами Ex4F2m3, Ex7/C/R2m4 и Ex7/T/R2m3) разница в скорости миграции фрагментов, детектирующих гаплотипы Ex4C.m и Ex4C.s, была выражена в значительной меньшей степени, чем для фрагментов, полученных в ходе ПЦР с парой праймеров Ex4F2m3/Ex4AR245m3. Данное наблюдение подтверждает значительный вклад локального изгиба ДНК, обусловленного полиморфизмом А-тракта на снижение скорости миграции фрагмента через полиакриламидный гель, при его локализации вблизи центра молекулы.

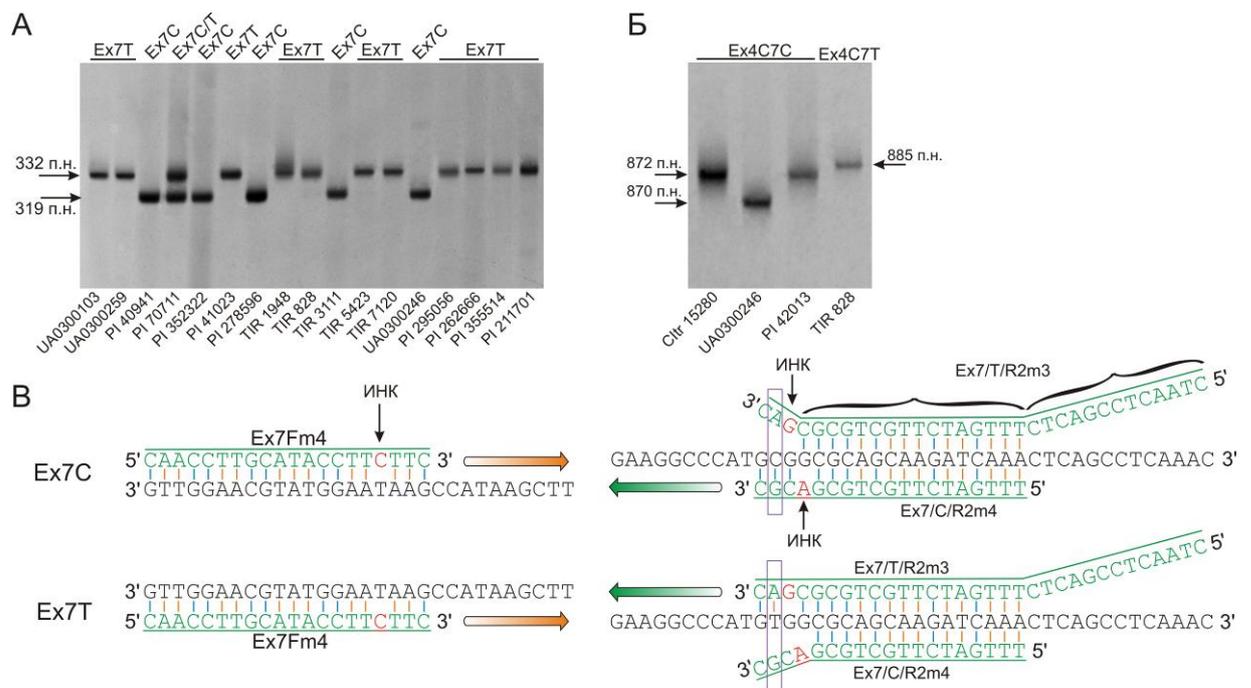


Рисунок 24. Аллель-специфическая мультиплекс-ПЦР, дискриминирующая альтернативные гаплотипы экзона-7 гена *VRN-A1*. (А) Электрофореграмма разделения продуктов АС мультиплекс-ПЦР альтернативных гаплотипов экзона-7 *VRN-A1* в ПААГ. (Б) Амплификация участка, охватывающего полиморфные сайты экзона 4 и 7 *VRN-A1* одновременно. (В) Схема оптимизации праймеров для АС мультиплекс-ПЦР. Обозначены пары нуклеотидов, между которыми искусственно нарушена комплементарность (ИНК).

Установлено, что все образцы тетраплоидной пшеницы характеризуются гаплотипом дикого типа Ex7C (Таблица 6). Кроме того, почти все доминантные аллели гена *VRN-A1* также обладали гаплотипом Ex7C, за исключением аллеля *Vrn-A1c* (*IL369*), ранее идентифицированным в гексаплоидной пшенице (Fu et al. 2005) и не встречающимся в тетраплоидных видах (Muterko et al. 2016a), а также аллеля *Vrn-A1j*, идентифицированного в настоящем исследовании также в гексаплоидной пшенице (Таблица 6). Образцы *T. sphaerococcum* (PI 191301, PI 40941, PI 42013, PI 277141, PI 168685) несущие ген *VRN-D4* и один гаплотип экзона-4 гена *VRN-A1* (Ex4C) характеризовались диким типом экзона-7. Таким образом, мутантный гаплотип Ex7T идентифицирован только у представителей видов гексаплоидной пшеницы с рецессивным аллелем *vrn-A1* и в двух образцах *T. compactum* (PI 262666, PI 41023) несущих аллель *Vrn-A1j*.

В гомозиготных по рецессивному аллелю образцах, без *VRN-D4*, не выявлено генотипов, несущих одновременно оба альтернативных гаплотипа экзона-7. Таким образом, можно утверждать, что в образцах с несколькими копиями гена *VRN-A1*, все копии имеют одинаковый гаплотип экзона-7, что возможно также свидетельствует и об отсутствии рекомбинационных процессов на участках между копиями *VRN-A1*. В пяти образцах *T. sphaerococcum* (PI 190982, PI 277142, PI 278650, PI 70711, PI 324492) выявлено оба альтернативных гаплотипа экзона-7. Тем не менее, данные образцы также характеризовались наличием гена *VRN-D4*, который ассоциирован с гаплотипом Ex7C.

3.5.5. Комбинации гаплотипов экзона 4 и 7 гена *VRN-A1*

Вне зависимости от вида, все образцы тетраплоидной пшеницы, а также все доминантные аллели гена *VRN-A1* в диплоидной и тетраплоидной пшенице имели гаплотип Ex4C7C (дикий тип), и только доминантный аллель *Vrn-A1c(IL369)* и аллель *Vrn-A1j*, идентифицированные исключительно в гексаплоидной пшенице характеризовались мутантным экзоном-7 (Ex7T) (Таблица 6).

Предполагается, что образцы *T. compactum*, несущие аллель *Vrn-A1j* содержат не менее двух копий гена *VRN-A1* на геном, соответствующие интактному (*vrn-A1*) и мутантному (*Vrn-A1j*) аллелям, поскольку во всех проанализированных образцах аллель *Vrn-A1j* детектирован только в комбинации с аллелем *vrn-A1*. Не выявлено расщепление данных аллелей и в потомстве от самоопыления. Кроме того, как было недавно установлено (Würschum et al. 2015), подавляющее большинство образцов гексаплоидной пшеницы содержит 2-3 копии гена *VRN-A1* на геном. Наличие не менее двух копий *VRN-A1* на геном в образцах PI 262666 и PI 41023 предполагается также исходя из установленной в настоящем исследовании ассоциации гаплотипа Ex4T с данным явлением. Таким образом, поскольку маловероятно, что аллель *Vrn-A1j* образовался в результате идентичных мутаций одновременно нескольких копий *VRN-A1*, то предполагается, что возникновение аллеля *Vrn-A1j* обусловлено мутацией одной из интактных копий гена *VRN-A1*, в связи с чем аллель *Vrn-A1j* присутствует совместно с рецессивным аллелем (интактными копиями) *vrn-A1*. Аналогичное утверждение было ранее доказано для

аллеля *Vrn-A1c* (*IL369*), который идентифицирован исключительно в образцах гексаплоидной пшеницы и только в комбинации с аллелем *vrn-A1*, характеризуется одновременным присутствием альтернативных гаплотипов экзона-4 и точно установленным числом копий, равным 2 (Diaz et al. 2012).

Таким образом, в отличие от большинства ранее идентифицированных аллелей гена *VRN-A1*, выявленный в настоящем исследовании аллель *Vrn-A1j*, как и ранее идентифицированный аллель *Vrn-A1c* (*IL369*), вероятно появился в гексаплоидной пшенице, о чем свидетельствует гаплотип Ex7T, и является одним из наиболее филогенетически поздних. Наконец важной отличительной особенностью аллеля *Vrn-A1j* от известных доминантных аллелей гена *VRN-A1*, несущих мутации в области промотора, является мутантный тип экзонов 4 и 7, влияющий на функциональность продуктов экспрессии, а также наличие одной или нескольких интактных копий гена *VRN-A1*. Мутации в области промотора *Vrn-A1j* могут обуславливать изменения в регуляции его транскрипционной активности. Мутации в экзоне 4 и 7 влияют на белок-белковые взаимодействия продуктов экспрессии. Наличие дополнительных интактных копий *vrn-A1*, вероятно, приведет к резкому увеличению концентрации транскриптов *VRN1* после активации их экспрессии аллелем *Vrn-A1j* в отсутствие яровизации (справедливо если *Vrn-A1j* доминантный аллель).

Все образцы гексаплоидной пшеницы, несущие одновременно оба гаплотипа экзона-4 (Ex4C, Ex4T), то есть содержащие, вероятно, не менее двух копий гена *VRN-A1* в геноме, обладали мутантным типом экзона-7 (Ex7T) этого гена. Гаплотип Ex4C/7T детектирован в образцах *T. aestivum* из стран западной Европы, где был представлен наравне с гаплотипом Ex4C/7C. Мутантный тип экзона-4 (Ex4T) был ассоциирован с мутантным типом экзона-7 (Ex7T) гена *VRN-A1* (гаплотип Ex4T/7T). Аналогично, дикий тип экзона-7 (Ex7C) ассоциирован с диким типом экзона-4 *VRN-A1* (Ex4C), поскольку не обнаружено вариантов с гаплотипом Ex4T/7C.

Седьмой экзон гена *VRN-A1* в образцах *T. sphaerococcum* с гаплотипом Ex4C (PI 191301, PI 40941, PI 42013, PI 277141, PI 168685, CIt 17737) представлен диким типом (Ex7C), что свидетельствует о том, что идентифицированный у них ген *VRN-D4* также характеризуется гаплотипом Ex4C/7C. Однако в двух образцах *T.*

sphaerococcum (PI 190982 и PI 278650) с гаплотипом Ex4C выявлен одновременно дикий и мутантный тип экзона-7. Исключение гаплотипа Ex4C/7C гена *VRN-D4* приводит к выводу, что гаплотип гена *VRN-A1* в этих образцах соответствует Ex4C/7T.

Кроме того, идентифицировано 3 образца *T. sphaerococcum* (PI 277142, PI 70711, PI 324492), содержащие альтернативные гаплотипы обоих экзонов одновременно (Ex4C/T, Ex7C/T). Для определения комбинации гаплотипов экзона-4 и экзона-7 в каждой копии гена *VRN-A1*, данные образцы были амплифицированы комбинациями праймеров: Ex4/F2m3 - Ex7/T/R2m3 и Ex4/F2m3 - Ex7/C/R2m4. В данной ПЦР, прямой праймер является геном-специфичным (используется при идентификации гаплотипа экзона-4), тогда как обратные праймеры являются аллель-специфичными к гаплотипам экзона-7. Таким образом, участок амплификации охватывает нуклеотидную последовательность полиморфных сайтов четвертого и седьмого экзонов. В результате, наблюдаемая разница в скорости миграции фрагментов ДНК с различной кривизной, позволяет определить гаплотип экзона-4 для каждой копии гена *VRN-A1* с конкретным гаплотипом экзона-7. Для указанных образцов *T. shaerococcum* расщепление на гаплотипы экзона-4 наблюдалось только для копий *VRN-A1* с мутантным типом экзона-7 (Ex7T), подтверждая, что наличие Ex7C обусловлено присутствием гена *VRN-D4*.

В остальном, среди образцов с диким типом экзона-4 (Ex4C), не выявлено представителей, несущих одновременно оба альтернативных гаплотипа экзона-7 гена *VRN-A1*, что предполагает отсутствие вариантов с двумя копиями гена *VRN-A1* в геноме, характеризующихся гаплотипами Ex4C/7C и Ex4C/7T, соответственно.

3.5.6. Оптимизированные ДНК-маркеры в дискриминации гаплотипов экзонов 4 и 7 генов *VRN-A1* и *VRN-D4*

Для идентификации гаплотипов экзона-4 и экзона-7 гена *VRN-A1* ранее были разработаны несколько типов ДНК-маркеров, основанные, главным образом, на анализе продуктов рестрикции ПЦР-фрагментов (Chen et al. 2009; Eagles et al. 2011; Li et al. 2013; Yan et al. 2015). В ряде исследований тип экзона-4 гена *VRN-A1*

определяли путем анализа секвенограмм ампликонов (Zhang et al. 2015) или субклонов (Chen et al. 2013), или же с применением KASP-генотипирования (Diaz et al. 2012). В большинстве случаев, в отличие от предложенных в настоящем исследовании, такие маркеры являются доминантными, а способы их детекции более трудоемкие, более затратные как по финансам, так и по времени. Кроме того, для них не показана возможность идентификации комбинации гаплотипов экзонов 4 и 7 в нуклеотидной последовательности одного гена *VRN-A1*. Наконец, они не позволяют исключить влияние гена *VRN-D4* на результат анализа, а также проводить генотипирование гетерозиготных по *VRN-A1* образцов.

Анализ полиморфизма четвертого и седьмого экзонов *VRN-A1* осложняется присутствием в большинстве образцов гексаплоидной пшеницы нескольких копий этого гена с различным соотношением альтернативных гаплотипов данных экзонов. В ряде предыдущих исследований, идентификация одновременно дикого и мутантного экзона-4 *VRN-A1* осуществлялась по регистрации двойного пика на секвенограмме (Diaz et al. 2012; Zhang et al. 2015). Однако, четко отделить двойной пик от шума получается не всегда, особенно в случаях, когда количество копий *VRN-A1* с альтернативными типами четвертого экзона, различно. Кроме того, в настоящем исследовании было обнаружено, что наличие делеции или инсерции хотя бы 1 п.н. в одной из копий анализируемого участка *VRN-A1* делает невозможным прочтение секвенограммы, вследствие наложения хроматограмм фрагментов различной протяженности. Хотя данная проблема может быть решена путем разбиения исследуемого участка на несколько частей, область локализации делеции/инсерции выпадает из анализа. В качестве примера, на Рисунке 25 приведена часть секвенограммы, охватывающая область полиморфного А-тракта в четвертом интроне *VRN-A1*, полученная в результате секвенирования продуктов амплификации с парой праймеров Ex4F2m3 / Ex4AR245m3 образца *T. sphaerosocum*, несущего 3 разных гаплотипа по данному участку и ген *VRN-D4* (PI 70711). В данном случае, полиморфизм А-тракта (делеция/инсерция 2 п.н.) приводит к наложению, и перекрыванию спектров флюоресценции полученных от разных копий *VRN-A1*, в результате, расшифровка первичной структуры анализируемого участка гена после сайта локализации мутации не представляется возможной.

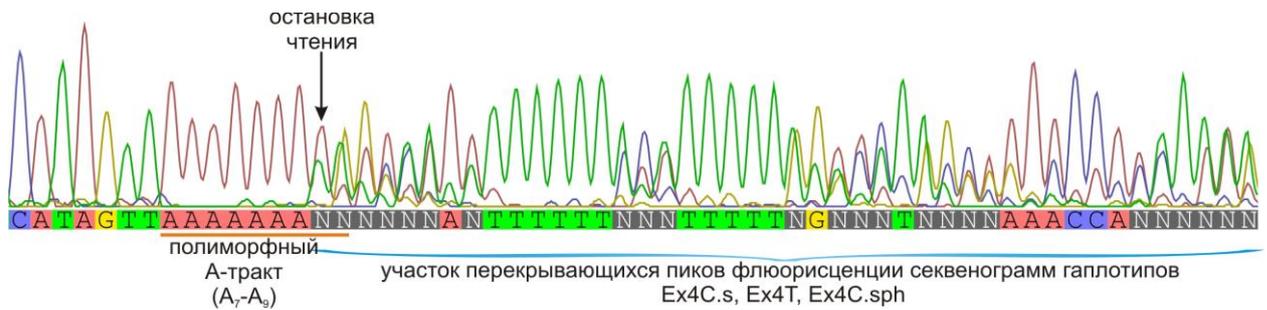


Рисунок 25. Фрагмент хроматограммы секвенирования продуктов ПЦР образца *T. sphaerococcum* (PI 70711) с парой праймеров Ex4F2m3 / Ex4AR245m3 (Мутерко и др. 2017). Обозначена позиция, после которой расшифровка секвенограммы становится невозможной, вследствие наложения хроматограмм гаплотипов Ex4C.sph, Ex4C.s, Ex4T генов *VRN-A1* и *VRN-D4*.

Исследование осложняется также и тем, что области, фланкирующие анализируемый участок *VRN-A1* являются высоко консервативными в гомеологичных генах данной серии. В результате потребовалась разработка специальных праймеров к ОНП и оптимизация условий проведения ПЦР-анализа. В аллель-специфических праймерах Ex4F2m3, Ex4outV4F2m3, V4/R2m3, Ex4AR245m3 и Ex7/T/R2m3 однонуклеотидный полиморфизм, различающий ДНК последовательности в гомеологичных генах *VRN1*, или ген *VRN-D4*, локализован во второй позиции праймера, относительно 3' конца. Кроме того, для дополнительной дестабилизации ДНК-спирали, нарушение комплементарности искусственно создано в соседней позиции 3. Некомплементарный нуклеотид в данной позиции подбирался исходя из его окружения, а также основываясь на результатах влияния типа некомплементарной пары на стабильность ДНК-спирали (Liu et al. 2012). Предполагается, что не спаренный нуклеотид во второй позиции инициирует расплетение спирали ДНК, охватывающее три нуклеотида (с 1 по 3 нуклеотид от 3' конца праймера) и предотвращая последующую элонгацию цепи ДНК-полимеразой. В случае, когда нарушение комплементарности во второй позиции от 3' конца праймера отсутствует, единственная некомплементарная пара в соседней, третьей позиции оказывает не значительное влияние на эффективность отжига праймера (Liu et al. 2012). В ходе ПЦР-анализа с использованием разработанных аллель-специфических праймеров, не целевые фрагменты, полученные в результате амплификации альтернативных аллелей, не наблюдались. В связи с

этим, предполагается, что локализация ОНП во второй позиции и введение некоплементарного нуклеотида в третью позицию, относительно 3' конца, является эффективным подходом в разработке аллель-специфических праймеров для генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов.

Введение некоплементарного нуклеотида в четвертую позицию (вместо третьей) от 3' конца праймера Ex7/C/R2m4 обусловлено необходимостью исключения образования димеров. Кроме того, для возможности осуществления мультиплекс реакции с участием одновременно обоих аллель-специфических праймеров к экзону-7, один из праймеров был дополнительно оптимизирован. В частности, в праймере Ex7/T/R2m3 из 32 нуклеотидов только 19 участвуют в заякоривании на ДНК матрице, остальные 13 представляют собой не комплементарную линкерную последовательность, которая обеспечивает различимую при электрофорезе разницу длин целевых фрагментов мультиплекс АС ПЦР.

3.5.7. Обсуждение результатов исследования гаплотипов экзона 4 и 7 гена *VRN-A1*

Ранее, исследование полиморфизма экзонов 4 и 7 гена *VRN-A1* проводилось для небольшого количества сортов мягкой пшеницы. В настоящем исследовании анализ проведен на генетическом материале шести видов тетраплоидной и пяти видов гексаплоидной пшеницы. Таким образом, были охвачены практически все наиболее востребованные в селекции виды полиплоидной пшеницы, включая всё разнообразие аллельных вариантов гена *VRN-A1*, встречающихся в них.

Поскольку в процессе исследования более 150 образцов 11 видов полиплоидной пшеницы идентифицирован только один образец с мутантным экзон-4 *VRN-A1* (гаплотип Ex4T) в одиночном представлении, нельзя исключать, что в данном образце одна из копий *VRN-A1* содержит мутации в анализируемой области этого гена, исключающие ее обнаружение при данных условиях анализа, или же отсутствует вовсе, в связи с хромосомными перестройками. В остальных случаях, мутантный тип экзона-4 *VRN-A1*, также как и мутантный тип седьмого экзона этого гена (Ex7T), наблюдался только в сочетании с гаплотипом Ex4C.m, и,

за исключением аллеля *Vrn-A1j* (содержит мутации в области промотора), только в образцах видов гексаплоидной пшеницы с рецессивным аллелем *vrn-A1*. В этой связи, предполагается, что полиморфизм аденинового тракта в экзоне-4 *VRN-A1* характерен только для представителей гексаплоидной пшеницы, содержащих не менее двух копий этого гена на геном. Более того, в ходе скрининга доступных из публичных баз данных ДНК последовательностей экзонов 4 и 7 гена *VRN-A1*, гаплотип Ex4C.s/7C идентифицирован в диплоидной пшенице *T. monococcum* и *T. urartu*, что указывает на более раннее, по сравнению с Ex4C.f, Ex4C.m, Ex4T, происхождение этого гаплотипа и характеризует его как дикий тип. Мутантный гаплотип Ex4T/7T, вероятно, дивергировал в гексаплоидной пшенице из рецессивного аллеля *vrn-A1* с гаплотипом Ex4C.m/7T. Таким образом, присутствие гена *VRN-D4* или доминантного аллеля *VRN-A1* в гетерозиготе в образцах гексаплоидной пшеницы, несущих гаплотип Ex4T, может быть установлено по наличию специфического гаплотипа четвертого экзона, Ex4C.s или Ex4C.f для аллелей *Vrn-A1a/e/i*. Полученные данные также свидетельствуют о том, что гексаплоидные виды пшеницы, вероятно, имеют общее происхождение.

Выявленные ассоциации гаплотипов экзона-4 и экзона-7 в различных аллелях гена *VRN-A1*, представленного различным числом копий в геноме позволяют предположить изображенный на Рисунке 26 порядок дивергенции комбинаций этих гаплотипов в процессе эволюции пшеницы. Согласно установленным филогенетическим взаимоотношениям между альтернативными гаплотипами экзонов 4 и 7 *VRN-A1*, дивергенция седьмого экзона произошла раньше, чем четвертого, следовательно, вторая и третья копии гена *VRN-A1* с гаплотипом Ex4T/7T дивергировали последовательно в филогенетической линии гаплотипа Ex4C.m/7T. В этой связи, предполагается, что явление многокопийности *VRN-A1* в гексаплоидной пшенице ассоциировано с мутантным типом Ex4T экзона-4 и мутантным типом Ex7T экзона-7, образующие комбинации Ex4C.m/7T, Ex4T/7T или Ex4C.m/7T, Ex4T/7T, Ex4T/7T для двух и трех копий гена *VRN-A1*, соответственно. Таким образом, полиморфизм экзона-4 гена *VRN-A1*, наблюдаемый исключительно в гексаплоидной пшенице, ассоциирован с мутантным типом экзона-7, различным соотношением мутантных и интактных гаплотипов экзона-4, а также наличием не менее двух копий этого гена в геноме.

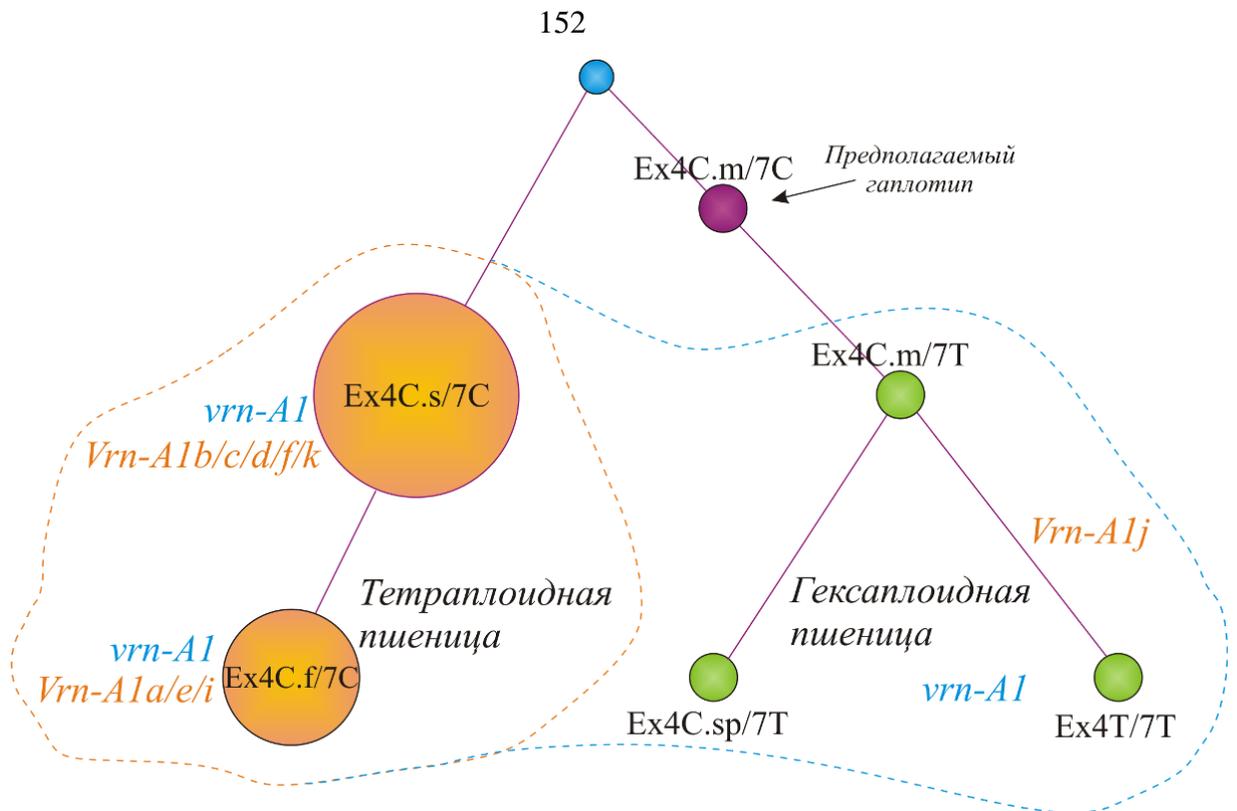


Рисунок 26. Филогенетические взаимоотношения и предполагаемый порядок дивергенции гаплотипов экзона-4 и экзона-7 гена *VRN-A1*.

В предыдущем исследовании, интактный гаплотип Ex4C был установлен для доминантных аллелей *Vrn-A1a* и *Vrn-A1b* (Eagles et al. 2011). Однако, обзор литературных источников не выявил данные об исследовании полиморфизма четвертого экзона в других аллелях этого гена. Кроме того, полиморфизм экзона-7 ранее не был охарактеризован ни для одного из аллелей *VRN-A1*.

Существовало предположение, что доминантные аллели *Vrn-A1a* и *Vrn-A1b* происходят от общего ближайшего предка (Eagles et al. 2011). Настоящее исследование показало, что практически все известные доминантные аллели *VRN-A1* характеризуются гаплотипом дикого типа как в четвертом, так и в седьмом экзонах, Ex4C.s/7C или Ex4C.f/7C. Кроме того, установлено, что хотя аллели *Vrn-A1a* и *Vrn-A1b* не различаются первичной структурой экзона-4, происходят они из разных филогенетических линий, берущих начало от гаплотипов Ex4C.s и Ex4C.f, соответственно.

Долгое время считалось, что мутация Leu¹¹⁷/Phe¹¹⁷ (Ex4T) ассоциирована с мутацией Ala¹⁸⁰/Val¹⁸⁰ (Ex7T). Однако следует отметить, что данные исследования проводились без учета многокопийности гена *VRN-A1* и, соответственно, не

принималась во внимание возможность наличия в геноме нескольких копий *VRN-A1* с альтернативными гаплотипами экзона-4 и экзона-7, представленных различными комбинациями. Позже было показано, что гаплотип Ex4C может образовывать альтернативные комбинации с гаплотипами экзона-7. В частности, был идентифицирован гаплотип Ex4C/7T в образцах, содержащих 2-3 копии гена *VRN-A1* (Diaz et al. 2012). В связи с этим предполагалось, что не представляется возможным определение типа экзона-7 исходя из гаплотипа экзона-4 и наоборот (Yan et al. 2015). В настоящем исследовании показано, что дикий тип экзона-7 и мутантный тип экзона-4 ассоциированы с аналогичными гаплотипами экзонов 4 и 7, соответственно. Таким образом, гаплотипы Ex7T и Ex4C могут быть определены исходя из присутствия гаплотипов Ex4T и Ex7C соответственно, в данной копии гена *VRN-A1*.

В недавнем масштабном исследовании вариабельности количества копий гена *VRN-A1* в гексаплоидной пшенице *T. aestivum* было показано, что только менее 10% сортов содержат одну копию этого гена, в то время как подавляющее большинство озимых сортов несут 2-3 копии, и только в 3 образцах (0.3%) выявлено 4 копии (Würschum et al. 2015). Следует отметить, что данное исследование выполнялось без учета наличия гена *VRN-D4*. Таким образом, нельзя исключать, что в образцах с четырьмя копиями *VRN-A1*, одна из этих копий является геном *VRN-D4*, поскольку анализируемый в данном исследовании участок ДНК идентичен для обоих генов. В проанализированном в настоящем исследовании генетическом материале, подавляющее большинство образцов гексаплоидной пшеницы с рецессивным аллелем *vrn-A1* несли одновременно оба, дикий и мутантный типы четвертого экзона в сочетании с мутантным экзоном-7 этого гена (гаплотип Ex4C7T/Ex4T7T), подтверждая не менее двух копий *VRN-A1* на геном.

Образцы гексаплоидной пшеницы с предположительно одной копией гена *VRN-A1* (гаплотипы Ex4C.f, Ex4C.s или Ex4C.m в одиночном представлении) выявлены преимущественно в *T. sphaerococcum* и в ряде западноевропейских сортов мягкой пшеницы (*T. aestivum*), что также согласуется с результатами исследования географического распространения озимых сортов *T. aestivum*, вариабельных по количеству копий гена *VRN-A1* (Würschum et al. 2015).

Еще в предыдущих исследованиях было замечено, что гаплотип Ex7C преобладает в яровых сортах, тогда как гаплотип Ex7T детектируется главным образом в озимых (Sherman et al. 2004; Chen et al. 2009). Существовало даже предположение, что гаплотип Ex7C ассоциирован с яровым типом развития, тогда как наличие гаплотипа Ex7T коррелировало с потребностью в яровизации (озимый тип развития) (Chen et al. 2009). В настоящем исследовании установлено, что почти все известные доминантные аллели гена *VRN-A1* имеют гаплотип Ex7C, в то время как подавляющее большинство образцов с рецессивным аллелем *vrn-A1* характеризуются гаплотипом Ex7T. В частности, наличие двух и более копий гена *VRN-A1*, а это, согласно последним данным, составляет 95% сортов озимой мягкой пшеницы, ассоциировано с гаплотипом Ex7T. Среди доминантных аллелей гена *VRN-A1*, гаплотип Ex7T детектирован только в аллелях *Vrn-A1c(IL369)* и *Vrn-A1j*.

В связи с тем, что в настоящем исследовании показана идентичность интактного типа экзонов 4 и 7 (гаплотип Ex4C7C) для гена *VRN-D4*, *VRN-A1* в диплоидной тетраплоидной пшенице, а также для подавляющего большинства доминантных аллелей этого гена, необходимость идентификации типа четвертого и седьмого экзонов *VRN-A1* существует только для образцов гексаплоидной пшеницы с рецессивным аллелем этого гена, а необходимость генотипирования по *VRN-D4* – только для гексаплоидной пшеницы с гаплотипом Ex7C.

Результаты исследования распространения гаплотипов экзона-4 и экзона-7 гена *VRN-A1* в различных видах полиплоидной пшеницы, их комбинаций, ассоциаций с различными аллелями и количеством копий гена *VRN-A1* позволяют предположить, что дальнейшее возникновение новых аллелей гена *VRN-A1* в гексаплоидной пшенице будет ассоциировано с присутствием нескольких копий гена *VRN-A1*. При этом кодирующая последовательность этих аллелей во многих случаях будет характеризоваться наличием С->Т транзиции в четвертом и/или седьмом экзонах. Высокая вероятность данного прогноза поддерживается структурой аллелей *Vrn-A1c(IL369)* и *Vrn-A1j*, которые, в отличие от других известных аллелей гена *VRN-A1*, имеют происхождение в гексаплоидной пшенице и обладают вышеперечисленными характеристиками.

Знания о распространенности альтернативных гаплотипов экзона-4 и экзона-7 гена *VRN-A1* в полиплоидной пшенице разных видов с различными аллелями гена

VRN-A1, а также простой и надежный способ их достоверной идентификации, являются основанием для дальнейшего планирования и проведения исследований фенотипического эффекта соотношения копий гена *VRN-A1*, экспрессирующихся в продукты с различной функциональной активностью, на ключевые, агрономически ценные признаки пшеницы.

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

Отдельного внимания заслуживает описание результатов исследования аллельного разнообразия генов *VRN* в сортах *T. durum*. Прежде всего, это связано с тем, что обнаруженные данные могут иметь значительное влияние на предопределение направления и ход дальнейшей селекции твердой пшеницы. В отличие от большинства ранее проанализированных образцов полиплоидной пшеницы, данные образцы *T. durum* являются сортовым материалом и испытали действие искусственного отбора, направленного на получение генотипов, максимально адаптированных к условиям региона культивирования. Следовательно, аллельный состав этих сортов отображает результаты предыдущих отборов и позволяет судить о преимуществе внедрения тех или иных аллелей в селекцию твердой пшеницы в каждом конкретном эколого-географическом регионе. Кроме того, в процессе анализа сортов *T. durum* были обнаружены факты, ранее не наблюдавшиеся в течение многолетних исследований пшеницы. Наконец, исследование сортового материала, который уже прошел все этапы селекционного процесса и поставляется в качестве готового сырья для пищевой и перерабатывающей промышленности, очевидно, имеет большую практическую ценность, чем анализ образцов являющихся лишь потенциальными донорами генетического материала, который только при определенных обстоятельствах может быть впоследствии внедрен в длительный селекционный процесс с неопределенным результатом.

Несмотря на то, что по посевным площадям твердая пшеница занимает второе место в мире после мягкой пшеницы (*T. aestivum*), сорта *T. durum* остаются плохо изученными по аллельному составу генов *VRN*. В этой связи аллельное разнообразие генов *VRN-A1*, *VRN-B1* и *VRN-B3* было исследовано в коллекции из 134 сортов *T. durum* из 17 стран с преобладанием сортов из Украины и России (Приложение 15). Анализ сортов *T. durum* проводился с использованием ранее предложенных диагностических ДНК-маркеров. С целью выявления специфических аллельных комбинаций для каждого географического региона (страны), ассоциированных с их адаптивным преимуществом в данной местности и

отражающих направление селекции твердой пшеницы в конкретных центрах культивирования сорта, были сгруппированы в соответствии с их предполагаемой скороспелостью путем последовательной кластеризации в порядке, отражающем влияние различных генов *VRN* на время колошения: *VRN-A1* > *VRN-B1* > *VRN-B3*.

3.6.1. Оценка аллельного разнообразия генов *VRN1* в *T. durum*

Три пары праймеров были использованы для идентификации аллельных вариантов гена *VRN-A1* в ходе ПЦР анализа. Несмотря на то, что пара праймеров *VRN1AF/VRN1-INT1R* фланкирует более чем 460 п.н. в области промотора, экзон-1 и часть интрона-1, полиморфизм длины продуктов амплификации до настоящего времени ассоциирован исключительно с мутациями в области промотора этого гена и не обнаружен для охватываемой части транскрибируемой последовательности. Это позволяет дифференцировать более 10 аллелей промотора гена *VRN-A1*, основываясь только на полиморфизме длины фрагментов ПЦР. Кроме того, как было продемонстрировано ранее в настоящем исследовании, информативность некоторых ДНК-маркеров может быть значительно повышена путем проведения электрофореза в ПААГ в специальных условиях, позволяющих детектировать не менее семи дополнительных аллельных вариантов *VRN-A1*, избегая процесс секвенирования и связанных с ним ошибок (Muterko et al. 2016a). Присутствие или отсутствие протяженных делеций в первом интроне гена *VRN-A1* определялось в ходе индивидуальных ПЦР с парами праймеров *Ex1/C/F* - *Intr1/A/R3* и *Vrn-A1-intr_F* - *Vrn-A1-intr_R1*. Фрагмент длиной 522 п.н. амплифицируется с использованием пары праймеров *Ex1/C/F* и *Intr1/A/R3*, детектируя аллель *Vrn-A1c* (Langdon), тогда как ампликоны 541 п.н., амплифицируемые парой праймеров *Vrn-A1-intr_F* и *Vrn-A1-intr_R1* идентифицируют интактный интрон-1 гена *VRN-A1*.

В ходе исследования аллельного разнообразия по гену *VRN-A1* в твердой пшенице было установлено, что все яровые сорта *T. durum* содержат доминантный аллель гена *VRN-A1* (Приложение 15). При этом подавляющее большинство сортов (72%), доминантных по *VRN-A1*, несут делецию 7.2 кб в первом интроне этого гена, которая характеризует аллель *Vrn-A1c* (Langdon) (GB: KX139172), тогда как только 28 % сортов содержали мутации в области промотора. Преобладание аллеля *Vrn-*

Alc является нетипичным для большинства видов тетраплоидной пшеницы, таких как *Triticum dicoccoides*, *Triticum dicoccum*, *Triticum turgidum* или *Triticum carthlicum*, хотя характерно для вида *Triticum polonicum* (Muterko et al. 2016a).

Идентифицировано 5 аллельных вариантов гена *VRN-A1* с мутациями в области промотора: *Vrn-A1a.1* (GB: KX139174), *Vrn-A1b.1* (GB: KX268729), *vrn-A1b.3* (GB: KU738895), *Vrn-A1b.6* (GB: KX139169-KX139170) и *Vrn-A1i* (GB: KX139167). Среди них наиболее распространенным был аллель *Vrn-A1b.6* (20 сортов), тогда как оригинальный вариант *Vrn-A1b.1* детектирован только в четырех сортах. Широко распространенные среди представителей вида *T. turgidum* аллели *Vrn-A1i* и *vrn-A1b.3* (Muterko et al. 2016a), в настоящем исследовании выявлены только в четырех сортах *T. durum*. В сорте Харьковская 1, который согласно паспортным данным является озимым, детектирован аллель *vrn-A1b.3*. Аллель *Vrn-A1i*, несущий ОНП в А-тракте VRN-бокса, идентифицирован в сортах Ширван 3, Ширван 5 и GK Basa из Азербайджана и Венгрии, соответственно.

Доминантный аллель *Vrn-A1a*, содержащий инсерцию MITE в области промотора, характерен для многих сортов гексаплоидной пшеницы вида *T. aestivum* и получил широкое распространение в культуре после 1970 года (Yan et al. 2004a). В настоящем исследовании 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. Это указывает на специфичность аллеля *Vrn-A1a.1* для Российских сортов твердой пшеницы.

Электрофорез в полиакриламидном геле фрагментов ПЦР, полученных с помощью праймеров Pr1 и Pr2, был проведен для дискриминации вариантов последовательности промотора гена *VRN-B1*. В результате анализа установлено, что 13 сортов *T. durum* несут аллель *VRN-B1.s*, содержащий делеции 7, 3 и 2 п.н. в области промотора. Сорта с *VRN-B1.s* преобладали в России. В сорте Гордеиформе 1857-6 из Казахстана вывален аллель *VRN-B1.m* (делеции 2 и 3 п.н. в промоторе, GB: KX139168), который мало распространен в полиплоидной пшенице и ранее идентифицирован только в немногочисленных образцах вида *T. dicoccoides* (Shcherban et al. 2015; Muterko et al. 2016a). Остальные образцы твердой пшеницы характеризовались интактным промотором *VRN-B1* (аллель *VRN-B1.f*).

В настоящем исследовании была установлена связь аллелей *Vrn-A1i* и *VRN-B1.s* с понижением чувствительности к яровизации. В этой связи сорт GK Basa несущий аллели *Vrn-A1i* и *VRN-B1.s* был выращен в тепличных условиях на удлиненном фотопериоде (24 ч освещение) и без яровизации. Время колошения данного сорта было на 3 дня позже, чем у образца гексаплоидной пшеницы (PI 186391) с аллелем *Vrn-D1a* (*Vrn-D1a/VRN-B1.f*, факультативный тип развития). Данное наблюдение подтверждает предсказываемую дату колошения для генотипа *Vrn-A1i/VRN-B1.s* (Muterko et al. 2016a). Однако следует отметить, что при данных условиях выращивания (отсутствие темновой фазы) наблюдается сдвиг соответствующих этапов развития (выход в трубку и время колошения) приблизительно на 70 дней. Этот поздноцветущий фенотип, предсказываемый для сортов *T. durum* с факультативным типом развития, открывает новые возможности в селекции твердой пшеницы. Тем не менее, требуется проведение генетического анализа для подтверждения влияния мутаций в аллелях *Vrn-A1i* и *VRN-B1.s* на чувствительность к яровизации и время колошения.

В результате анализа первого интрона гена *VRN-B1* методом мультиплекс ПЦР с праймерами Ex1/C/F, Intr1/B/R3 и Intr1/B/R4 установлено, что доминантные аллели *VRN-B1*, содержащие протяженные делеции в интроне-1, преобладают в сортах *T. durum* из Украины, России и Казахстана, при этом во всех этих сортах идентифицирован аллель *Vrn-B1c* (GB: KX139173). Данный аллель также обнаружен в сорте Firat 1 (Турция) и Medora (Канада). Только в одном сорте Avonlea (США) идентифицирован аллель *Vrn-B1a*. Ампликоны, полученные при анализе сорта Гордеиформе 1857-6 мигрировали через ПААГ более медленно, чем фрагменты ПЦР, характерные для рецессивного аллеля *vrn-B1*. Однако эта разница не наблюдалась при электрофорезе в агарозных гелях. В этой связи предполагается, что наблюдаемая разница в подвижности ампликонов обусловлена полиморфизмом в последовательности A-трактов.

Ранее, в настоящей работе, при исследовании 21 образца *T. durum* из различных стран за исключением России, Украины и Казахстана только в одном образце был идентифицирован доминантный аллель гена *VRN-B1* (*Vrn-B1a*). В этой связи на первый взгляд кажется, что доминантные аллели *VRN-B1* не характерны для *T. durum*. Однако в результате расширения выборки генотипов и привлечения

материала из других географических регионов была выявлена высокая частота встречаемости аллеля *Vrn-B1c* в сортах твердой пшеницы из Украины, России и Казахстана, что резко отличает их от сортов *T. durum* из других стран. По сравнению с другими видами тетраплоидной пшеницы, аллель *Vrn-B1c* был обнаружен также среди представителей *T. dicoccoides* и *T. dicoccum*, но не наблюдался в *T. polonicum*, *T. turgidum* и *T. carthlicum*. Распространение аллеля *Vrn-B1c* среди сортов *T. durum* похоже на его распространение в сортах мягкой пшеницы (*T. aestivum*), где он преобладает в сортах из стран Восточной Европы и России (Milec et al. 2013; Shcherban et al. 2012). Такое распределение является результатом предыдущих отборов и, вероятно, свидетельствует о селективном преимуществе аллеля *Vrn-B1c* в пшенице из этих географических регионов.

3.6.2. Исследование гена *VRN-B3* в сортах твердой пшеницы

В предыдущих исследованиях было идентифицировано не менее четырех аллельных вариантов гена *VRN-B3*, 2 доминантных и 2 рецессивных (Yan et al. 2006; Chen et al. 2013; Derakhshan et al. 2013). Доминантные аллели гена *VRN-B3* встречаются крайне редко и ранее выявлены в немногочисленных сортах гексаплоидной пшеницы вида *T. aestivum* (Yan et al. 2006; Zhang et al. 2008; Iqbal et al. 2011; Chen et al. 2013; Derakhshan et al. 2013). В этой связи, неожиданно стало обнаружение аллеля *Vrn-B3a* (GB: KX139171) в 28 сортах *T. durum* (Рисунок 27). Среди них преобладали сорта из Украины (79 %), кроме того 5 сортов имели Российское происхождение и один сорт из Казахстана. Это позволяет предположить, что в настоящее время Украинский пул сортов *T. durum* является самым крупным генетическим источником аллеля *Vrn-B3a* в мире.

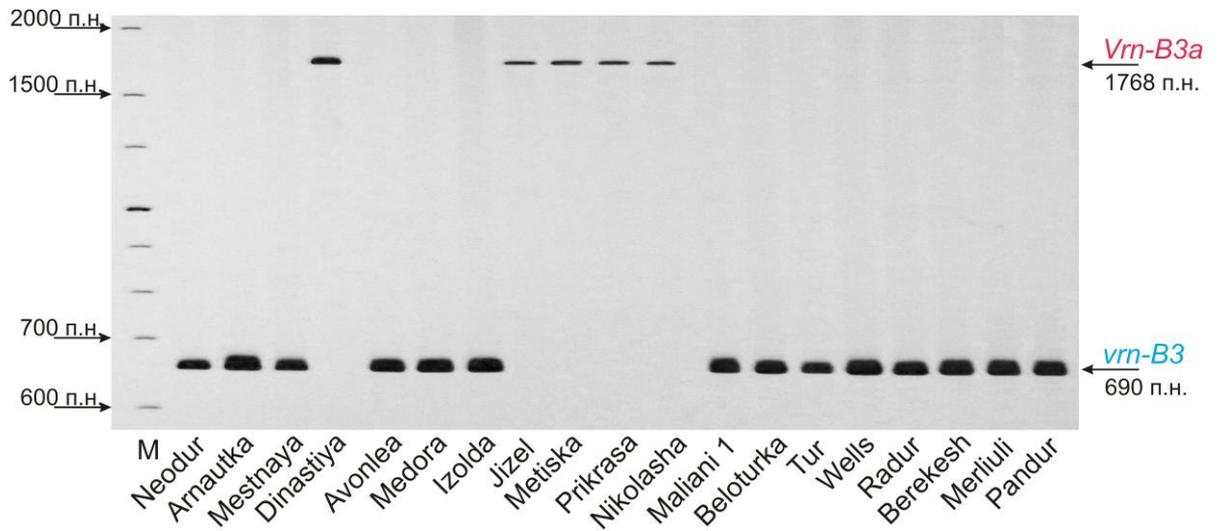


Рисунок 27. Электрофорез в ПААГ продуктов мультиплекс-ПЦР анализа сортов *T. durum* с праймерами FT-B-INS-F, VRN4-B-NOINS-F2 и VRN4-B-NOINS-R (Muterko et al. 2016b). Обозначены фрагменты ПЦР, детектирующие доминантный *Vrn-B3a* и рецессивный *vrn-B3* аллели. М – маркер длины ДНК.

Аллель *Vrn-B3a* идентифицирован только в комбинации с доминантными аллелями гена *VRN-A1* (25%) или, чаще, в комбинации с доминантными аллелями обоих генов *VRN1* (75%). Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что, в отличие от существующего в настоящее время предположения о происхождении доминантных аллелей гена *VRN-B3*, доминантный аллель *Vrn-B3a* имеет более раннее происхождение в тетраплоидной пшенице, а не в гексаплоидной.

3.6.3. Анализ комбинации аллелей *VRN* в сортах *T. durum* из разных центров культивирования

Иерархический кластерный анализ детально представлен на рисунке 28 и обобщен в таблице 7.

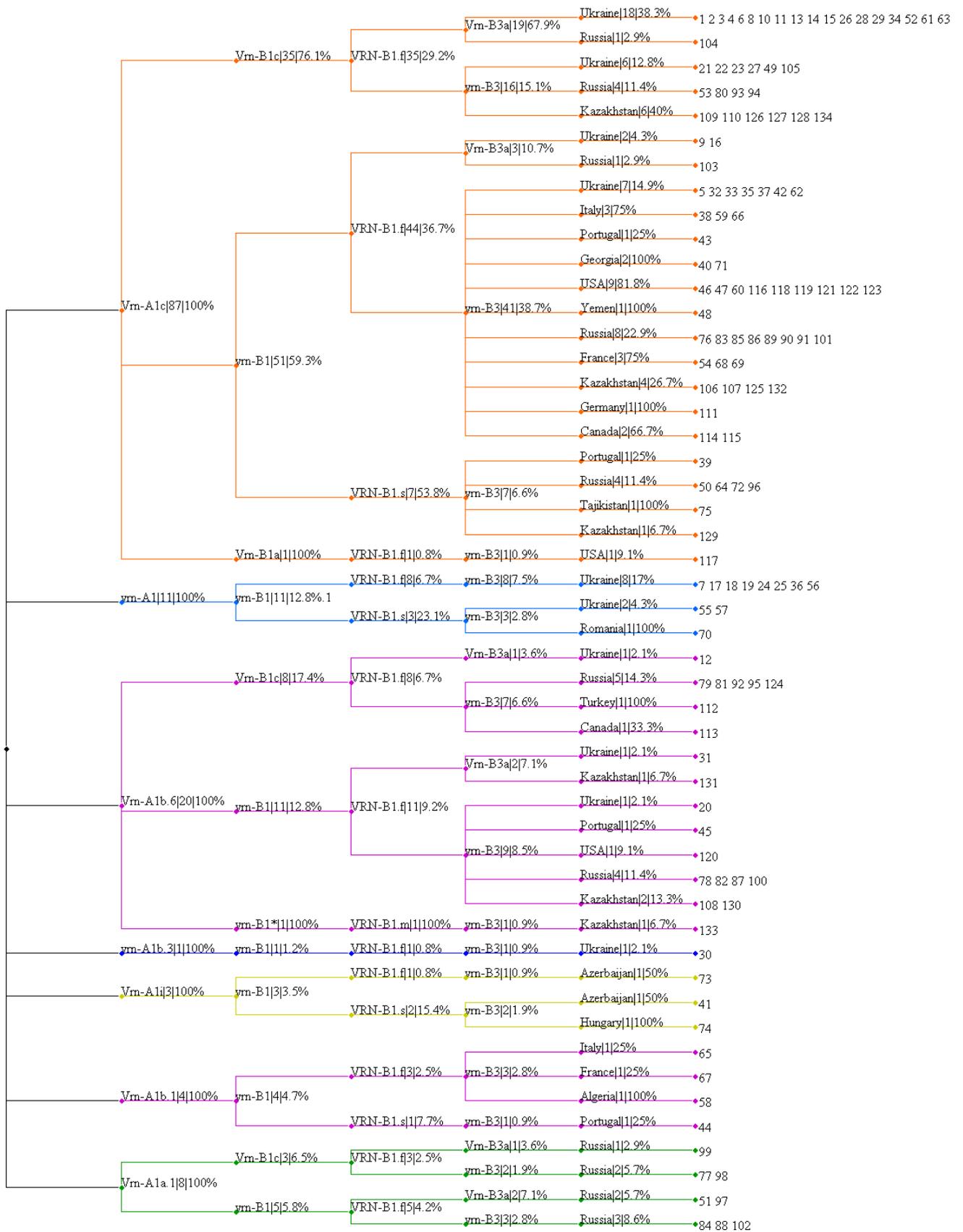


Рисунок 28. Прямоугольная кладограмма, отображающая результат последовательной иерархической кластеризации сортов *T. durum* по генам *VRN*, в порядке, характеризующем их влияние на сроки колошения ($VRN-A1 > VRN-B1 >$

VRN-B3) (Muterko et al. 2016b). Каждый узел содержит информацию об аллельном варианте соответствующего гена *VRN*, количестве сортов несущих комбинацию аллелей *VRN*, сформированную из узлов предыдущих порядков данной ветви, а также процентную долю этих сортов из общего числа сортов, содержащих одноименный аллель. В узлах последнего яруса представлены порядковые номера сортов согласно их перечню в приложении 15.

Кладограмма иллюстрирует результат кластеризации сортов *T. durum* в соответствии с аллельным составом генов *VRN*. Кроме того, для каждого узла представлена информация о количестве сортов, несущих комбинацию генов *VRN*, сформированную из аллелей предыдущих порядков данной ветви и фракции сортов с данной комбинацией относительно всех сортов, обладающих аллелем из данного узла. К примеру, доминантный аллель *Vrn-B3a* представлен в шести комбинациях, при этом 67.9 % сортов с данным аллелем характеризуются комбинацией *Vrn-A1c/Vrn-B1c/VRN-B1.f/Vrn-B3a* (доминантны по всем трем генам *VRN*). Соответственно, в узлах последнего порядка представлена информация о количестве сортов с данной комбинацией аллелей *VRN* и их доля в выборке сортов *T. durum* из конкретного географического региона (страны).

Всего идентифицировано 22 аллельных комбинаций генов *VRN* (Таблица 7). Наиболее распространенными комбинациями вне зависимости от происхождения сортов, являются комбинации *Vrn-A1c/VRN-B1.f/vrn-B1/vrn-B3* и *Vrn-A1b.6/VRN-B1.f/vrn-B1/vrn-B3*, т.е. преобладают сорта содержащие только доминантный аллель одного гена *Vrn-A1* (*Vrn-A1c* или *Vrn-A1b*).

Таблица 7. Комбинации аллелей генов *VRN* в сортах *T. durum* из различных центров культивирования.

Комбинации аллелей <i>VRN</i>	Число сортов	Частота встречаемости (%)					
		Амер ика	Евро па	Росс ия	Укра ина	Казах стан	Осталь ные
<i>Vrn-A1c/VRN-B1.f/Vrn-B1c/Vrn-B3a</i>	19			5	95		
<i>Vrn-A1c/VRN-B1.f/vrn-B1/vrn-B3</i>	41	27	18	20	17	10	7
<i>vrn-A1/VRN-B1.f/vrn-B1/vrn-B3</i>	8				100		

Комбинации аллелей <i>VRN</i>	Число сортов	Частота встречаемости (%)					
		Амер ика	Евро па	Росс ия	Укра ина	Казах стан	Осталь ные
<i>Vrn-A1c/VRN-B1.f/vrn-B1/Vrn-B3a</i>	3			33	67		
<i>Vrn-A1b.6/VRN-B1.f/Vrn-B1c/Vrn-B3a</i>	1				100		
<i>Vrn-A1b.6/VRN-B1.f/vrn-B1/vrn-B3</i>	9	11	11	45	11	22	
<i>Vrn-A1c/VRN-B1.f/Vrn-B1c/vrn-B3</i>	16			26	37	37	
<i>vrn-A1b.3/VRN-B1.f/vrn-B1/vrn-B3</i>	1				100		
<i>Vrn-A1b.6/VRN-B1.f/vrn-B1/Vrn-B3a</i>	2				50	50	
<i>Vrn-A1c/VRN-B1.s/vrn-B1/vrn-B3</i>	7		14	58		14	14
<i>Vrn-A1i/VRN-B1.s/vrn-B1/vrn-B3</i>	2		50				50
<i>Vrn-A1b.1/VRN-B1.s/vrn-B1/vrn-B3</i>	1		100				
<i>Vrn-A1a.1/VRN-B1.f/vrn-B1/Vrn-B3a</i>	2			100			
<i>vrn-A1/VRN-B1.s/vrn-B1/vrn-B3</i>	3		33		67		
<i>Vrn-A1b.1/VRN-B1.f/vrn-B1/vrn-B3</i>	3		67				33
<i>Vrn-A1i/VRN-B1.f/vrn-B1/vrn-B3</i>	1						100
<i>Vrn-A1a.1/VRN-B1.f/Vrn-B1c/vrn-B3</i>	2			100			
<i>Vrn-A1b.6/VRN-B1.f/Vrn-B1c/vrn-B3</i>	7	14		72			14
<i>Vrn-A1a.1/VRN-B1.f/vrn-B1/vrn-B3</i>	3			100			
<i>Vrn-A1a.1/VRN-B1.f/Vrn-B1c/Vrn-B3a</i>	1			100			
<i>Vrn-A1c/VRN-B1.f/Vrn-B1a/vrn-B3</i>	1	100					
<i>Vrn-A1b.6/VRN-B1.m/vrn-B1/vrn-B3</i>	1					100	

Три комбинации аллелей *VRN* были специфичными для сортов из Украины: (1) все три гена *VRN* доминантные, (2) сорт, несущий *vrn-A1b.3* и (3) озимые сорта (все 3 гена *VRN* рецессивные). Хотя 4 комбинации аллелей *VRN* были специфичными для сортов твердой пшеницы из России, все они содержат аллель

Vrn-A1a, который идентифицирован исключительно в сортах из данного географического региона. Кроме того, отличительными особенностями сортов *T. durum* из данных стран являются высокая частота аллеля *Vrn-B1c* и наличие дигенно-доминантных по *VRN-A1* и *VRN-B1* генотипов. Большое количество украинских сортов содержат доминантные аллели *VRN-A1*, *VRN-B1* и *VRN-B3* одновременно (тригенно-доминантные). Как известно аллельные частоты являются результатом предыдущих отборов в ходе селекции. В этой связи, вероятно, что присутствие трех доминантных аллелей генов *VRN* в украинских сортах, способствующее более раннему колошению, является важной региональной адаптацией, которая позволяет избежать влияния высоких летних температур и поражения фитопатогенами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования молекулярно-генетической детерминации и адаптивных реакций системы генов, вовлеченных в контроль типа развития и времени колошения пшеницы, играют важную роль в решении многих теоретических и прикладных задач генетики и селекции. Современные представления о молекулярно-генетических механизмах, регулирующих данные процессы, позволяют более четко понять взаимодействие между ключевыми компонентами системы и более обстоятельно объяснить их влияние на количественные и качественные показатели агрономически ценных признаков.

Слабо окультуренные виды полиплоидной пшеницы, именно благодаря этой своей особенности, характеризуются более широким аллельным разнообразием и набором природных (естественных) мутантов по многим генам, чем более популярные в культивировании виды, поскольку в значительно меньшей степени или чаще всего вообще не подвержены селекции и линейзации. В этой связи, выявление новых источников полиморфизма генов *VRN* и *PPD1* среди естественных мутантов тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы может являться актуальным инструментом поиска новых аллелей для фундаментальных исследований, а также их последующего внедрения в практическую селекцию.

В ходе проведения исследований по теме диссертационной работы проанализирован генетический материал представителей шести видов тетраплоидной и шести видов гексаплоидной пшеницы по аллельному составу генов, определяющих чувствительность пшеницы к яровизации и фотопериоду. Исследован полиморфизм регуляторных участков этих генов. Благодаря привлечению в исследование видов пшеницы, имеющих ограниченный ареал возделывания, удалось идентифицировать новые варианты генов *VRN* и *PPD1*, а также уточнить существующие представления об их структуре, локализации регуляторных участков, происхождении и распространенности их аллельных вариантов в различных видах тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы.

Решающее значение в исследовании полиморфизма, дискриминации гаплотипов и идентификации новых аллелей анализируемых генов имела модуляция кривизны молекул ДНК. Так, полиморфизм на участке промотора генов

VRN1 и *PPD1* ассоциирован с изменением кривизны и гибкости молекулы ДНК, регистрация которого стала основанием для дальнейшего анализа первичной структуры и, как следствие, идентификации новых аллелей и гаплотипов генов *VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN-D1* и *PPD-A1*. Кроме того, именно изменение кривизны ДНК, обусловленное полиморфизмом А-трактов, было взято за основу для разработки особого типа кодоминантных ДНК-маркеров для детекции различных аллелей и гаплотипов. В ходе исследования полиморфизма кодирующей последовательности гена *VRN-A1*, данные маркеры позволили в ходе одной реакции качественно различить альтернативные варианты первичной структуры экзонов 4 и 7, представленные в различных копиях одного гена. Предложенные ДНК-маркеры позволяют существенно сэкономить время анализа, количество реактивов, а также избежать применения дорогостоящих и не всегда доступных процедур, что особенно важно для проведения быстрого скрининга больших коллекций генетического материала.

В результате анализа регуляторных областей и функциональных участков генов *VRN1* и *PPD1* в полиплоидной пшенице были определены виды, являющиеся наиболее перспективными источниками полиморфизма интересующих участков. Например, полиморфизм четвертого и седьмого экзонов гена *VRN-A1* выявлен исключительно в гексаплоидной пшенице, тогда как полиморфизм области промотора гена *PPD-B1*, напротив, сильнее выражен в тетраплоидных видах. То же касается и распределения аллельного разнообразия генов *VRN* и *PPD1* в различных видах пшеницы одной и разной ploidy.

Установленные в настоящем исследовании ассоциации между гаплотипами экзона-4 и экзона-7 гена *VRN-A1* позволили восстановить предполагаемый порядок дивергенции генотипов с различным числом копий этого гена в ходе эволюции пшеницы, а также установить филогенетические линии для различных комбинаций данных гаплотипов.

Поскольку подавление потребности в яровизации является доминантным признаком, то при идентификации новых вариантов генов *VRN1* или *VRN3* в образцах с яровым или факультативным типом развития, независимо от того, в скольких яровых образцах они были детектированы (насколько сильной является ассоциация между присутствием данного аллеля и отсутствием потребности в

яровизации), мы не можем утверждать, что снижение чувствительности к яровизации обусловлено именно присутствием этого нового аллеля, поскольку проявление данного признака может быть определено влиянием неаллельных генов. Однако, достаточно хотя бы одного озимого образца, несущего новый аллель *VRN1* или *VRN3* для того, чтобы с высокой вероятностью предполагать, что данный аллель не снижает чувствительности к яровизации (является рецессивным). К аналогичным умозаключениям можно прийти, рассматривая связь доминантных и рецессивных аллелей генов *PPD1* с чувствительностью пшеницы к продолжительности светового периода суток. Идентифицированные в настоящем исследовании новые рецессивные аллели гена *VRN-A1* (*vrn-A1b.3*, *vrn-A1b.4*) и *PPD-A1* выявлены исключительно в образцах с рецессивным проявлением признака (потребность в яровизации и высокая чувствительность к фотопериоду, соответственно). Новые, предположительно доминантные аллели *Vrn-A1k*, *Vrn-D1s* и *Ppd-A1a.4* оказывают значительное влияние на проявление соответствующего доминантного признака (отсутствие потребности в яровизации и низкая чувствительность к фотопериоду). При этом вышеперечисленные аллели идентифицированы в образцах, рецессивных по всем мажорным генам, определяющим проявление данного признака. В этой связи, хотя генетический анализ является желательным для подтверждения ассоциации между присутствием этих новых аллелей генов *VRN-A1* и *PPD-A1* и проявлением соответствующих доминантных признаков, тем не менее, наличие в данных образцах гипотетических генов, неаллельных известным мажорным генам, но с сопоставимым влиянием на отзывчивость пшеницы к яровизации и фотопериоду, соответственно, кажется маловероятным. Однако генетический анализ, безусловно, необходим для подтверждения ассоциации аллелей *Vrn-A1i* и вариантов последовательности промотора гена *VRN-B1* со снижением чувствительности к яровизации, поскольку, вероятно, эффект, который они оказывают на проявление данного признака (потребность в яровизации) является намного меньшим, чем у известных доминантных аллелей генов *VRN1*. Тем не менее, именно данное обстоятельство открывает перспективу использования этих аллелей в качестве тонкого инструмента для настройки генотипа в соответствии с конкретными задачами селекции.

Настоящее исследование показывает, как использование генофонда дикорастущих и видов гексаплоидной и тетраплоидной пшеницы имеющих ограниченный ареал возделывания открывает широкие возможности для выявления новых аллельных вариантов и гаплотипов генов *VRN* и *PPD1*, которые могут быть полезными как в области фундаментальных исследований структуры, функции и эволюции так и обладают значительным потенциалом в области 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*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мутерко АФ, Балашова ИА, Сиволап ЮМ. ПЦР-анализ промотора и экзона-1 гена *Ppd-B1* в гексаплоидной пшенице. // Биологические системы. – 2013а. - Том. 5. - № 3. - С. 330-336
2. Мутерко АФ, Балашова ИА, Сиволап ЮМ. Идентификация комбинаций мутаций в гаплогруппах гена *Ppd-B1* у тетраплоидной пшеницы видов *Triticum dicoccoides*, *Triticum dicoccum*, *Triticum durum*. // Вестник Харьковского национального аграрного университета Серия биологи. – 2013б. - Т. 3. - № 30. - С. 61-67.
3. Мутерко АФ, Балашова ИА, Сиволап ЮМ. Характеристика малораспространенных видов гексаплоидной и тетраплоидной пшеницы по нуль-аллелям генов *ZCCT-1*. // Научный вестник Ужгородского университета Серия Биологи. – 2013в. - Т. 34. - С. 103-106.
4. Мутерко АФ, Балашова ИА, Сиволап ЮМ. ПЦР-анализ участка промотора гена *Ppd-B1* в тетраплоидной пшенице видов *T. turgidum*, *T. polonicum*, *T. carthlicum*. // Вестник Львовского университета. Серия биологическая. - 2014. - Т. 65. - С. 151-160.
5. Мутерко АФ, Салина ЕА. Анализ полиморфизма экзона-4 гена *VERNALIZATION-A1* у видов полиплоидной пшеницы. // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2017. - Т. 21. - № 3. - С. 323-333.
6. Adam H, Ouellet F, Kane NA, Agharbaoui Z, Major G, Tominaga Y, Sarhan F. Overexpression of *TaVRN1* in *Arabidopsis* promotes early flowering and alters development. // Plant Cell Physiol. - 2007. - V. 48. - № 8. - P. 1192-1206.
7. Alonso-Peral MM, Oliver SN, Casao MC, Greenup AA, Trevaskis B. The promoter of the cereal *VERNALIZATION1* gene is sufficient for transcriptional induction by prolonged cold. // PLoS One. - 2011. - P. e29456.
8. Arzani A, Ashraf M. Cultivated ancient wheats (*Triticum* spp.): a potential source of health-beneficial food products. doi:10.1111/1541-4337.12262.
9. Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. // Mol Biol Evol. - 1999. - V. 16. - № 1. - P. 37-48.

10. Bareket-Samish A, Cohen I, Haran TE. Signals for TBP/TATA box recognition. // *J Mol Biol.* - 2000. - V. 299. - № 4. - P. 965-977.
11. Beales J, Turner A, Griffiths S, Snape JW, Laurie DA. A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). // *Theor Appl Genet.* - 2007. - V. 115. - № 5. - P. 721-733.
12. Bentley AR, Jensen EF, Mackay IJ, Hönicka H, Fladung M, Hori K, Yano M, Mullet JE, Armstead IP, Hayes C, Thorogood D, Lovatt A, Morris R, Pullen N, Mutasa-Göttgens E, Cockram J. Flowering time. In: Cole C (ed). *Genomics and breeding for climate- resilient crops 2*. Springer, Berlin. - 2013. - P. 1-67.
13. Bentley AR, Turner AS, Gosman N, Leigh FJ, Maccaferri M, Dreisigacker S, Greenland A, Laurie DA. Frequency of photoperiod-insensitive *Ppd-A1a* alleles in tetraploid, hexaploid and synthetic hexaploid wheat germplasm. // *Plant Breed.* - 2011. - V. 130. - № 1. - P. 10-15.
14. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. // *Cell.* - 2006. - V. 125. - № 2. - P. 315-326.
15. Bonnin I, Rousset M, Madur D, Sourdille P, Dupuits C, Brunel D, Goldringer I. *FT* genome A and D polymorphisms are associated with the variation of earliness components in hexaploid wheat. // *Theor Appl Genet.* - 2008. - V. 116. - № 3. - P. 383-394.
16. Bucher P. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. // *J Mol Biol.* - 1990. - V. 212. - № 4. - P. 563-578.
17. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus *DIS80* by the PCR followed by high-resolution PAGE. // *Am J Hum Genet.* - 1991. - V. 48. - № 1. - P. 137-144.
18. Bugaut A, Balasubramanian S. 5'-UTR RNA G-quadruplexes: translation regulation and targeting. // *Nucleic Acids Res.* - 2012. - V. 40. - № 11. - P. 4727-4741.
19. Bushuk W. Wheat breeding for end-product use. // *Euphytica.* - 1998. - V. 100. - № 1. - P. 137-145.

20. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. BLAST+: architecture and applications. // BMC Bioinformatics. - 2009. - V. 10. - P. 421.
21. Campoli C, Drosse B, Searle I, Coupland G, von Korff M. Functional characterisation of *HvCO1*, the barley (*Hordeum vulgare*) flowering time ortholog of *CONSTANS*. // Plant J. - 2012. - V. 69. - № 5. - P. 868-880.
22. Cane K, Eagles HA, Laurie DA, Trevaskis B, Vallance N, Eastwood RF, Gororo NN, Kuchel H, Martin PJ. *Ppd-B1* and *Ppd-D1* and their effects in southern Australian wheat. // Crop and Pasture Science. - 2013. - V. 64. - № 2. - P. 100-114.
23. Cavanagh C, Chao S, Wang S, Huang B, Kiani S, Forrest K, Saintenac C, Brown-Guedira G, Akhunova A, See D, Bai G, Bowden R, Pumphrey M, Talbert L, Anderson J, Dreisigacker S, Baenziger S, Carter A, Korzun V, Dvorak J, Dubcovsky J, Sorrells M, Hayden M, Akhunov E. Genomewide comparative diversity uncovers multiple targets of selection for improvement in hexaploid wheat landraces and cultivars. // Proc Natl Acad Sci USA. - 2013. - V. 110. - № 20. - P. 8057-8062.
24. Chen A, Dubcovsky J. Wheat TILLING mutants show that the vernalization gene *VRN1* down-regulates the flowering repressor *VRN2* in leaves but is not essential for flowering. // PLoS Genet. - 2012. - V. 8. - №12. - e1003134.
25. Chen F, Gao M, Zhang J, Zuo A, Shang X, Cui D. Molecular characterization of vernalization and response genes in bread wheat from the Yellow and Huai Valley of China. // BMC Plant Biol. - 2013. - V. 13. - P. 199.
26. Chen Y, Carver B, Wang S, Cao S, Yan L. Genetic regulation of developmental phases in winter wheat. // Mol Breed. - 2010. - V. 26. - № 4. - P. 573-582.
27. Chen Y, Carver BF, Wang S, Zhang F, Yan L. Genetic loci associated with stem elongation and winter dormancy release in wheat. // Theor Appl Genet. - 2009. - V. 118. - № 5. - P. 881-889.
28. Chu CG, Tan CT, Yu GT, Zhong S, Xu SS, Yan L. A novel retrotransposon inserted in the dominant *Vrn-B1* allele confers spring growth habit in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.). // . - 2011. - V. 1. - № 7. - P. 637-645.
29. Civán P, Svec M. Genome-wide analysis of rice (*Oryza sativa* L. // subspjaponica) TATA box and Y Patch promoter elementsGenome. - 2009. - V. 52. - № 3. - P. 294-297.

30. Cockram J, Chiapparino E, Taylor SA, Stamati K, Donini P, Laurie DA, O'sullivan DM. Haplotype analysis of vernalization loci in European barley germplasm reveals novel *VRN-H1* alleles and a predominant winter *VRN-H1/VRN-H2* multi-locus haplotype. // *Theor Appl Genet.* - 2007. - V. 115. - № 7. - P. 993-1001.
31. Cockram J, Jones H, Leigh FJ, O'Sullivan D, Powell W, Laurie DA, Greenland AJ. Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity. // *J Exp Bot.* - 2007. - V. 58. - № 6. - P. 1231-1244.
32. Cockram J, Mackay IJ, O'Sullivan DM. The role of doublestranded break repair in the creation of phenotypic diversity at cereal *VRN1* loci. // *Genetics.* - 2007. - V. 177. - № 4. - P. 2535-2539.
33. Cockram J, Thiel T, Steuernagel B, Stein N, Taudien S, Bailey PC, O'Sullivan DM. Genome dynamics explain the evolution of flowering time CCT domain gene families in the *Poaceae*. // *PLoS One.* - 2012. - P. e45307.
34. Cooper R. Re-discovering ancient wheat varieties as functional foods. // *J Tradit Complement Med.* - 2015. - V. 5. - № 3. - P. 138-143.
35. Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C, Coupland G. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. // *Science.* - 2007. - V. 316. - № 27. - P. 1030-1033.
36. Danyluk J, Kane NA, Breton G, Limin AE, Fowler DB, Sarhan F. *TaVRT-1*, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals. // *Plant Physiol.* - 2003. - V. 132. - № 4. - P. 1849-1860.
37. Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, RübSamen-Waigmann H, Mullins JJ. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of *HIV-1* env genes. // *Science.* - 1993. - V. 262. - № 37. - P. 1257-1261.
38. Derakhshan B, Mohammadi SA, Moghaddam M, Jalal Kamali MR. Molecular characterization of vernalization genes in Iranian wheat landraces. // *Crop Breed J.* - 2013. - V. 3. - № 1. - P. 1-11.
39. Derakhshani B, Mohammadi SA, Moghaddam M, Jalal Kamali MR. Allelic variation of *VRN-1* locus in Iranian wheat landraces. // *Journal of Plant Physiology and Breeding.* - 2013. - P. 45-56.

40. Dhillon T, Pearce SP, Stockinger EJ, Distelfeld A, Li C, Knox AK, Vashegyi I, Vágújfalvi A, Galiba G, Dubcovsky J. Regulation of freezing tolerance and flowering in temperate cereals: the *VRN-1* connection. // *Plant Physiol.* - 2010. - V. 153. - № 4. - P. 1846-1858.
41. Diallo A, Kane N, Agharbaoui Z, Badawi M, Sarhan F. Heterologous expression of wheat *VERNALIZATION 2 (TaVRN2)* gene in *Arabidopsis* delays flowering and enhances freezing tolerance. // *PLoS One.* - 2010. - V. 5. - №1. - e8690.
42. Diallo AO, Ali-Benali MA, Badawi M, Houde M, Sarhan F. Expression of vernalization responsive genes in wheat is associated with histone H3 trimethylation. // *Mol Genet Genomics.* - 2012. - P. 575-590.
43. Diaz A, Zikhali M, Turner A, Isaac P, Laurie D. Copy number variation affecting the *Photoperiod-B1* and *Vernalization-A1* genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*). // *PLoS One.* - 2012. - V. 7. - № 3. - e33234.
44. Diekmann S. The migration anomaly of DNA fragments in polyacrylamide gels allows the detection of small sequence-specific DNA structure variations. // *Electrophoresis.* - 1989. - V. 10. - № 6. - P. 354-359.
45. Diekmann S. Analyzing DNA, curvature in polyacrylamide gels. // *Methods Enzymol.* - 1992. - P. 30-46.
46. Distelfeld A, Li C, Dubcovsky J. Regulation of flowering in temperate cereals. // *Curr Opin Plant Biol.* - 2009. - V. 12. - № 2. - P. 178-184.
47. Distelfeld A, Tranquilli G, Li C, Yan L, Dubcovsky J. Genetic and molecular characterization of the *VRN2* loci in tetraploid wheat. // *Plant Physiol.* - 2009. - V. 149. - № 1. - P. 245-257.
48. Distelfeld A, Dubcovsky J. Characterization of the maintained vegetative phase deletions from diploid wheat and their effect on *VRN2* and *FT* transcript levels. // *Mol Genet Genomics.* - 2010. - V. 283. - № 3. - P. 223-232.
49. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. // *Phytochemistry Bulletin.* - 1987. - V. 19. - P. 11-15.
50. Du Z, Zhao Y, Li N. Genome-wide analysis reveals regulatory role of G4 DNA in gene transcription. // *Genome Res.* - 2008. - V. 18. - № 2. - P. 233-241.
51. Dubcovsky J, Chen C, Yan L. Molecular characterization of the allelic variation at the *VRN-H2* vernalization locus in barley. // *Mol Breed.* - 2005. - P. 395-407.

52. Dubcovsky J, Li C, Distelfeld A, Pidal B, Tranquilli G. Genes and gene networks regulating wheat development. In: Appels R, Eastwood R, Lagudah E, Langridge P, Mackay M, McIntyre L, Sharp P (eds). Proceedings of 11th International Wheat Genetics Symposium. - 2008. - P. 24-29.
53. Dubcovsky J, Lijavetzky D, Appendino L, Tranquilli G. Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. // Theor Appl Genet. - 1998. - V. 97. - № 6. - P. 968-975.
54. Dubcovsky J, Loukoianov A, Fu D, Valarik M, Sanchez A, Yan L. Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes *VRN1* and *VRN2*. // Plant Mol Biol. - 2006. - V. 60. - № 64. - P. 469-480.
55. Eagles HA, Cane K, Trevaskis B. Veery wheats carry an allele of *Vrn-A1* that has implications for freezing tolerance in winter wheats. // Plant Breeding. - 2011. - P. 413-418.
56. Ellerton S. The origin and geographical distribution of *Triticum sphaerococcum* prec. and its cytogenetical behaviour in crosses with *T. vulgare* Vill. // J Genet. - 1939. - V. 38. - P. 307-324.
57. Evans LT. Short day induction of inflorescence initiation in some winter wheat varieties. // Austr J Pl Physiol. - 1987. - V. 14. - № 3. - P. 277-286.
58. Faiger H, Ivanchenko M, Haran TE. Nearest-neighbor non-additivity versus long-range non-additivity in TATA-box structure and its implications for TBP-binding mechanism. // Nucleic Acids Res. - 2007. - V. 35. - № 13. - P. 4409-4419.
59. FAO: FAOSTAT database. Crops: wheat: area harvested: 2014. Режим доступа: <http://www.fao.org/faostat/>.
60. Feldman M, Levy AA. Genome evolution due to allopolyploidization in wheat. // Genetics. - 2012. - V. 192. - № 3. - P. 763-774.
61. Ferguson AA, Jiang N. Mutator-like elements with multiple long terminal inverted repeats in plants. // Comp Funct Genomic. - 2012. - V. 2012. - № 12. - P. 695827.
62. Fu D, Dunbar M, Dubcovsky J. Wheat *VIN3-like* PHD finger genes are up-regulated by vernalization. // Mol Genet Genomics. - 2007. - V. 277. - № 3. - P. 301-313.
63. Fu D, Szucs P, Yan L, Helguera M, Skinner JS, von Zitzewitz J, Hayes PM, Dubcovsky J. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with

- spring growth habit in barley and wheat. // *Mol Genet Genom.* - 2005. - V. 273. - № 1. - P. 54-65.
64. Gendall AR, Levy YY, Wilson A, Dean C. The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. // *Cell.* - 2001. - V. 107. - № 4. - P. 525-535.
65. Golovnina K, Kondratenko E, Blinov A, Goncharov N. Molecular characterization of vernalization loci *VRN1* in wild and cultivated wheats. // *BMC Plant Biology.* - 2010. - V. 10. - № 68. - P. 168-183.
66. Goncharov NP. Genetics of growth habit (spring vs winter) in common wheat: Confirmation of the existence of dominant gene *Vrn4*. // *Theor Appl Genet.* - 2003. - V. 107. - № 4. - P. 768-772.
67. Goncharov NP, Shitova IP. The inheritance of growth habit in old local varieties and landraces of hexaploid wheats. // *Russ J Genet.* - 1999. - V. 35. - № 4. - P. 386–392.
68. Guo Z, Song Y, Zhou R, Ren Z, Jia J. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes of the *Ppd-D1* gene. // *New Phytol.* - 2010. - V. 185. - P. 841-851.
69. Gupta PK, Varshney RK, Sharma PC, Ramesh B. Molecular markers and their applications in wheat breeding. // *Plant Breeding.* - 1999. - V. 118. - № 5. - P. 369–390.
70. Hagerman PJ. Sequence-directed curvature of DNA. // *Annu Rev Biochem.* - 1990. - V. 59. - P. 755-781.
71. Haudry A, Cenci A, Ravel C, Bataillon T, Brunel D, Poncet C, Hochu I, Poirier S, Santoni S, Glémin S, David J. Grinding up wheat: a massive loss of nucleotide diversity since domestication. // *Mol Biol Evol.* - 2007. - V. 24. - № 7. - P. 1506-1517.
72. Heide OM. Control of flowering and reproduction in temperate grasses. // *New Phytol.* - 1994. - V. 128. - № 2. - P. 347–362.
73. Hemming MN, Fieg S, Peacock WJ, Dennis ES, Trevaskis B. Regions associated with repression of the barley (*Hordeum vulgare*) *VERNALIZATION1* gene are not required for cold induction. // *Mol Genet Genomics.* - 2009. - V. 282. - № 2. - P. 107-117.
74. Hemming MN, Peacock WJ, Dennis ES, Trevaskis B. Low temperature and day length cues are integrated to regulate *FLOWERING LOCUS T* in barley. // *Plant Physiol.* - 2008. - V. 147. - № 1. - P. 355-366.

75. Huang L, Wang Q, Zhang LQ, Yuan ZW, Wang JR, Zhang HJ, Zheng YL, Liu DC. Haplotype variations of gene *Ppd-D1* in *Aegilops tauschii* and their implications on wheat origin. // Genet Resour Crop Evol. - 2012. - V. 59. - № 6. - P. 1027-1032.
76. Huson DH, Richter DC, Rausch C, DeZulian T, Franz M, Rupp R. Dendroscope: an interactive viewer for large phylogenetic trees. // BMC Bioinform. - 2007. - V. 8. - № 1. - P. 460-466.
77. Imaizumi T, Schultz TF, Harmon FG, Ho LA, Kay SA. FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. // Science. - 2005. - V. 309. - № 32. - P. 293-297.
78. Iqbal M, Shahzad A, Ahmed I. Allelic variation at the *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Vrn-B3* and *Ppd-D1a* loci of Pakistani spring wheat cultivars. // Electron J Biotechnol. - 2011. - V. 14. - № 1. - P. 1-2.
79. Iwaki K, Haruna S, Niwa T, Kato K. Adaptation and ecological differentiation in wheat with special reference to geographical variation of growth habit and *Vrn* genotype. // Plant Breed. - 2001. - V. 120. - P. 107-114.
80. Iwaki K, Nakagawa K, Kuno H, Kato K. Ecogeographical differentiation in east Asian wheat, revealed from the geographical variation of growth habit and *Vrn* genotype. // Euphytica. - 2000. - V. 111. - P. 137-143.
81. Iyer V, Struhl K. Poly(dA:dT), a ubiquitous promoter element that stimulates transcription via its intrinsic DNA structure. // EMBO J. - 1995. - V. 14. - № 11. - P. 2570-2579.
82. Jiang D, Wang Y, Wang Y, He Y. Repression of *FLOWERING LOCUS C* and *FLOWERING LOCUS T* by the *Arabidopsis* Polycomb repressive complex 2 components. // PLoS One. - 2008. - V. 3. - № 10. - e3404.
83. Johnson BL, Dhaliwal HS. Reproductive isolation of *Triticum boeoticum* and *Triticum urartu* and the origin of the tetraploid wheat. // Am J Bot. - 1976. - V. 63. - № 8. - P. 1088-1094.
84. Juo ZS, Chiu TK, Leiberman PM, Baikalov I, Berk AJ, Dickerson RE. How proteins recognize the TATA box. // J Mol Biol. - 1996. - V. 261. - № 2. - P. 239-254.
85. Kamran A, Iqbal M, Spaner D. Flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L.): a key factor for global adaptability. // Euphytica. - 2014. - V. 197. - P. 1-26.

86. Kane NA, Agharbaoui Z, Diallo AO, Adam H, Tominaga Y, Ouellet F, Sarhan F. TaVRT2 represses transcription of the wheat vernalization gene *TaVRN1*. // *Plant J.* - 2007. - V. 51. - № 4. - P. 670-680.
87. Kato K, Nakagawa K, Kuno H. Chromosomal location of the vernalization response, *Vrn2* and *Vrn4*, in common wheat, *Triticum aestivum* L. // *Wheat Information Service.* - 1993. - V. 76. - № 1. - P. 53.
88. Kato K, Yamashita M, Ishimoto K, Yoshino H, Fujita M. Genetic analysis of two genes for vernalization response, the former *Vrn2* and *Vrn4*, using PCR based molecular markers. In: Pogna NE, Romano N, Pogna EA, Galterio G (eds). *Proceeding of 10th international wheat genetics symposium.* Inst Sperimentale per la Cerealcolture, Paestum, Italy. - 2003. - P. 971-973.
89. Kato K, Yokoyama H. Geographical variation in heading characters among wheat landraces, *Triticum aestivum* L., and its implication for their adaptability. // *Theor Appl Genet.* - 1992. - V. 84. - № 4. - P. 259-265.
90. Khatodia S, Bhatotia K, Passricha N, Khurana SM, Tuteja N. The CRISPR/Cas Genome-Editing Tool: Application in Improvement of Crops. // *Front Plant Sci.* - 2016. - P. 506.
91. Kilian B, Özkan H, Pozzi C, Salamini F. Domestication of the *Triticeae* in the Fertile Crescent. In: Muehlbauer GJ (ed). *Genetics and genomics of the Triticeae.* Springer, New York. - 2009. - P. 81-119.
92. Kim JL, Nikolov DB, Burley SK. Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. // *Nature.* - 1993. - V. 365. - № 46. - P. 520-527.
93. Kinjo H, Shitsukawa N, Takumi S, Murai K. Diversification of three *APETALA1/FRUITFULL-like* genes in wheat. // *Mol Genet Genomics.* - 2012. - V. 287. - № 4. - P. 283-294.
94. Kippes N, Chen A, Zhang X, Lukaszewski AJ, Dubcovsky J. Development and characterization of a spring hexaploid wheat line with no functional *VRN2* genes. // *Theor Appl Genet.* - 2016. - V. 129. - № 7. - P. 1417-1428.
95. Kippes N, Debernardi JM, Vasquez-Gross HA, Akpınar BA, Budak H, Kato K, Chao S, Akhunov E, Dubcovsky J. Identification of the *VERNALIZATION 4* gene reveals the origin of spring growth habit in ancient wheats from South Asia. // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 2015. - V. 112. - № 39. - E5401-E5410.

96. Kippes N, Zhu J, Chen A, Vanzetti L, Lukaszewski A, Nishida H, Kato K, Dvorak J, Dubcovsky J. Fine mapping and epistatic interactions of the vernalization gene *VRN-D4* in hexaploid wheat. // *Mol Genet Genomics*. - 2014. - V. 289. - № 1. - P. 47-62.
97. Koebner R, Summers R. The impact of molecular markers on the wheat breeding paradigm. // *Cell Mol Biol Lett*. - 2002. - V. 7. - № 2B. - P. 695-702.
98. Konvalina P, Stehno Z, Capouchova I, Moudry J. Wheat Growing and Quality in Organic Farming. In: Nokkoul R (ed) RESEARCH IN ORGANIC FARMING. 1 edition. Intech, Rijeka, Croatia. - 2012. - P. 105-122.
99. Koo HS, Crothers DM. Calibration of DNA curvature and a unified description of sequence-directed bending. // *Proc Natl Acad Sci USA*. - 1988. - V. 85. - P. 1763-1767.
100. Koo HS, Wu HM, Crothers DM. DNA bending at adenine-thymine tracts. // *Nature*. - 1986. - V. 320. - № 62. - P. 501-506.
101. Koyama K, Hatano H, Nakamura J, Takumi S. Characterization of three *VERNALIZATION INSENSITIVE3-like* (*VIL*) homologs in wild wheat, *Aegilops tauschii* Coss. // *Hereditas*. - 2012. - V. 149. - № 2. - P. 62-71.
102. Krekule J. Varietal differences in replacing vernalization by a short day in winter wheat. // *Biol Plant*. - 1964. - V. 6. - P. 299-305.
103. Lavery R, Moakher M, Maddocks JH, Petkeviciute D, Zakrzewska K. Conformational analysis of nucleic acids revisited: curves+. // *Nucleic Acids Res*. - 2009. - V. 37. - № 17. - P. 5917-5929.
104. Law CN, Worland AJ. Genetic analysis of some flowering time and adaptive traits in wheat. // *New Phytol*. - 1997. - V. 137. - P. 19-28.
105. Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. // *Nucleic Acids Res*. - 2002. - V. 30. - № 1. - P. 325-327.
106. Li C, Distelfeld A, Comis A, Dubcovsky J. Wheat flowering repressor *VRN2* and promoter *CO2* compete for interactions with *NUCLEAR FACTOR-Y* complexes. // *Plant J*. - 2011. - V. 67. - № 5. - P. 763-773.
107. Li C, Dubcovsky J. Wheat FT protein regulates *VRN1* transcription through interactions with FDL2. // *Plant J*. - 2008. - V. 55. - № 4. - P. 543-554.

108. Li G, Yu M, Fang T, Cao S, Carver BF, Yan L. Vernalization requirement duration in winter wheat is controlled by *TaVRN-A1* at the protein level. // *Plant J.* - 2013. - V. 76. - № 5. - P. 742-753.
109. Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q, Liu J, Zhang H, Liu C, Ran Y, Gao C. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. // *Nat Commun.* - 2017. - V. 8. - 14261.
110. Liu J, He YH, Amasino R, Chen XM. siRNAs targeting an intronic transposon in the regulation of natural flowering behavior in *Arabidopsis*. // *Genes Dev.* - 2004. - V. 18. - P. 2873-2878.
111. Liu J, Huang S, Sun M, Liu S, Liu Y, Wang W, Zhang X, Wang H, Hua W. An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. // *Plant Methods.* - 2012. - V. 8. - № 1. - P. 34.
112. Loukoianov A, Yan L, Blechl A, Sanchez A, Dubcovsky J. Regulation of *VRN-1* vernalization genes in normal and transgenic polyploid wheat. // *Plant Physiol.* - 2005. - V. 138. - № 4. - P. 2364-2373.
113. Lupas A, Van Dyke M, Stock J. Predicting coiled coils from protein sequences. // *Science.* - 1991. - V. 252. - № 09. - P. 1162-1164.
114. Ma LJ, Wang X, Wei L, Feng YL, Ren JP, Yin J. Sequences analysis of the vernalization gene *VRN2* in different development characteristic common wheat (*Triticum aestivum* L.). // *J Triticeae Crops.* - 2012. - V. 32. - № 4. - P. 603-609.
115. Mammadov J, Aggarwal R, Buyyarapu R, Kumpatla S. SNP Markers and Their Impact on Plant Breeding. // *Int J Plant Genom.* - 2012. - V. 2012. - 728398.
116. Marini JC, Levene SD, Crothers DM, Englund PT. Bent helical structure in kinetoplast DNA. // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 1982. - V. 79. - № 24. - P. 7664-7668.
117. Matsuoka Y. Evolution of polyploid *Triticum* wheats under cultivation: the role of domestication, natural hybridization and allopolyploid speciation in their diversification. // *Plant Cell Physiol.* - 2011. - V. 52. - № 5. - P. 750-764.
118. McKinney HH, Sando WJ. Earliness of sexual reproduction in wheat as influenced by temperature and light in relation to growth phases. // *J Agric Res.* - 1935. - V. 51. - № 7. - P. 621-641.

119. Milec Z, Sumikova T, Tomkova L, Pankova K. Distribution of different *Vrn-B1* alleles in hexaploid spring wheat germplasm. // *Euphytica*. - 2013. - V. 192. - № 3. - P. 371-378.
120. Milec Z, Tomkova L, Sumikova T, Pankova K. A new multiplex PCR test for the determination of *Vrn-B1* alleles in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). // *Mol Breed*. - 2012. - V. 30. - № 1. - P. 317-323.
121. Mizuno T, Nakamichi N. Pseudo-response regulators (PRRs) or true oscillator components (TOCs). // *Plant Cell Physiol*. - 2005. - V. 46. - № 5. - P. 677-685.
122. Mohan M, Nair S, Bhagwat A, Krishna TG, Yano M, Bhatia CR, Sasaki T. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. // *Mol Breed*. - 1997. - V. 3. - № 2. - P. 87-103.
123. Muiño JM, Smaczniak C, Angenent GC, Kaufmann K, van Dijk AD. Structural determinants of DNA recognition by plant MADS-domain transcription factors. // *Nucleic Acids Res*. - 2014. - V. 42. - № 4. - P. 2138-2146.
124. Murai K, Miyamae M, Kato H, Takumi S, Ogihara Y. *WAP1*, a wheat *APETALA1* homolog, plays a central role in the phase transition from vegetative to reproductive growth. // *Plant Cell Physiol*. - 2003. - V. 44. - № 12. - P. 1255-1265.
125. Muterko AF, Balashova IA, Fayt VI, Sivolap YuM. Molecular genetic mechanisms of regulation of growth habit in wheat. // *Cytol Genet*. - 2015a. - V. 49. - № 1. - P. 58-71.
126. 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*. - 2015b. - V. 33. - № 2. - P. 294-303.
127. Muterko A, Kalendar R, Cockram J, Balashova I. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes and new alleles of the *Photoperiod-A1* gene in wheat. // *Plant Mol Biol*. - 2015c. - V. 88. - № 2. - P. 149-164.
128. Muterko A, Kalendar R, Salina E. Novel alleles of the *VERNALIZATION 1* genes in wheat are associated with modulation of DNA curvature and flexibility in the promoter region. // *BMC Plant Biol*. - 2016a. - V. 16. - Suppl 1. - 9.
129. 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*. - 2016b. - V. 244. - № 6. - P. 1253-1263.

130. Nakamichi N, Kita M, Niinuma K, Ito S, Yamashino T, Mizoguchi T, Mizuno T. Arabidopsis clock-associated pseudoresponse regulators PRR9, PRR7 and PRR5 coordinately and positively regulate flowering time through the canonical CONSTANS-dependent photoperiodic pathway. // *Plant Cell Physiol.* - 2007. - V. 48. - № 6. - P. 822-832.
131. Nikolov DB, Chen H, Halay ED, Hoffman A, Roeder RG, Burley SK. Crystal structure of a human TATA box-binding protein/TATA element complex. // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 1996. - V. 93. - № 10. - P. 4862-4867.
132. Nishida H, Yoshida T, Kawakami K, Fujita M, Long B, Akashi Y, Laurie DA, Kato K. Structural variation in the 5' upstream region of photoperiod-insensitive alleles *Ppd-A1a* and *Ppd-B1a* identified in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.), and their effect on heading time. // *Mol Breed.* - 2013. - V. 31. - № 1. - P. 27-37.
133. O'Brien L, Morell M, Wrigley C, Appels R. The World Wheat Book. In: Bonjean AP, Angus WJ (eds). *A History of Wheat Breeding*. Lavoisier. - 2001. - P. 611-648.
134. Oliver S, Finnegan E, Dennis E, Peacock W, Trevaskis B. Vernalization-induced flowering in cereals is associated with changes in histone methylation at the *VERNALIZATION 1* gene. // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 2009. - V. 106. - № 20. - P. 8386-8391.
135. Olson WK, Gorin AA, Lu XJ, Hock LM, Zhurkin VB. DNA sequence-dependent deformability deduced from protein-DNA crystal complexes. // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 1998. - V. 95. - № 19. - P. 11163-11168.
136. Olsson AS, Engström P, Söderman E. The homeobox genes *ATHB12* and *ATHB7* encode potential regulators of growth in response to water deficit in *Arabidopsis*. // *Plant Mol Biol.* - 2004. - V. 55. - № 5. - P. 663-677.
137. Packer MJ, Dauncey MP, Hunter CA. Sequence-dependent DNA structure: tetranucleotide conformational maps. // *J Mol Biol.* - 2000. - V. 295. - № 1. - P. 85-103.
138. Parizotto EA, Dunoyer P, Rahm N, Himber C, Voinnet O. In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. // *Genes Dev.* - 2004. - V. 18. - № 18. - P. 2237-2242.

139. Patikoglou GA, Kim JL, Sun L, Yang SH, Kodadek T, Burley SK. TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution. // *Genes Dev.* - 1999. - V. 13. - № 24. - P. 3217-3230.
140. Pidal B, Yan L, Fu D, Zhang F, Tranquilli G, Dubcovsky J. The CArG-Box located upstream from the transcriptional start of wheat vernalization gene *VRN1* is not necessary for the vernalization response. // *J Hered.* - 2009. - V. 100. - № 3. - P. 355-364.
141. Pien S, Fleury D, Mylne JS, Crevillen P, Inzé D, Avramova Z, Dean C, Grossniklaus U. ARABIDOPSIS TRITHORAX1 dynamically regulates *FLOWERING LOCUS C* activation via histone 3 lysine 4 trimethylation. // *Plant Cell.* - 2008. - V. 20. - № 3. - P. 580-588.
142. Polzin T, Daneschmand SV. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. // *Oper Res Lett.* - 2003. - V. 31. - № 1. - P. 12-20.
143. Puchta H. The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. // *J Exp Bot.* - 2005. - V. 56. - № 09. - P. 1-14.
144. Pugsley AT. Additional genes inhibiting winter habit in wheat. // *Euphytica.* - 1972. - V. 21. - № 3. - P. 547-552.
145. Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. // *Cell.* - 1995. - V. 80. - № 6. - P. 847-857.
146. Rana B, Rana P, Manoj KJ, Kumar S. Marker assisted selection: A strategy for wheat improvement. // *Wheat Inform Serv eWIS.* - 2009. - V. 11. - P. 19-30.
147. Randhawa HS, Asif M, Pozniak C, Clarke JM, Graf RJ, Fox SL, Humphreys DG, Knox RE, DePauw RM, Singh AK, Cuthbert RD, Hucl P, Spaner D. Application of molecular markers to wheat breeding in Canada. // *Plant Breed.* - 2013. - V. 132. - № 5. - P. 458-471.
148. Raveh-Sadka T, Levo M, Shabi U, Shany B, Keren L, Lotan-Pompan M, Zeevi D, Sharon E, Weinberger A, Segal E. Manipulating nucleosome disfavoring sequences allows fine-tune regulation of gene expression in yeast. // *Nat Gen.* - 2012. - V. 44. - № 7. - P. 743-750.

149. Ré DA, Capella M, Bonaventure G, Chan RL. Arabidopsis *AtHB7* and *AtHB12* evolved divergently to fine tune processes associated with growth and responses to water stress. // *BMC Plant Biol.* - 2014. - V. 14. -150.
150. Reuter JS, Mathews DH. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. // *BMC Bioinformatics.* - 2010. - V. 11. -129.
151. Robson F, Costa MM, Hepworth SR, Vizir I, Piñeiro M, Reeves PH, Putterill J, Coupland G. Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. // *Plant J.* - 2001. - V. 28. - № 6. - P. 619-631.
152. Santelli E, Richmond TJ. Crystal structure of MEF2A core bound to DNA at 1.5 Å resolution. // *J Mol Biol.* - 2000. - V. 297. - № 2. - P. 437-449.
153. Santra DK, Santra M, Allan RE, Campbell KG, Kidwell KK. Genetic and molecular characterization of vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, and *Vrn-D1* in spring wheat germplasm from the pacific northwest region of the USA. // *Plant Breed.* - 2009. - V. 128. - P. 576-584.
154. Sasani S, Hemming MN, Oliver SN, Greenup A, Tavakkol-Afshari R, Mahfoozi S, Poustini K, Sharifi HR, Dennis ES, Peacock WJ, Trevaskis B. The influence of vernalization and daylength on expression of flowering-time genes in the shoot apex and leaves of barley (*Hordeum vulgare*). // *J Exp Bot.* - 2009. - V. 60. - № 7. - P. 2169-2178.
155. Scarth R, Law CN. The control of day-length response in wheat by the group 2 chromosomes. // *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung.* - 1984. - V. 92. - № 2. - P. 140-150.
156. Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. // *Cell.* - 2007. - V. 128. - № 4. - P. 735-745.
157. Seki M, Chono M, Matsunaka H, Fujita M, Oda S, Kubo K, Kiribuchi-Otobe C, Kojima H, Nishida H, Kato K. Distribution of photoperiod-insensitive alleles *Ppd-B1a* and *Ppd-D1a* and their effect on heading time in Japanese wheat cultivars. // *Breed Sci.* - 2011. - V. 61. - № 4. - P. 405-412.
158. Shan Q, Wang Y, Li J, Gao C. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. // *Nat Protoc.* - 2014. - V. 9. - № 10. - P. 2395-410.

159. Shaw LM, Turner AS, Laurie DA. The impact of photoperiod insensitive *Ppd-1a* mutations on the photoperiod pathway across the three genomes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). // Plant J. - 2012. - V. 71. - № 1. - P. 71-84.
160. Shcherban AB, Efremova TT, Salina EA. Identification of a new *Vrn-B1* allele using two near-isogenic wheat lines with difference in heading time. // Mol Breed. - 2012. - V. 29. - № 3. - P. 675-685.
161. Shcherban AB, Emtseva MV, Efremova TT. Molecular genetical characterization of vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1* in spring wheat germplasm from Russia and adjacent regions. // Cereal Res Communications. - 2012. - V. 40. - № 3. - P. 425-435.
162. Shcherban AB, Strygina KV, Salina EA. *VRN-1* gene - associated prerequisites of spring growth habit in wild tetraploid wheat *T. dicoccoides* and the diploid A genome species. // BMC Plant Biol. - 2015. - V. 15. - 94.
163. Sherman JD, Yan L, Talbert L, Dubcovsky J. A PCR marker for growth habit in common wheat based on allelic variation at the *VRN-A1* gene. // Crop Sc. - 2004. - V. 44. - № 5. - P. 1832–1838.
164. Shitsukawa N, Ikari C, Shimada S, Kitagawa S, Sakamoto K, Saito H, Ryuto H, Fukunishi N, Abe T, Takumi S, Nasuda S, Murai K. The einkorn wheat (*Triticum monococcum*) mutant, maintained vegetative phase, is caused by a deletion in the *VRN1* gene. // Genes Genet Syst. - 2007. - V. 82. - № 2. - P. 167-170.
165. Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ, Hurley LH. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. // Proc Natl Acad Sci USA. - 2002. - V. 99. - № 18. - P. 11593-11598.
166. Snape JW, Butterworth K, Whitechurch E, Worland AJ. Waiting for fine times: Genetics of flowering time in wheat. // Euphytica. - 2001. - V. 119. - P. 185-190.
167. Solovyev VV, Shahmuradov IA. PromH: Promoters identification using orthologous genomic sequences. // Nucleic Acids Res. - 2003. - V. 31. - № 13. - P. 3540-3545.
168. Solovyev VV, Shahmuradov IA, Salamov AA. Identification of promoter regions and regulatory sites. // Methods Mol Biol. - 2010. - V. 674. - P. 57-83.

169. Stellwagen NC. Anomalous electrophoresis of deoxyribonucleic acid restriction fragments on polyacrylamide gels. // *Biochemistry*. - 1983. - V. 22. - № 26. - P. 6186-6193.
170. Stelmakh AF. Growth habit in common wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). // *Euphytica*. - 1987. - V. 36. - № 2. - P. 513-519.
171. Stelmakh AF. Genetic effects of *Vrn* genes on heading date and agronomic traits in bread wheat. // *Euphytica*. - 1993. - V. 65. - P. 53-60.
172. Stelmakh AF, Avsenin VI. Alien introgression of spring habit dominant genes into bread wheat. // *Euphytica*. - 1996. - V. 89. - № 1. - P. 65–68.
173. Streitner C, Danisman S, Wehrle F, Schöning JC, Alfano JR, Staiger D. The small glycine-rich RNA binding protein AtGRP7 promotes floral transition in *Arabidopsis thaliana*. // *Plant*. - 2008. - V. 56. - № 2. - P. 239-250.
174. Suárez-López P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F, Coupland G. CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. // *Nature*. - 2001. - V. 410. - № 32. - P. 1116-1120.
175. Sung S, Amasino RM. Molecular genetic studies of the memory of winter. // *J Exp Bot*. - 2006. - V. 57. - № 13. - P. 3369-3377.
176. Szucs P, Skinner JS, Karsai I, Cuesta-Marcos A, Haggard KG, Corey AE, Chen TH, Hayes PM. Validation of the *VRN-H2/VRN-H1* epistatic model in barley reveals that intron length variation in *VRN-H1* may account for a continuum of vernalization sensitivity. // *Mol Genet Genomics*. - 2007. - V. 277. - № 3. - P. 249-261.
177. Tadege M, Sheldon CC, Helliwell CA, Upadhyaya NM, Denis ES, Peacock WJ. Reciprocal control of flowering time by *OsSOC1* in transgenic *Arabidopsis* and by *FLC* in transgenic rice. // *Plant Biotechnol J*. - 2003. - V. 1. - № 5. - P. 361-369.
178. Takenaka S, Kawahara T. Evolution and dispersal of emmer wheat (*Triticum* sp.) from novel haplotypes of *Ppd-1* (photoperiod response) genes and their surrounding DNA sequences. // *Theor Appl Genet*. - 2012. - V. 125. - № 5. - P. 999-1014.
179. Takenaka S, Kawahara T. Evolution of tetraploid wheat based on variations in 5' UTR regions of *Ppd-A1*: evidence of gene flow between emmer and timopheevi wheat. // *Genet Resour Crop Evol*. - 2013. - V. 60. - № 7. - P. 2143-2155.
180. Takumi S, Koyama K, Fujiwara K, Kobayashi F. Identification of a large deletion in the first intron of the *Vrn-D1* locus, associated with loss of vernalization requirement

- in wild wheat progenitor *Aegilops tauschii* Coss. // *Genes Genet Syst.* - 2011. - V. 86. - № 3. - P. 183-195.
181. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. // *Nucleic Acids Res.* - 1994. - P. 4673-4680.
182. Tranquilli G, Dubcovsky J. Epistatic interaction between vernalization genes *Vrn-Am1* and *Vrn-Am2* in diploid wheat. // *J Hered.* - 2000. - V. 91. - № 4. - P. 304-306.
183. Travers AA. DNA-Protein: Structural interactions. Oxford: IRL Press. - 1995. - P. 49-75.
184. Treisman R. The serum response element. // *Trends Biochem Sci.* - 1992. - V. 17. - № 10. - P. 423-426.
185. Trevaskis B, Bagnall DJ, Ellis MH, Peacock WJ, Dennis ES. MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals. // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 2003. - V. 100. - № 22. - P. 13099-13104.
186. Trevaskis B, Hemming MN, Dennis ES, Peacock WJ. The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. // *Trends Plant Sci.* - 2007. - V. 12. - № 8. - P. 352-357.
187. Trevaskis B, Hemming MN, Peacock WJ, Dennis ES. *HvVRN2* responds to daylength, whereas *HvVRN1* is regulated by vernalization and developmental status. // *Plant Physiol.* - 2006. - V. 140. - № 4. - P. 1397-1405.
188. Trevaskis B, Tadege M, Hemming MN, Peacock WJ, Dennis ES, Sheldon C. Short vegetative phase-like MADS-box genes inhibit floral meristem identity in barley. // *Plant Physiol.* - 2007. - V. 143. - № 1. - P. 225-235.
189. Turck F, Fornara F, Coupland G. Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. // *Annu Rev Plant Biol.* - 2008. - V. 59. - P. 573-594.
190. Turner A, Beales J, Faure S, Dunford RP, Laurie DA. The pseudo-response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley. // *Science.* - 2005. - V. 310. - № 50. - P. 1031-1034.
191. Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G. Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. // *Science.* - 2004. - V. 303. - № 60. - P. 1003-1006.

192. Verma A, Halder K, Halder R, Yadav VK, Rawal P, Thakur RK, Mohd F, Sharma A, Chowdhury S. Genome-wide computational and expression analyses reveal G-quadruplex DNA motifs as conserved cis-regulatory elements in human and related species. // *J Med Chem.* - 2008. - V. 51. - № 18. - P. 5641-5649.
193. von Zitzewitz J, Szucs P, Dubcovsky J, Yan L, Francia E, Pecchioni N, Casas A, Chen TH, Hayes PM, Skinner JS. Molecular and structural characterization of barley vernalization genes. // *Plant Mol Biol.* - 2005. - V. 59. - № 3. - P. 449-467.
194. Wang S, Carver B, Yan L. Genetic loci in the photoperiod pathway interactively modulate reproductive development of winter wheat. // *Theor Appl Genet.* - 2009. - V. 118. - № 7. - P. 1339-1349.
195. Wenkel S, Turck F, Singer K, Gissot L, Le Gourrierec J, Samach A, Coupland G. CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. // *Plant Cell.* - 2006. - V. 18. - № 11. - P. 2971-2984.
196. Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohmann JU, Weigel D. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. // *Science.* - 2005. - V. 309. - № 37. - P. 1056-1059.
197. Wilhelm EP, Turner AS, Laurie DA. Photoperiod insensitive *Ppd-A1a* mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.). // *Theor Appl Genet.* - 2009. - V. 118. - № 2. - P. 285-294.
198. Worland AJ. The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European wheats. // *Euphytica.* - 1996. - V. 89. - P.49-57.
199. Worland AJ, Börner A, Korzun V, Li WM, Petrovic S, Sayers EJ. The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats. // *Euphytica.* - 1998. - V. 100. - № 3. - P. 385-394.
200. Würschum T, Boeven PH, Langer SM, Longin CF, Leiser WL. Multiply to conquer: Copy number variations at *Ppd-B1* and *Vrn-A1* facilitate global adaptation in wheat. // *BMC Genet.* - 2015. - V. 29. - P. 16-96.
201. Xiao J, Xu S, Li C, Xu Y, Xing L, Niu Y, Huan Q, Tang Y, Zhao C, Wagner D, Gao C, Chong K. O-GlcNAc-mediated interaction between VER2 and TaGRP2 elicits *TaVRN1* mRNA accumulation during vernalization in winter wheat. // *Nat Commu.* - 2014. - V. 5. - 4572.

202. Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC. Expression of *Arabidopsis* *MIRNA* genes. // *Plant Physiol.* - 2005. - V. 138. - № 4. - P. 2145-2154.
203. Yamamoto YY, Ichida H, Abe T, Suzuki Y, Sugano S, Obokata J. Differentiation of core promoter architecture between plants and mammals revealed by LDSS analysis. // *Nucleic Acids Res.* - 2007. - V. 35. - № 18. - P. 6219-6226.
204. Yan L, Fu D, Li C, Blechl A, Tranquilli G, Bonafede M. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 2006. - V. 103. - № 51. - P. 19581-19586.
205. Yan L, Helguera M, Kato K, Fukuyama S, Sherman J, Dubcovsky J. Allelic variation at the *VRN1* promoter region in polyploid wheat. // *Theor Appl Genet.* - 2004. - V. 109. - № 8. - P. 1677-1686.
206. Yan L, Li G, Yu M, Fang T, Cao S, Carver BF. Genetic mechanisms of vernalization requirement duration in winter wheat cultivars. In: Ogihara Y et al. (eds). *Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field.* - 2015. - V. 13. - P. 117-125.
207. Yan L, Loukoianov A, Blechl A, Tranquilli G, Ramakrishna W, SanMiguel P, Bennetzen J, Echenique V, Dubcovsky J. The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. // *Science.* - 2004. - V. 303. - № 64. - P. 1640-1644.
208. Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 2003. - V. 100. - № 10. - P. 6263-6268.
209. Yang Y, Jack T. Defining subdomains of the K domain important for protein-protein interactions of plant MADS proteins. // *Plant Mol Biol.* - 2004. - V. 55. - P. 45-59.
210. Yao Y, Guo G, Ni Z, Sunkar R, Du J, Zhu JK, Sun Q. Cloning and characterization of microRNAs from wheat (*Triticum aestivum* L.). // *Genome Biol.* - 2007. - V. 8. - № 6. - R96.
211. Yonetani Y, Kono H. Sequence dependencies of DNA deformability and hydration in the minor groove. // *Biophys J.* - 2009. - V. 97. - № 4. - P. 1138-1147.
212. Yoshida T, Nishida H, Zhu J, Nitcher R, Distelfeld A, Akashi Y, Kato K, Dubcovsky J. *Vrn-D4* is a vernalization gene located on the centromeric region of chromosome 5D in hexaploid wheat. // *Theor Appl Genet.* - 2010. - V. 120. - № 3. - P. 543-552.

213. Yu M, Carver BF, Yan L. *TamiR1123* originated from a family of miniature inverted-repeat transposable elements (MITE) including one inserted in the *Vrn-A1a* promoter in wheat. // *Plant Sci.* - 2014. - V. 215-216. - P. 117-123.
214. Zamir D. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. // *Nat Rev Genet.* - 2001. - V. 2. - № 12. - P. 983-989.
215. Zhang J, Wang Y, Wu S, Yang J, Liu H, Zhou Y. A single nucleotide polymorphism at the *Vrn-D1* promoter region in common wheat is associated with vernalization response. // *Theor Appl Genet.* - 2012. - V. 125. - № 8. - P. 1697-1704.
216. Zhang X, Gao M, Wang S, Chen F, Cui D. Allelic variation at the vernalization and photoperiod sensitivity loci in Chinese winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). // *FrontPlant Sci.* - 2015. - V. 6. - 470.
217. Zhang XK, Xiao YG, Zhang Y, Xia XC, Dubcovsky J, He ZH. Allelic variation at the vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, and *Vrn-B3* in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit. // *Crop Sci.* - 2008. - V. 48. - № 2. - P. 458-470.
218. Zhang Y, Liang Z, Zong Y, Wang Y, Liu J, Chen K, Qiu JL, Gao C. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. // *Nat Commun.* - 2016. - V. 7. - 12617.
219. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. // *J Comput Biol.* - 2000. - V. 7. - № 1-2. - P. 203-214.
220. Zhu X, Tan C, Cao S, Yan L. Molecular differentiation of null alleles at *ZCCT-1* genes on the A, B, and D genomes of hexaploid wheat. // *Mol Breed.* - 2011. - V. 27. - № 4. - P. 501-510.

Приложение 1. Параметры праймеров используемых для проведения ПЦР-анализа генов *VRN* и *PPD1* пшеницы

Праймер	Последовательность праймера (5'-3')	Разработчик праймера	Температура отжига (°C)	Амплифицируемый участок	Аллель или Гаплотип	Размер ПЦР фрагмента (п.н.)
VRN1AF	gaaaggaaaaattctgctcg	Yan et al. (2004a)	58	<i>VRN-A1</i> промотор	<i>vrn-A1</i>	713
VRN1-INT1R	gcaggaaatcgaaatcgaa g				<i>Vrn-A1a.1</i>	944
					<i>Vrn-A1a.2</i>	924, 944
					<i>Vrn-A1a.3</i>	765
					<i>Vrn-A1b1-b6</i>	691
					<i>Vrn-A1d</i>	685
					<i>Vrn-A1e</i>	659
					<i>Vrn-A1f</i>	658
					<i>Vrn-A1i</i>	713
					<i>Vrn-A1j</i>	659, 713
					<i>Vrn-A1k</i>	755
<i>vrn-A^m1</i>	705					
<i>Vrn-A^m1g</i>	681					
<i>Vrn-A^m1a</i>	671					
<i>vrn-A^m1b</i>	656					
Vrn-A1-intr_F	ccgtcgaaaggatcgctact g	Muterko et al. (2016)	60	<i>VRN-A1</i> интрон-1	<i>vrn-A1</i>	541
Vrn-A1-intr_R1	ctgtccccgtgagctacttac					
Ex1/C/F	gttctccaccgagtcattggt	Fu et al. (2005)	56	<i>VRN-A1</i> интрон-1	<i>Vrn-A1c</i> (Langdon)	522
Intr1/A/R3	aagtaagacaacacgaatgt gaga				<i>Vrn-A1c</i> (IL369)	2188
Ex4F2m3	ttgttccttctgtcccaacc	Eagles et al. (2011) (модификация)	60	<i>VRN-A1/VRN-D4</i> экзон-3-4	Ex4(C/T)	389
Ex4R	ctttgctgaacttctctgc				Ex4C.f	387
Ex4FA	ttcacctctagcctaccccaac	Мутерко и др, 2017	58	<i>VRN-A1/VRN-D4</i> экзон-3-4	Ex4(C/T)	523
Ex4R	ctttgctgaacttctctgc				Ex4C.f	521
Ex4F2m3	ttgttccttctgtcccaacc	Мутерко	59	<i>VRN-D4</i>	<i>VRN-D4</i>	265

Праймер	Последовательность праймера (5'-3')	Разработчик праймера	Температура отжига (°C)	Амплифицируемый участок	Аллель или Гаплотип	Размер ПЦР фрагмента (п.н.)
V4/R2m3	ccagttgctgcaactccagg	и др, 2017		экзон-3-4		
Ex4outV4F2m3	cctgtcccaccsaagttacta	Мутерко и др, 2017	57	<i>VRN-A1</i> экзон-3-4	Ex4(C/T)	380
Ex4R	ctttgctgaacttctctgc				Ex4C.f	378
Ex4F2m3	ttgttccttctgtcccaacc	Мутерко и др, 2017	58	<i>VRN-A1/VRN-D4</i> экзон-3-5	Ex4C.sph	592
Ex4AR245m3	gaccagttcgaataccgaagaa				Ex4C.f	588
					Ex4C.m/ Ex4T Ex4C.s	591 590
Ex4outV4F2m3	cctgtcccaccsaagttacta	Мутерко и др, 2017	57	<i>VRN-A1</i> экзон-3-5	Ex4C.sph	583
Ex4AR245m3	gaccagttcgaataccgaagaa				Ex4C.f	579
					Ex4C.m/ Ex4T Ex4C.s	582 581
Pr1	taccctgctaccagtgcct	Shcherban et al. 2012	58	<i>VRN-B1</i> промотор	<i>VRN-B1.f</i>	968
Pr2	ggccaaccctacaccccaagg				<i>VRN-B1.s</i>	958
					<i>VRN-B1.m</i>	965
Ex1/C/F	gttctccaccgagtcatggt	Fu et al. 2005	58	<i>VRN-B1</i> интрон-1	<i>Vrn-B1a</i>	1091
Intr1/B/R3	ctcatgccaaaaattgaagatga				<i>Vrn-B1b</i>	1055
					<i>Vrn-B1c</i>	705
Ex1/C/F	gttctccaccgagtcatggt	Fu et al. (2005)	60	<i>VRN-B1</i> интрон-1	<i>vrn-B1</i>	1531
Intr1/B/R4	caaatgaaaaggaatgagagca					
VRN1DF	cgacccgggaggcagcagtg	Yan et al. 2004a	61	<i>VRN-D1</i> промотор	<i>VRN-D1</i> (Hap-7T/Hap-8T)	1012 - 1020
VRN1-INT1R	gcaggaaatcgaaatcgaaag		61			
Intr1/D/F	gttgctgcctcatcaaatcc	Fu et al. 2005	64	<i>VRN-D1</i> интрон-1	<i>vrn-D1</i>	997
Intr1/D/R4	aaatgaaaaggaacgagagcg		64		<i>Vrn-D1s</i>	1841

Праймер	Последовательность праймера (5'-3')	Разработчик праймера	Температура отжига (°C)	Аmplифицируемый участок	Аллель или Гаплотип	Размер ПЦР фрагмента (п.н.)																																																																													
Intr1/D/F	gttgtctgcctcatcaaatcc	Fu et al. 2005	64	<i>VRN-D1</i> интрон-1	<i>Vrn-D1a</i>	1671																																																																													
Intr1/D/R3	ggctactgggtgtctgtgc		64				FT-B-INS-F	cataatgccaagccgggtgag tac	Yan et al. 2006	61	<i>VRN-B3</i> промотор	<i>Vrn-B3a</i>	1765	VRN4-B-NOINS-R	ctatccctaccggccattag	VRN4-B-NOINS-F2	gctgtgtgatcttctctcc	Yan et al. 2006	61	<i>VRN-B3</i> промотор	<i>vrn-B3</i>	691	VRN4-B-NOINS-R	ctatccctaccggccattag	V2ABD-F1	gaaagaaatcaacgatggat c	Zhu et al. 2011	60	<i>ZCCT1</i> промотор	<i>ZCCT-B1</i>	294	V2ABD-R2	actgctagctagctccaagg	<i>ZCCT-A1</i>	302			<i>ZCCT-D1</i>	320	durum_Ag5del_F2	cgtcacccatgcactctgtt	Wilhelm et al. 2009	56	<i>PPD-A1</i> промотор	<i>Ppd-A1b</i>	452	durum_Ag5del_R2	ctggctccaagaggaaacac	<i>Ppd-A^m1b</i>	456	Ppd-A1proF	gtgtgcacggattttgctc	Muterko et al. 2015 Wilhelm et al. 2009	56	<i>PPD-A1</i> промотор	<i>Ppd-A1a.1</i>	405	durum_Ag5del_R2	ctggctccaagaggaaacac	<i>Ppd-A1a.2</i>	463			<i>Ppd-A1a.3</i>	372			<i>Ppd-A1a.4</i>	806	TaPpd-B1proF1	aactagggctggcgaaga	Seki et al. 2011	64	<i>PPD-B1</i> промотор			TaPpd-B1int1R1	ccgagccagtgcaaattaac	TaPpd-B1proinF1	cagctcctccgtttgcttcc	Takenaka et al. 2012	64	<i>PPD-B1</i> промотор
FT-B-INS-F	cataatgccaagccgggtgag tac	Yan et al. 2006	61	<i>VRN-B3</i> промотор	<i>Vrn-B3a</i>	1765																																																																													
VRN4-B-NOINS-R	ctatccctaccggccattag																																																																																		
VRN4-B-NOINS-F2	gctgtgtgatcttctctcc	Yan et al. 2006	61	<i>VRN-B3</i> промотор	<i>vrn-B3</i>	691																																																																													
VRN4-B-NOINS-R	ctatccctaccggccattag																																																																																		
V2ABD-F1	gaaagaaatcaacgatggat c	Zhu et al. 2011	60	<i>ZCCT1</i> промотор	<i>ZCCT-B1</i>	294																																																																													
V2ABD-R2	actgctagctagctccaagg				<i>ZCCT-A1</i>	302																																																																													
					<i>ZCCT-D1</i>	320																																																																													
durum_Ag5del_F2	cgtcacccatgcactctgtt	Wilhelm et al. 2009	56	<i>PPD-A1</i> промотор	<i>Ppd-A1b</i>	452																																																																													
durum_Ag5del_R2	ctggctccaagaggaaacac				<i>Ppd-A^m1b</i>	456																																																																													
Ppd-A1proF	gtgtgcacggattttgctc	Muterko et al. 2015 Wilhelm et al. 2009	56	<i>PPD-A1</i> промотор	<i>Ppd-A1a.1</i>	405																																																																													
durum_Ag5del_R2	ctggctccaagaggaaacac				<i>Ppd-A1a.2</i>	463																																																																													
					<i>Ppd-A1a.3</i>	372																																																																													
					<i>Ppd-A1a.4</i>	806																																																																													
TaPpd-B1proF1	aactagggctggcgaaga	Seki et al. 2011	64	<i>PPD-B1</i> промотор																																																																															
TaPpd-B1int1R1	ccgagccagtgcaaattaac																																																																																		
TaPpd-B1proinF1	cagctcctccgtttgcttcc	Takenaka et al. 2012	64	<i>PPD-B1</i> промотор																																																																															
206bp_del_25_R1	cctgactccaagaggaaacatg																																																																																		

Приложение 2. Влияние условий проведения электрофореза в полиакриламидных гелях, на эффективность дискриминации идентифицированных в настоящем исследовании аллелей генов *VRN-A1* и *VRN-B1*

Методы

Продукты амплификации сепарированы в 5 – 10 % неденатурирующих полиакриламидных гелях с соотношением моно/бис-акриламид 29:1 – 82:1 в $\times 0.5 - \times 1.38$ ТБЭ буфере (ионная сила 45 – 123 мМ) при температуре от 10 до 40 °С, с добавлением и без добавления 15 мМ ионов Mg^{2+} при напряженности электрического поля 2.5 – 10 В/см, в течении времени за которое целевые фрагменты мигрировали 50 – 70 % длины геля.

Результаты

Известно, что низкая температура, ионная сила, высокие концентрации акриламида и ионов Mg^{2+} приводят к усилению аномально медленной миграции искривленных молекул ДНК через полиакриламидные гели. Тем не менее, было обнаружено, что не все эти условия являются подходящими для четкого различия аллелей *VRN-A1* и *VRN-B1*, идентифицированных в настоящем исследовании. В то время как повышение концентрации ионов Mg^{2+} приводит к увеличению разницы в скорости миграции между фрагментами, детектирующими аллельные варианты *VRN-A1* и варианты последовательности промотора гена *VRN-B1*, продолжительность электрофореза также значительно увеличивается (2-2.5 раза). Кроме того, результаты разделения фрагментов ПЦР, идентифицирующих варианты *Vrn-A1b*, были плохо воспроизводимы. При низкой температуре (< 20 °С) двукратное увеличение напряженности электрического поля (с 5 до 10 В/см) не оказывало значительного влияния на разрешение ампликонов *VRN-A1* и *VRN-B1*. При комнатной температуре (температура геля 25-28 °С) двукратное уменьшение напряженности электрического поля (с 5 до 2.5 В/см) приводит к значительному замедлению аномально медленно мигрирующих фрагментов и увеличению разрешения для вариантов *VRN-A1* и *VRN-B1*, но требует более чем в двое больше времени для проведения электрофореза.

Несмотря на то, что низкая ионная сила (низкая концентрация буфера в геле) приводит к замедлению аномально медленно мигрирующей ДНК, в результате диффузии фрагментов в гель, полосы расплываются (становятся нечеткими), усложняя детекцию различия между фрагментами со сходной скоростью миграции, такими как ампликоны вариантов *Vrn-A1b*. В противоположность этому, при увеличении ионной силы (высокая концентрация буфера в геле), наблюдается подавление аномально медленной миграции. Однако высокая ионная сила препятствует диффузии фрагментов в геле и приводит к более четким полосам. Важно отметить, что влияние ионной силы на аномальную миграцию ДНК в ПААГ при низкой температуре ($< 20^{\circ}\text{C}$) было незначительным.

Значительное влияние оказывала структура и особенности гелевой матрицы. В частности, обнаружено, что усиление аномально медленной миграции и электрофоретического разрешения может быть достигнуто при проведении электрофореза в гелях с высоким соотношением моно/бис-акриламида (соотношение 82:1 является оптимальным). Увеличение концентрации акриламида до 10% сопровождалось увеличением разницы в скорости подвижности фрагментов ПЦР при комнатной температуре. Однако это имело сильное отрицательное влияние на разрешение фрагментов *VRN-A1* и *VRN-B1* при низкой температуре (**рис.1**). Кроме того, высокая концентрация акриламида продлевает время анализа, увеличивает ток через гель и, следовательно, приводит к росту температуры геля в ходе электрофореза.

Сильное влияние на замедление аномально медленно мигрирующих фрагментов и, следовательно, увеличение разрешения фрагментов *VRN-A1* и *VRN-B1*, оказывала низкая температура. В целом, электрофорез при низкой температуре требует больше времени. Однако, поскольку при низкой температуре ($< 20^{\circ}\text{C}$) повышение напряженности электрического поля и ионной силы имеют незначительное влияние, а более концентрированный гель имеет отрицательное влияние на разделение ампликонов *VRN-A1* и *VRN-B1*, проведен электрофорез в низкопроцентных гелях (6.6%) с высокой ионной силой (123 мМ) и при высокой напряженности электрического поля (5-10 В/см). В результате, четкие полосы с высоким разрешением фрагментов ПЦР, наилучшим образом детектирующие

аллели *VRN-A1* и *VRN-B1*, были получены за относительно короткое время (1.5-3 ч, в зависимости от напряженности электрического поля и силы тока).

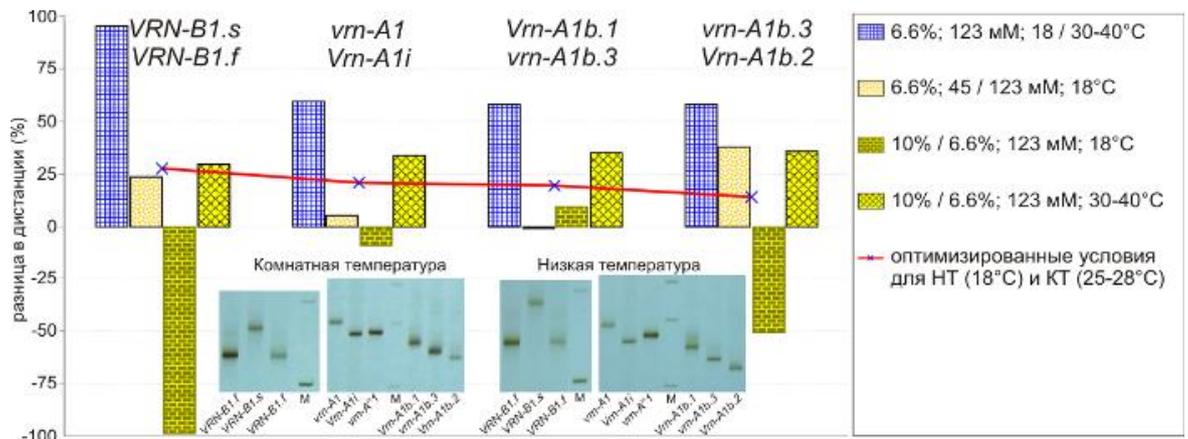


Рисунок 1. Влияние концентрации полиакриламидного геля, ионной силы и температуры на изменение расстояния между фрагментами ПЦР аллелей *VRN-A1* и *VRN-B1*, измеренное относительно расстояния между ампликонами *Vrn-A1e* (659 п.н.) и *vrn-B3a* (1768 п.н.) для которых аномальная миграция не наблюдается. Электрофорез проведен при 5 В/см. Кривая характеризует разницу в дистанциях между соответствующими парами ампликонов после оптимизации условий проведения электрофореза при низкой (LT) и комнатной (RT) температуре. Фрагменты ПЦР различных аллельных вариантов генов *VRN-A1* и *VRN-B1* были четко различимы в ходе ПАГЭ после оптимизации электрофоретических условий вне зависимости от температуры, при которой проводился анализ. М – маркер длины ДНК показывающий фрагменты размером 1000 и 1200 п.н. для вариантов *VRN-B1* и 600, 700, 800 п.н. для вариантов *VRN-A1*; в данных условиях, фрагменты маркера мигрируют аномально медленно в полиакриламидных гелях.

Оптимизация условий проведения полиакриламидного гель-электрофореза для детекции аллелей *VRN-A1* и *VRN-B1*

Различие в кривизне и гибкости молекул ДНК вызвано мутациями в последовательности VRN-бокса в идентифицированных аллельных вариантах *VRN-A1* или делециями в А-тракт обогащенных участках вариантов промотора гена *VRN-B1*. Это приводит к модуляции скорости аномально медленно мигрирующих фрагментов ПЦР. Аномальная миграция наблюдалась только в ПААГ, но не в агарозных. В целом, замедление аномально медленно мигрирующих фрагментов

ПЦР и четкие полосы являются особо важными в идентификации аллельных вариантов *Vrn-A1b*, где *Vrn-A1b.1* / *Vrn-A1b.6* и *vrn-A1b.3* / *Vrn-A1b.2* показывают небольшую разницу в скорости миграции, а также являются основными в дискриминации вариантов последовательности промотора гена *VRN-B1*.

Низкая температура снижает конформационную динамику и является критичной для стабилизации формы молекул ДНК, тогда как высокая ионная сила приводит к более четким полосам. Влияние ионов Mg^{2+} на миграцию фрагментов в полиакриламидном геле, как известно, зависит от нуклеотидной последовательности ДНК (Li et al., 2011). В этой связи, а также в связи с увеличением продолжительности времени проведения электрофореза, не рекомендуется использовать ионы магния во время дискриминации из вариантов *Vrn-A1b*. В первую очередь, это связано с тем, что скорость миграции ампликонов будет зависеть от мутаций, локализованных за пределами VRN-бокса, приводящих к ошибочным и плохо воспроизводимым результатам. К сожалению, не удалось подобрать условий проведения электрофореза при которых можно однозначно различить аллели *vrn-A1b.3* / *Vrn-A1b.5* и *vrn-A1b.4* / *Vrn-A1b.6*, которые все еще могут быть определены путем секвенирования. С другой стороны, аллели *vrn-A1b.4* и *Vrn-A1b.5* обнаружены только в одном образце пшеницы. Кроме того, при низкой температуре (10 °C) и высокой напряженности электрического поля (7.5-10 В/см), фрагменты *Vrn-A1b.5* мигрировали медленнее, чем *vrn-A1b.3*, тогда как *vrn-A1b.4* мигрировал медленнее, чем *Vrn-A1b.6*, хотя в обоих случаях эти различия были незначительными.

На основании выявленных особенностей anomalно медленной миграции искривленных молекул ДНК в ПААГ, условия электрофореза были оптимизированы таким образом, чтобы получить минимальную потерю в разрешающей способности (<30%), при проведении электрофореза при низкой и при комнатной температуре (**рис.1**). Таким образом, электрофорез в 6.6% неденатурирующем полиакриламидном геле при соотношении моно / бис-акриламида 82:1, в слабом электрическом поле (2.5 В/см) и высокой ионной силе (123 мМ, 1.38х ТБЭ в геле) является наиболее подходящим для разделения фрагментов ПЦР при комнатной температуре, тогда как электрофорез при низкой температуре (10-20 °C) и высокой напряженности электрического поля (5-10 В/см)

рекомендуется для получения наилучших результатов и сохранения времени. При этом, увеличение напряженности электрического поля более 5 В/см не требуется, если ток превышает 20 мА.

Li W., Nordenskiöld L., Mu Y. Sequence-specific Mg^{2+} -DNA interactions: a molecular dynamics simulation study. // J Phys Chem B. - 2011. - V. 115. №49. - P.14713-14720.

Приложение 3. Кватернионная модель спирали ДНК

Для построения трехмерной модели контура ДНК молекулы по заданным параметрам динуклеотидных шагов был использован алгоритм, базирующийся на алгебре кватернионов. Вектор-функция, определяющая локализацию центра n -й пары нуклеотидов в декартовой системе координат, согласно данной кватернионной модели ДНК, имеет вид:

$$P_{(n)} = \sum_{i=2}^n \left[\prod_{k=2}^i [Q_{\Omega_k \rho_k \tau_k}] \circ \vec{V}_{(x_i + Dx_i, y_i + Dy_i, z_i + Dz_i)} \circ \left\{ \prod_{k=2}^i [Q_{\Omega_k \rho_k \tau_k}] \right\}^{-1} \right]$$

где $\prod_{k=2}^i [Q_{\Omega_k \rho_k \tau_k}]$ есть операция умножения кватернионов трех последовательных поворотов по осям Z , Y и X ($Q_{\Omega_k \rho_k \tau_k}$) на углы заданные параметрами *twist* (Ω), *roll* (ρ) и *tilt* (τ) соседних пар оснований $(k-1, k)$:

$$Q_{\Omega_k \rho_k \tau_k} = \begin{bmatrix} \cos \frac{\Omega_k}{2} \cos \frac{\rho_k}{2} \cos \frac{\tau_k}{2} + \sin \frac{\Omega_k}{2} \sin \frac{\rho_k}{2} \sin \frac{\tau_k}{2} & & & & & \\ \cos \frac{\Omega_k}{2} \cos \frac{\rho_k}{2} \sin \frac{\tau_k}{2} - \sin \frac{\Omega_k}{2} \sin \frac{\rho_k}{2} \cos \frac{\tau_k}{2} & & & & & \\ \cos \frac{\Omega_k}{2} \sin \frac{\rho_k}{2} \cos \frac{\tau_k}{2} + \sin \frac{\Omega_k}{2} \cos \frac{\rho_k}{2} \sin \frac{\tau_k}{2} & & & & & \\ -\cos \frac{\Omega_k}{2} \sin \frac{\rho_k}{2} \sin \frac{\tau_k}{2} + \sin \frac{\Omega_k}{2} \cos \frac{\rho_k}{2} \cos \frac{\tau_k}{2} & & & & & \end{bmatrix},$$

вектор $\vec{V}_{(x_i + Dx_i, y_i + Dy_i, z_i + Dz_i)}$ содержит координаты i -ого элемента в подвижной системе координат пары оснований (например, координаты идеализированного фосфата первой цепи для любого n содержатся в векторе $\vec{V}_{(Dx_i, 8.91 + Dy_i, 2.08 + Dz_i)}$).

Построение трехмерной модели выполнено в локальной декартовой системе координат в соответствии с преобразованиями, предусмотренными Кембриджской конвенцией об определении параметров и номенклатуре структурных компонентов нуклеиновых кислот (Dickerson, 1989). Центр первой пары нуклеотидов располагается в начале координатной системы, в точке 0.

Dickerson RE (1989) Definitions and nomenclature of nucleic acid structure components. *Nucleic Acids Res* 17(5):1797-1803.

Параметры динуклеотидных шагов

В динуклеотидном контексте:

	Shift (Å)	Slide (Å)	Rise (Å)	Tilt (°)	Roll (°)	Twist (°)
AA	0.01	-0.72	3.22	-0.81	0.19	35.19
TT	-0.01	-0.72	3.22	0.81	0.19	35.19
AG	0.03	-0.8	3.24	0.31	-0.6	35.62
CT	-0.03	-0.8	3.24	-0.31	-0.6	35.62
AT	0.01	-0.67	3.54	0.54	-2.6	33.84
CG	0.03	-0.6	3.14	0.53	1.89	37.17
GA	-0.02	-0.64	3.08	0.7	0.06	36.75
TC	0.02	-0.64	3.08	-0.7	0.06	36.75
GT	0.01	-0.44	3.14	0.64	1.93	35.82
AC	-0.01	-0.44	3.14	-0.64	1.93	35.82
TG	0.03	-0.32	3.11	-0.05	3.5	34.8
CA	-0.03	-0.32	3.11	0.05	3.5	34.8
GC	0.16	-0.31	3.28	1.13	1.08	37.5
GG	0.18	-0.27	3.29	1.65	2.86	38
CC	-0.18	-0.27	3.29	-1.65	2.86	38
TA	-0.3	0.06	3.13	-1.03	2.5	35.06

В тетра-нуклеотидном контексте:

	Shift (Å)	Slide (Å)	Rise (Å)	Tilt (°)	Roll (°)	Twist (°)
AAAT	-0.23	-0.4	3.15	-4.84	0.39	37.47
ATTT	0.23	-0.4	3.15	4.84	0.39	37.47
AAGA	0.08	-1.15	3.15	0.34	0.39	31.61
TCTT	-0.08	-1.15	3.15	-0.34	0.39	31.61
AAGC	0	-1.26	3.19	-0.55	-1.2	35.47
GCTT	0	-1.26	3.19	0.55	-1.2	35.47
AATT	0.02	-0.98	3.89	0.02	-13.47	32.03
ACGC	0.01	-0.37	3.2	1.05	8.27	35.65
GCGT	-0.01	-0.37	3.2	-1.05	8.27	35.65
ACGG	-0.17	-0.55	3	3.28	3.43	34.56
CCGT	0.17	-0.55	3	-3.28	3.43	34.56
AGAA	0.26	-0.74	3.17	1.67	1.83	36.56
TTCT	-0.26	-0.74	3.17	-1.67	1.83	36.56
AGAG	-0.21	-0.27	3.04	-0.9	1.84	38.19
CTCT	0.21	-0.27	3.04	0.9	1.84	38.19
AGTA	-0.09	-1.05	3.31	4.1	-5.9	40.9
TACT	0.09	-1.05	3.31	-4.1	-5.9	40.9
ATGA	-0.32	-0.76	2.8	3	1.2	39.1
TCAT	0.32	-0.76	2.8	-3	1.2	39.1

	Shift (Å)	Slide (Å)	Rise (Å)	Tilt (°)	Roll (°)	Twist (°)
CAAA	-0.01	-0.29	3.13	-1.62	3	35.48
TTTG	0.01	-0.29	3.13	1.62	3	35.48
CAAG	0.28	-0.67	2.96	-1.02	2.32	34.75
CTTG	-0.28	-0.67	2.96	1.02	2.32	34.75
CATG	0.03	-0.68	3.15	0.32	-3.84	32.28
CCTC	-0.21	0.78	3.52	0.3	14.8	32.4
GAGG	0.21	0.78	3.52	-0.3	14.8	32.4
CGCA	-0.14	-0.55	3.36	-1.13	3.6	36.61
TGCG	0.14	-0.55	3.36	1.13	3.6	36.61
CGCG	0.02	0.02	3.1	0.02	-2.54	36.77
CGGC	0.41	0.11	3.27	0.74	1.05	40.44
GCCG	-0.41	0.11	3.27	-0.74	1.05	40.44
CGGT	0.39	-0.32	3.28	1.8	4.2	38.8
ACCG	-0.39	-0.32	3.28	-1.8	4.2	38.8
CGTT	0.16	-0.8	3.39	4.27	-0.89	34.89
AACG	-0.16	-0.8	3.39	-4.27	-0.89	34.89
CTAC	-0.23	-0.07	3.21	-0.19	7.1	37.87
GTAG	0.23	-0.07	3.21	0.19	7.1	37.87
CTCC	-0.06	-0.43	3.24	1.2	-6.2	30.8
GGAG	0.06	-0.43	3.24	-1.2	-6.2	30.8
CTGG	-0.72	0.67	2.95	-1.7	6.6	36.5
CCAG	0.72	0.67	2.95	1.7	6.6	36.5
GAAA	-0.1	-0.7	3.27	-1.87	5.47	36.53
TTTC	0.1	-0.7	3.27	1.87	5.47	36.53
GAAG	0.04	-0.99	2.99	-0.77	-1.29	35.33
CTTC	-0.04	-0.99	2.99	0.77	-1.29	35.33
GAGA	0.09	-1.05	3.13	1.11	-4.27	32.43
TCTC	-0.09	-1.05	3.13	-1.11	-4.27	32.43
GAGT	-0.25	-1.05	3.08	-2.7	3.7	35.7
ACTC	0.25	-1.05	3.08	2.7	3.7	35.7
GCAA	0.06	-0.66	3.07	1.11	7.98	31.8
TTGC	-0.06	-0.66	3.07	-1.11	7.98	31.8
GCAT	-0.42	-0.14	3.17	0.45	5.16	37.29
ATGC	0.42	-0.14	3.17	-0.45	5.16	37.29
GCGC	0.74	-0.14	3.27	0.46	2.53	33.95
GCGG	-0.03	0.1	2.84	-0.35	2.1	40.6
CCGC	0.03	0.1	2.84	0.35	2.1	40.6
GCTA	-0.16	-0.55	3.12	2.47	-3.12	32.79
TAGC	0.16	-0.55	3.12	-2.47	-3.12	32.79
GCTG	-0.63	-0.17	3.56	1.13	8.83	34.79
CAGC	0.63	-0.17	3.56	-1.13	8.83	34.79
GGCA	0	-0.65	3.14	1.94	-1.54	35.97
TGCC	0	-0.65	3.14	-1.94	-1.54	35.97
GGCT	0.22	-0.02	3.52	1.79	0.61	39.04
AGCC	-0.22	-0.02	3.52	-1.79	0.61	39.04
GGTC	0.43	-1	3.19	1.4	-0.4	29.5
GACC	-0.43	-1	3.19	-1.4	-0.4	29.5
GGTG	-0.44	-0.54	3.26	-0.8	-4.2	34.8
CACC	0.44	-0.54	3.26	0.8	-4.2	34.8
GTAC	0.41	-0.53	2.98	4.3	8	39.7

	Shift (Å)	Slide (Å)	Rise (Å)	Tilt (°)	Roll (°)	Twist (°)
GTCC	-0.26	0.18	3.47	-2.9	5.3	42.1
GGAC	0.26	0.18	3.47	2.9	5.3	42.1
GTCG	-0.16	-0.05	3.26	-1.25	4.99	37.11
CGAC	0.16	-0.05	3.26	1.25	4.99	37.11
GTCT	0.03	-0.61	3.03	0.7	5.7	36.5
AGAC	-0.03	-0.61	3.03	-0.7	5.7	36.5
GTGT	0.43	-0.19	3.22	3.7	3.7	40.8
ACAC	-0.43	-0.19	3.22	-3.7	3.7	40.8
GTTT	0.5	-0.5	3.32	1.12	0.87	37.53
AAAC	-0.5	-0.5	3.32	-1.12	0.87	37.53
TACG	0.14	-0.53	3.28	-1.53	0.95	33.24
CGTA	-0.14	-0.53	3.28	1.53	0.95	33.24
TCCG	-0.58	0.42	3.01	-2.4	-2.2	36.4
CGGA	0.58	0.42	3.01	2.4	-2.2	36.4
TCGG	-0.12	0.42	4.03	0.6	0.6	32.1
CCGA	0.12	0.42	4.03	-0.6	0.6	32.1
TCTG	-0.36	-0.26	3.47	1.4	-0.4	37.5
CAGA	0.36	-0.26	3.47	-1.4	-0.4	37.5
TGAG	0.15	-0.82	3.11	3	3.4	39.2
CTCA	-0.15	-0.82	3.11	-3	3.4	39.2
TGCT	-0.04	-0.72	3.49	-1.62	0.07	38.81
AGCA	0.04	-0.72	3.49	1.62	0.07	38.81
TGGT	0.85	0.1	3.46	0.8	8.3	36.3
ACCA	-0.85	0.1	3.46	-0.8	8.3	36.3
TGTC	0.28	-0.1	3.27	0.1	-1.8	35.6
GACA	-0.28	-0.1	3.27	-0.1	-1.8	35.6
TTAA	0.44	-0.71	3.78	-0.22	9.44	37.19
TTTA	0.34	-1.24	3.12	3.89	-2.98	27.94
TAAA	-0.34	-1.24	3.12	-3.89	-2.98	27.94
TTTT	0.24	-0.82	3.22	0.59	-1.71	36.91
AAAA	-0.24	-0.82	3.22	-0.59	-1.71	36.91

Приложение 4. Управляемая иерархическая кластеризация как способ повышения репрезентативности кластерного анализа

В настоящее время существует множество алгоритмов упорядочивания данных основанных на иерархической кластеризации. Основной задачей в большинстве этих методов является вычисление значения меры сходства между объектами, в соответствие с которой сходные объекты объединяют в отдельные кластеры. Тем не менее, в случае, когда требуется провести упорядочивание объектов в котором важно не столько определение сходства между объектами с целью их классификации, сколько распределение их по группам в соответствие с заданной иерархией сравниваемых характеристик, данные методы являются совершенно бесполезными, поскольку не позволяют априорно задавать правила кластеризации, т.е. являются "неуправляемыми".

Разработан алгоритм управляемой иерархической кластеризации объектов с категориальными характеристиками, основанный на агломеративном методе последовательной кластеризации. Суть метода заключается в первоначальном расчете иерархической структуры характеристик с заданным распределением по ярусам, исходя из их комбинаций в данной выборке объектов, и последующей кластеризации объектов, основываясь на выведенной иерархии:

$$O^0 = \{o_n \mid T(o_n) = t_0\}, t \in Ch$$

$$O^{i>0} = \{o_n \mid T(o_n) = t_i \wedge q(o_n o^{i-1}) > 0\},$$

где O^i - множество узлов уровня (яруса) i , $T(o_n)$ - характеристика (признак) узла o_n , t_i - характеристика по которой проводится кластеризация объектов на уровне i , $q(o_n o)$ - частота встречаемости комбинации характеристик узлов $o_n o$, Ch - заданное множество упорядоченных характеристик, по которым проводится последовательная кластеризация объектов.

Ключевым моментом данного метода является возможность априорно задавать порядок (очередность) характеристик по которым проводится

последовательная кластеризация выборки объектов, что позволяет манипулировать кластеризацией, выстраивая иерархию характеристик в зависимости от требуемого представления результирующей дендрограммы. Так, для объектов с количеством характеристик равным n , возможно формирование $n!$ вариантов иерархической структуры и, следовательно, столько же вариантов кластерного представления данной выборки объектов.

Таким образом, в отличие от большинства существующих, "неуправляемых" методов кластеризации, где результирующая дендрограмма является одним из $n!$ вариантов, который зависит, главным образом, от выбранного алгоритма кластеризации, метод управляемой иерархической кластеризации позволяет повысить информативность кластерного анализа до максимального уровня, благодаря возможности использования всего потенциала вариантов ($n!$) иерархической структуры и, соответственно, результирующей дендрограммы.

Приложение 5. Метод выведения филогении гаплотипов и определения гаплогрупп

Для исследования филогенетических взаимоотношений между гаплотипами и определения гаплогрупп, бинарная матрица смежности, отражающая зависимости между аллелями рассчитывалась исходя из предположения, согласно которому данный аллель ассоциирован с другим аллелем, если в исходной выборке гаплотипов он встречается только в комбинации с ним. Для более наглядного отображения межаллельных ассоциаций, матрица смежности представлена в аналитическом виде – как связный ациклический граф (дерево) с корнем.

Если сегрегирующие позиции биаллельны, то расчет межаллельных ассоциаций (МА) может быть выполнен в ходе простой итерации (SI) комбинаций аллелей и анализа частот их встречаемости:

$$A_i = \{a_{n \neq i} \mid q(a_n) = q(a_n a_i)\} \quad (I),$$

где A_i является множеством аллелей a_n ($n \neq i$) зависимых от аллеля a_i , таких, что их частота встречаемости ($q(a_n)$) равна частоте встречаемости их комбинации с аллелем a_i ($q(a_n a_i)$).

Следовательно, для каждого подмножества A_n соответствующего аллелям a_n , составляющим подмножество (A_i) аллеля a_i , справедливо выражение:

$$A_n \subset A_i \Rightarrow \forall a_x \in A_n, a_x \in A_i \quad (II). \quad \text{Таким образом, если}$$

$$A_x \subset A_y \wedge A_z \subset A_x \Rightarrow A_y \notin A_z.$$

Кроме того, если $a_z \in A_x \wedge P(a_z) = P(a_y) \Rightarrow a_x \notin A_y$ (III), где $P(a)$ возвращает сегрегирующую позицию, в которой дивергировал аллель a . Поскольку

$$q(a_x) \geq q(a_x a_z) + q(a_x a_y).$$

Очевидно, что комбинация аллелей существует только в том случае, если они принадлежат различным сегрегирующим позициям, т.е.

$P(a_n) = P(a_i) \Rightarrow \neg(a_n a_i) \Rightarrow q(a_n a_i) = 0$ (IV). Следовательно, для каждой комбинации пары аллелей справедливо:

$$\exists a_n a_i \Leftrightarrow P(a_n) \neq P(a_i) \wedge [(a_n \in A_i \vee a_i \in A_n) \vee (a_n = Rc_n \wedge a_i = Rc_i)],$$

где Rc есть корень компоненты связности аллелей из данной пары сегрегирующих позиций.

В случае, когда сегрегирующие позиции производят более двух аллелей, возникает избыточность компонент связности в результате их разрыва, неизбежно происходящего в ходе дивергенции позиций при возникновении в них новых аллелей. Для реконструкции компонент связности (филогенетических ветвей) был разработан алгоритм циклической итерации с исключением (СІЕ), в ходе имплементации которого итерация осуществляется до тех пор, пока устанавливаются ассоциативные связи между аллелями:

$$A_i = \left\{ a_{n \neq i} \mid q(a_n a_i) = q(a_n) - \sum_{\{a_x \in A_n \mid P(a_x) = P(a_i)\}} q(a_n a_x) \right\} \quad (V),$$

где A_i есть множество аллелей зависимых от a_i , которое содержит такие аллели a_n ($n \neq i$), что частота встречаемости комбинации $a_n a_i$ равна разности частоты встречаемости аллеля a_n и суммы частот встречаемости комбинаций аллеля a_n с зависимыми от него аллелями a_x , дивергирующими из той же сегрегирующей позиции, что аллель a_i .

Поскольку в данном случае $q(a_n a_i) \leq q(a_n)$, то следствие (III) алгоритма SI не всегда выполнимо, однако именно это обстоятельство и позволяет восстанавливать компоненты связности. На самом деле, частота встречаемости комбинации аллелей $a_n a_i$ будет равна частоте встречаемости аллеля a_n только в

$$A_n = \emptyset \Rightarrow \sum_{\{a_x \in A_n \mid P(a_x) = P(a_i)\}} q(a_n a_x) = 0$$

ходе первого прохода цикла, когда

Сюда относятся такие аллели a_n , от которых не зависят (с которыми не ассоциированы) аллели дивергировавшие из тех же позиций, что и аллели a_i , от которых зависят аллели a_n , т.е.

$q(a_n a_i) = q(a_n) \Leftrightarrow A_n = \emptyset \vee \{a_n \mid \forall a_x \in A_n, P(a_x) \neq P(a_i)\}$. В первую очередь, такие аллели включают листья - узлы, не имеющие входящих дуг, аллели, с которыми не ассоциированы никакие другие аллели: $A_i = \emptyset$, если a_i - лист.

В ходе цикла итерированно выбирается выборка аллелей, при этом ассоциации (взаимосвязи) устанавливаются для каждой пары аллелей из различных позиций, если частота встречаемости их комбинаций > 0 .

Если рассматривать анализ каждой пары позиций в отдельности, то можно убедиться в следующем.

В ходе каждого цикла устанавливаются прямые ассоциации:

$$a_n \in A_m \Rightarrow a_m \in A_i \{a_i \mid P(a_i) = P(a_n) \wedge a_i \neq a_n\}$$

Если $|A_i| > 1$, то на следующем этапе цикла будут устанавливаться аллели из множества A_i , с которым ассоциирован (от которых зависит) аллель a_m .

Если $|A_i| = 1$, то на следующем этапе цикла будет подтверждена зависимость аллеля a_m от аллеля a_i ($a_m \in A_i$), поскольку в данном случае она инвариантна. Таким образом, при достижении $|A_i| = 1$ дальнейший анализ ассоциаций для данной пары позиций прервется на следующем этапе цикла, поскольку определены все варианты зависимостей между аллелями из данных позиций в исходной выборке комбинаций.

Если на данной глубине цикла получено (существуют) несколько a_m , таких, что $P(a_{m1}) = P(a_{m2}) = \dots = P(a_{mn})$, т.е. все a_m являются аллелями из одной и той же позиции и для каждого a_m $|A_i| > 1$, то определить аллели ($A_u \neq \emptyset$), с которыми будет устанавливаться ассоциации (от которых будет устанавливаться зависимость) аллелей a_m на следующем этапе цикла, можно определив их пересечение. При этом, если аллели из данной пары позиций уже анализировались на предыдущих этапах цикла, то в пересечении участвуют также их A_i , полученные на предыдущих этапах цикла:

$$A_u = \bigcap_{n \in i}^i A_n$$

Если $|A_u| = 1$, то a_u является единственным аллелем, с которым ассоциированы аллели a_m и, следовательно, анализ зависимостей между аллелями из данных

позиций прервется на следующем этапе цикла. Таким образом, не остается такого аллеля, для которого не была бы установлена ассоциативная связь (данное утверждение не действительно в случае гомоплазии).

В корне каждой компоненты связности располагаются аллели, являющиеся основанием ветвей наибольшей длины (т.е. характеризующиеся наибольшим значением эксцентриситета). Если число таких аллелей равно двум, то такие аллели взаимно ассоциированы. Таким образом, данный алгоритм предполагает одинаковую скорость эволюции (частоту дивергенции) для всех аллелей, так, что наиболее древний аллель будет характеризоваться наибольшим эксцентриситетом, поскольку в ходе последовательной дивергенции, предковый аллель является корнем филогенетической линии (компоненты связности), надмножеством производных, зависимых от него, аллелей:

$$\begin{cases} A_z \subset A_y, A_y \subset A_x \Rightarrow A_z \subset A_x \\ e(a_x) = d(a_x, a_z) = d_{\max} \end{cases}$$

Если от альтернативных аллелей из пары позиций зависит одинаковое количество аллелей, то в корне располагаются аллели, которые зависят только от ассоциированных с ними аллелей (т.е. взаимно ассоциированные по псевдотипу аллели). Возникает избыточность связей. Однако, на данном этапе мы не можем знать какие из этих связей являются избыточными, пока не будут установлены взаимосвязи с аллелями из других позиций. (*пара*) Взаимно ассоциированные по псевдотипу аллели в корне компоненты связности данной пары позиций указывают (*два*) альтернативные пути первичной дивергенции из любой из этих позиций (по одной или из другой позиции, соответственно).

Поскольку $|A_i| = |\{a_x \mid P(a_x) = P(a_n)\}| - 1$, то для биаллельных позиций $|A_i| := 1$ (т.к. $|\{a_x \mid P(a_x) = P(a_n)\}| = 2$), следовательно, достаточно одного прохода цикла для установления взаимосвязей между всеми аллелями из данной пары позиций, поскольку следующий цикл убедит нас в том, что оставшаяся пара аллелей взаимно ассоциирована (т.к. оба аллеля попадают в корень). В этой связи, при использовании алгоритма SI, цикл, итерирующий исходную выборку аллелей, является однопроходным.

Взаимно ассоциированные аллели, продуцируемые в ходе имплементации алгоритмов SI и CIE, различаются. Для обоих алгоритмов справедливо следующее определение: взаимно ассоциированные аллели - это аллели, которые встречаются только в комбинации между собой на данной глубине цикла (принимая во внимание, что для алгоритма SI цикл является однопроходным, количество итераций = 1).

При использовании алгоритма SI возможно образование групп только типичных взаимных ассоциаций, где симметричная разность множеств аллелей зависимых от взаимно ассоциированных аллелей данной группы дает множество из последних (взаимно ассоциированных аллелей данной группы):

$$\left\{ \begin{array}{l} n=|A \\ \Delta_{n=0} A_n = \{a_0, a_1, \dots, a_n\} \\ \exists A_{k \in \{0:n\}} \Leftrightarrow \exists A_{l \in \{0:n | l \neq k\}} \\ A_{k \in \{0:n\}} \setminus A_{l \in \{0:n | l \neq k\}} - a_l = \emptyset \\ \left| \Delta_{n=0} A_n \right| = n \end{array} \right.$$

К примеру, для двух взаимно ассоциированных аллелей a_x и a_y справедливо следующее утверждение:

$$\left\{ \begin{array}{l} A_x \Delta A_y = \{a_x, a_y\} \\ A_x \setminus A_y - a_y = A_y \setminus A_x - a_x = \emptyset \\ |A_x \Delta A_y| = 2 \end{array} \right.$$

При использовании алгоритма CIE, кроме типичных, часто образуются псевдовзаимные ассоциации, где симметричная разность множеств аллелей зависимых от взаимно ассоциированных аллелей данной группы дает множество из последних с добавлением всех неповторяющихся, зависимых от них аллелей:

$$\left\{ \begin{array}{l} n=|A \\ \Delta_{n=0} A_n = \{a_0, a_1, \dots, a_n\} \cup \{A_{k \in \{0:n\}} \setminus A_{l \in \{0:n|l \neq k\}} - a_l\} \\ A_{k \in \{0:n\}} \setminus A_{l \in \{0:n|l \neq k\}} - a_l \neq \emptyset \\ \left| \Delta_{n=0}^{n=|A} A_n \right| > n \end{array} \right.$$

Соответственно, для двух взаимно ассоциированных по псевдо типу аллелей a_x и a_y справедливо следующее:

$$\left\{ \begin{array}{l} A_x \Delta A_y = \{a_x, a_y\} \cup \{A_x \setminus A_y - a_y\} \cup \{A_y \setminus A_x - a_x\} \\ A_x \setminus A_y - a_y \neq A_y \setminus A_x - a_x \neq \emptyset \\ |A_x \Delta A_y| > 2 \end{array} \right.$$

Для данного типа взаимно ассоциированных аллелей условие $\exists A_{k \in \{0:n\}} \Leftrightarrow \exists A_{l \in \{0:n|l \neq k\}}$ не выполняется, поскольку для взаимной ассоциации аллелей a_i и a_n , сформированной после первого прохода цикла, $q(a_n) > q(a_n a_i)$, т.е. определенно существуют такие аллели a_k ($k \neq i$), которые образуют комбинации с аллелем a_n . В результате будут существовать такие аллели a_x , ассоциированные или взаимно ассоциированные по псевдо типу с одним из аллелей псевдовзаимной ассоциации, которые не образуют связей с другим аллелем данной псевдо взаимной ассоциации.

К примеру, если пары аллелей $a_x a_y$ и $a_y a_z$ взаимно ассоциированы, то аллели a_x и a_z также взаимно ассоциированы:

$$\begin{aligned} A_x \Delta A_y = \{a_x, a_y\} \wedge A_y \Delta A_z = \{a_y, a_z\} &\Rightarrow \\ A_x \Delta A_z = \{a_x, a_z\} & \end{aligned}$$

Однако если эти же пары аллелей псевдо взаимно ассоциированы, то для аллелей a_x и a_z существует три варианта отношений: они являются взаимно ассоциированными по первому или второму типу, или же между этими аллелями зависимости и вовсе отсутствуют:

$$\begin{aligned}
A_x \Delta A_y &= \{a_x, a_y\} \cup \{A_x \setminus A_y - a_y\} \cup \{A_y \setminus A_x - a_x\} \wedge \\
A_y \Delta A_z &= \{a_y, a_z\} \cup \{A_y \setminus A_z - a_z\} \cup \{A_z \setminus A_y - a_y\} \Rightarrow \\
A_x \Delta A_z &= \{a_x, a_z\} \cup \{A_x \setminus A_z - a_z\} \cup \{A_z \setminus A_x - a_x\} \vee A_x \cup A_z
\end{aligned}$$

Поскольку после первого прохода цикла все взаимно ассоциированные аллели принадлежат к первому типу (типичные взаимные ассоциации), а при последующих итерациях, ко второму, то в результате использования алгоритма СІЕ возможно образование двух типов взаимно ассоциированных аллелей, типичный и псевдотип.

В этой связи для обоих алгоритмов (SI и СІЕ) был введен общий стандарт формирования групп взаимно ассоциированных аллелей (G_a), согласно которому, взаимно ассоциированные аллели образуют одну группу, если множества зависимых от них аллелей, включая и сам аллель, являются идентичными:

$$\begin{aligned}
G_a &= \left\{ a_n \mid A_n \underset{A_i \subset G_a}{\overset{\exists a_i}{\Delta}} A_i = \{a_n, a_i\} \right\} \Rightarrow \\
&\Rightarrow G_a = \left\{ a_n \mid \{a_n, A_n\} = \underset{a_i \in G_a}{\overset{\exists a_i}{\{a_i, A_i\}}} \right\}
\end{aligned}$$

Ярусность узлов (иерархия узловых уровней) и их упорядочивание рассчитано по следующему алгоритму: в ходе итерации выборки аллелей (узлов), в соответствии с матрицей смежности, сравниваются узлы, уровень которых еще не определен или является текущим. На одном уровне располагаются узлы, которые не являются началом дуги к узлам неопределенного уровня (более высокого) или имеют смежный узел текущего уровня (т.е. аллели соответствующие данным узлам (узлы одного уровня) не ассоциированы с аллелями, уровень которых еще не определен).

В математическом представлении, выведение иерархической структуры основано на следующем принципе: $\forall A^{i>0} \subset A^{i-1}$, согласно которому каждый узел (множество) A уровня i ($i>0$) является подмножеством одного или более узлов предыдущего уровня ($i-1$). В свою очередь, для каждого узла (множества) A уровня i ($i>0$), справедливы следующие выражения (принципы, условия):

$$\left\{ \begin{array}{l} A^{i>0} \subset A^{i-1} \quad (\text{I}) \\ A^i \not\subset A^{k>i} \quad (\text{II}) \\ A_x^i \not\subset A_y^i \quad (\text{III}) \\ A_x^i \cap A_y^i = \emptyset \quad (\text{IV}) \\ \Delta_{n=0}^{n=|A^i|} A_n^i = \{a_0, a_1, \dots, a_n\}, \exists A_{k \in \{0:n\}}^i \Leftrightarrow \exists A_{l \in \{0:n \mid l \neq k\}}^i \quad (\text{V}) \end{array} \right.$$

при этом условие (V) выполняется только для взаимно ассоциированных аллелей. Такое упорядочивание узлов ориентирует дуги в направлении корня – дуги, исходящие из узлов верхних ярусов направлены к узлам нижних ярусов.

Дерево рассчитано методом рекурсивного спуска (нисходящий разбор) от узлов высшего уровня к корню. Корень дерева (R) образован путем объединения узлов низшего уровня (нулевого яруса) являющихся началом множества компонент связности (леса):

$$R_{SI} = \{a_n \mid A_n^- = \emptyset\}$$

$$R_{CIE} = \{a_n \mid A_n^- = \emptyset \vee (a_n \in A_i \wedge a_i \in A_n)\},$$

где A_n^- есть множество аллелей, от которых зависит аллель a_n (отрицательная степень узла A_n обозначает, что данная вершина (аллель a_n) является началом исходящих дуг). Таким образом, ассоциативные связи между алелями ориентированы в направлении корня, в котором сгруппированы аллели, объединяющие отдельные компоненты связности (деревья).

Данный метод выведения филогении из всех возможных вариантов топологии выбирает ту из них, которая соответствует наиболее симметричному дереву с минимальной ярусностью. Получение топологии симметричного дерева минимальной высоты осуществляется на этапе расчета межаллельных ассоциаций (установления зависимостей между аллелями) в ходе генерации матрицы смежности. В ходе первой итерации (первого прохода цикла) анализируются листья (аллели последнего уровня n , хотя изначально количество уровней не известно) и определяется их ассоциация (зависимость от) с аллелями уровня $n-1$.

Далее ассоциации устанавливаются между аллелями уровня $n-i$ и аллелями уровня $n-i-1$ (i = порядковый номер итерации) или, в случае использования алгоритма СЕ, со всеми остальными аллелями, допустимая на данной глубине цикла частота встречаемости которых с аллелями дивергирующими из той же позиции что и анализируемый > 0 (исходя из (V), допустимая, на данной глубине цикла, частота встречаемости аллеля a_n , в зависимости от позиции аллеля a_i , равна

$$q(a_n) - \sum_{\{a_x \in A_n | P(a_x) = P(a_i)\}} q(a_n a_x)$$

Покажем, что при заданной топологии, дерево с наименьшей высотой является симметричным (т.к. отклонение от симметрии увеличивает ярусность в одном направлении и уменьшает в другом). Пусть $h(G)$ - есть высота дерева $G(V, E, \varphi)$:

$$h(G) := \max d(r, l),$$

$$r, l \in V, \text{deg}^-(r) = 0, \text{deg}^+(l) = 0, \text{ где } r \text{ и } l \text{ аллели корня и листьев,}$$

соответственно.

Тогда высота (ярусность) дерева G равна протяженности самой длинной ветви, что соответствует наибольшему расстоянию от корня до листа. Следовательно, $h(G) \rightarrow \min$ если все ветви имеют одинаковую длину:

$$\lim_{d \rightarrow \sum \frac{d}{l}} h(G) = \min$$

Поскольку последовательная дивергенция аллелей (отраженная в вертикальном ряду узловых уровней) определяется согласно принципам выведения иерархии, то в узлах соседних уровней одной филогенетической ветви расположены гаплотипы характеризующиеся минимальным количеством различий, которое соответствует одному аллелю или ассоциации.

$$A_x \subset A_n \wedge A_y \subset A_x \wedge A_y \subset A_n \Rightarrow$$

$$L(A_n) < L(A_x) < L(A_y)$$

, где $L(A_n)$ возвращает уровень, на котором расположен узел (аллель или ассоциация).

Поскольку появление новой мутации (нового аллеля) сопровождается возникновением новой комбинации из мутаций (аллелей), а, следовательно, и нового гаплотипа, то дерево гаплотипов может быть получено из соответствующего дерева аллелей. Сборка гаплотипа осуществляется от каждого узла, не принадлежащего к "первичному гаплотипу", в соответствии со следующим правилом:

$$H_i = A_i^- \cup \{a_n \mid H_i [P(a_n)] = \emptyset \wedge a_n \notin A_i \wedge q(H_i a_n) \neq 0\},$$

при этом предполагается, что

$$A_i^- = \{a_n \mid a_i \in A_n \wedge P(a_n) \neq P(\forall a_{k \neq n} \in A_i^-)\},$$

поскольку в противном случае это приведет к конвергенции (т.к. возникновение новых аллелей сопровождается бифуркацией дивергирующего узла).

Итерация узлов осуществляется последовательно, начиная с верхнего яруса (листьев) в направлении корня, и может быть преждевременно завершена, как только определены все гаплотипы из исходной выборки (оставшиеся узлы войдут в состав "первичного гаплотипа").

Заранее определенный "первичный гаплотип" нужен для того чтобы обозначить узлы (аллели), из которых не нужно выводить гаплотипы. Поскольку гаплотипы возникают в результате дивергенции некоторой (исходной) последовательности, то и выводить гаплотипы нужно только из дивергировавших аллелей. Разработано несколько алгоритмов для предварительного вычисления "первичного гаплотипа", однако для обсчета деревьев, полученных в настоящем исследовании, их применение является избыточным.

Метод определения гаплогрупп и предполагаемого корня базируется на следующих допущениях. Гаплотипы могут быть объединены в гаплогруппы по наличию общего аллеля (мутации). Теоретически, выборку гаплотипов можно разделить на две гаплогруппы по любому аллелю, основываясь на его наличии или отсутствии. Согласно дивергентной модели эволюции, появление новой мутации (или одновременно несколько сцепленных мутаций) в исходной последовательности сопровождается ее дивергенцией на две филогенетические

ветви (бифуркация), одна из которых содержит интактный (предковый) аллель, а другая – мутантный. Последующая дивергенция последовательностей сопровождается разветвлением этих двух филогенетических ветвей. В этой связи, в качестве гаплогрупп приняты две филогенетических ветви, которые образовались во время первичной дивергенции исходного гаплотипа (предполагаемого "первичного гаплотипа", корня). Соответственно, множество гаплотипов распределяется по гаплогруппам в зависимости от наличия интактного или мутантного аллеля, по которому произошла первичная дивергенция. Однако, поскольку исходный гаплотип является одним из гаплотипов первичной дивергенции, то определить корень, основываясь лишь на филогенетической структуре, невозможно, поскольку все филогенетические ветви берут начало от гаплотипов первичной дивергенции.

Определение предполагаемого гаплотипа-корня основано на определении направления эволюции гаплотипов. Поскольку в гаплотипах соответствующие аллели представлены аналогичными участками генома, носителями которых являются представители таксона одного (к тому же низкого) ранга (род, вид), которые находятся в относительно однородных условиях эволюции (характеризуются одинаковой частотой мутаций и испытывают одинаковое давление естественного отбора), то предполагается, что темп эволюции исследуемых гаплотипов также подобен. Следовательно, чем больше времени прошло с момента возникновения гаплотипа, тем более широко он распространен и тем большее количество производных гаплотипов от него происходят (при одинаковых условиях действия эволюционных факторов). Таким образом, гаплотипы, формирующие гаплогруппы в ходе первичной дивергенции являются более широко распространенными и, что более важно, образуют большее число производных гаплотипов.

**Приложение 6. Гаплотип и гаплогруппа *Ppd-A1b* в образцах 12 видов
полиплодной пшеницы**

Гаплотип и гаплогруппа *Ppd-A1b* в образцах гексаплоидной пшеницы

Вид	Название образца (сорта)	ID	Страна	Гаплотип	Гаплогруппа
<i>Triticum aestivum</i> L.	Eritroleucon 503		Ukraine	Hap-1	АII
	Kharkivska 26	96007019	Ukraine	Hap-4	AI
	Stavys`ka	04007042	Ukraine	Hap-4	AI
	Krasa Polissia	00007022	Ukraine	Hap-1	АII
	Etiud	03007029	Ukraine	Hap-3	АII
	Katiusha		Ukraine	Hap-1	АII
	Yevdokiia	04007043	Ukraine	Hap-1	АII
	Elehiia	00007023	Ukraine	Hap-4	AI
	myronivs`ka				
	Azhurnaia	03007028	Ukraine	Hap-1	АII
	Akmolinsa 1		Ukraine	Hap-4	AI
	Druzjba		Ukraine	Hap-3	АII
	Skorospilka 99	99007010	Ukraine	Hap-3	АII
	Rannia 93	93007063	Ukraine	Hap-1	АII
	Struna				
	myronivs`ka	05007057	Ukraine	Hap-4	AI
	Dniprianka		Ukraine	Hap-1	АII
	Anshlah	06007047	Ukraine	Hap-3	АII
	Vitka		Ukraine	Hap-3	АII
	Heroinia	02007036	Ukraine	Hap-4	AI
	Aranka	04007027	Ukraine	Hap-4	AI
	Siuita	04007047	Ukraine	Hap-3	АII
	Kharkivs`ka 30	99007009	Ukraine	Hap-4	AI
	Torchyns`ka		Ukraine	Hap-4	AI
	Kolektyvna 3	96007002	Ukraine	Hap-4	AI
	Sribnianka		Ukraine	Hap-4	AI
	Skorospilka 95		Ukraine	Hap-4	AI
	<i>Triticum sphaerococcum</i> Percival	23824	PI 115818	India	Hap-1
52		CItr 8610	China	Hap-1	АII
S-49		PI 182118	Pakistan	Hap-1	АII
2531		PI 190982	Belgium	Hap-1	АII
Sahari M.3		PI 191301	Portugal	Hap-1	АII
I-1-3572		PI 272580	Hungary	Hap-1	АII
Acarp		PI 277142	India	Hap-1	АII
971		PI 278650	UK	Hap-1	АII
219		PI 70711	Iraq	Hap-1	АII
I12		PI 83402	China	Hap-1	АII
-		PI 324492	India	Hap-1	АII
Type No. 4		PI 40941	Pakistan	Hap-1	АII
125		PI 42013	India	Hap-1	АII
S 2130		PI 277141	Germany	Hap-1	АII

Вид	Название образца (сорга)	ID	Страна	Гаплотип	Гаплогруппа
	CI 12212	PI 168685	USA	Hap-1	AI
	CI 17737	CItr 17737	USA	Hap-1	AI
	Rubriglabrum	UA0300243	Pakistan	Hap-1	AI
	Tumidum	UA0300244	India	Hap-1	AI
<i>Triticum compactum</i>	Gluclub	PI 114638	Australia	<i>Ppd-A1a.4</i>	
Host	PS 1785-847	PI 186391	China	Hap-1	AI
	Velino	PI 157920	Italy		AI
	Ostka			Hap-3	AI
	Skomoroska	PI 129523	Poland		
			South	Hap-3	AI
	Spitskop	PI 159101	Africa		
	Kanak	PI 164160	India	<i>Ppd-A1a.4</i>	
	H 23 H 13385	PI 191542	Portugal		AI
	1413-1	PI 211701	Turkey		AI
	Aleppo 23	PI 278541	Syria	Hap-3	AI
	Kozha Bidai	PI 262666	Kazakhstan		AI
	Premier	PI 278581	UK		AI
	Bivona	PI 294567	USA	Hap-1	AI
	Herrison Sans			Hap-1	AI
	Barbe	PI 294892	Bulgaria		
	Rouge de la				AI
	Gruyere	PI 352298	Switzerland		
	Tiroler Fruhe				AI
	Binkel	PI 352302	Austria		
	Ble D'Avril	PI 352306	France	Hap-3	AI
	DN-2263	PI 361807	Denmark		AI
	W44A	PI 410652	Pakistan	Hap-3	AI
	134	PI 436279	Chile	Hap-3	AI
	Termok	PI 41023	Kyrgyzstan		AI
	Erinaccum	UA0300240	Armenia		AI
	Grizeoicterinum	UA0300245	USA	Hap-1	AI
<i>Triticum spelta</i> L	Duhamelianum,				AI
	Frankenkorn	UA0300103	Australia		
	Duhamelianum,				AI
	NSS 1/02	UA0300259	Serbia		
	Album, NSS				AI
	1/01	UA0300246	Serbia		
	Caeruleum,				
	Tridentina	UA0300218	Italy		
	Album	UA0300304	Australia		AI
	Bearded Spelt	PI 168680	USA	Hap-3	AI
	Lignee 10	PI 190960	Belgium		AI
	2670	PI 190962	Italy		AI
	Spelta				AI
	Hohenheim	PI 190963	Portugal		
	Album	PI 221419	Serbia		AI
	85	PI 225271	Iran	Hap-1	AI
	I-1-599	PI 272573	Hungary		AI
	Stauderers	PI 286048	Germany		AI

Вид	Название образца (сорта)	ID	Страна	Гаплотип	Гаплогруппа
	Markus				
	Gruzia	PI 295056	Bulgaria	Hap-3	AII
	2943	PI 306550	Romania		AI
	-	PI 323438	Austria		AI
	Coeruleum	PI 330558	UK		AI
	Altgold	PI 347850	Switzerland		AI
	69Z6.602	PI 348428	Spain		AI
	26867-302Y- 300M-OY	PI 520066	Mexico	Hap-1	AII
	WIR 52470	PI 572914	Tajikistan	Hap-1	AII
	Altgold	PI 355629	Switzerland		AI
	Babenhauser				AI
	Rotvesen	PI 355633	Germany		
	69Z6.884	PI 348700	Spain		
<i>Triticum macha</i>	I-1-2710	PI 272554	Hungary	Hap-3	AII
Dekapr	Letshchumicum	PI 352466	FSU	Hap-3	AII
	69Z5.190	PI 355511	Russian		AI
	69Z5.193	PI 355514	Switzerland	Hap-3	AII
	DN-2378	PI 361862	Denmark		AI
	G532	PI 428146	Sweden		AI
	G866	PI 428178	Italy		AI
	G1569	PI 428179	Iran		AI
	H86-708	PI 542466	USA		AI
	WIR 29576	PI 572905	Georgia		AI
<i>Triticum vavilovii</i>	WIR 29533	PI 326319	Armenia	Hap-3	AII
	-	PI 428342	Sweden		AI
Jakubz	-	PI 428343	Sweden	Hap-3	AII

PI, Citr – образцы из National Plant Germplasm System (NPGS, <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs>)

UA – образцы из National Centre for Plant Genetic Resources of Ukraine (yuriev1908@gmail.com)

Гаплотип и гаплогруппа *Ppd-A1b* в образцах тетраплоидной пшеницы

Вид	Название образца (сорта)	ID	Страна	Гаплотип	Гаплогруппа
<i>Triticum carthlicum</i>	11891	PI 115817	Georgia		AI
	-	PI 168672	China		AI
Nevski	7282	PI 182471	Turkey		AI
	3772	PI 190949	Portugal		AI
	I-1-2715	PI 272521	Hungary		AI
	CPI 2679	PI 283887	Iran		AI
	-	PI 286070	Poland	Hap-3	AII
	WIR 32510	PI 341800	Russian		AI
	WIR 13810	PI 349040	Armenia		AI
	T-1513	PI 352279	FSU		AI
	H83-1579	PI 532502	USA		AI
	H83-1538	PI 532505	Canada		AI
	H84-558-3	PI 532512	UK		AI
<i>Triticum dicoccoides</i>	-	PI 233288	Israel	Hap-1, Hap-4	AI, AII
	DS-9	PI 256029	Spain		AI
Körn	84	PI 266841	UK	Hap-3	AII
	I-1-2708	PI 272582	Hungary		AI
	Vavilovii	PI 352322	Lebanon		AI
	Kotschyi	PI 352323	Asia Minor	Hap-1	AII
	Spontaneo villosum	PI 352325	Switzerland		AI
	Spontaneo villosum	PI 352326	Germany		AI
	Psendogord	PI 362036	Romania		AI
	G2041	PI 428018	Turkey		AI
	A-54	PI 466941	Syria	Hap-13	AII
	Namuricum	UA0300256	Jordan		AI
<i>Triticum dicoccum</i>	2323A	PI 190920	Portugal		
Schrank	2467	PI 190921	Belgium	Hap-3	AII
	Escanda de Malvedo	PI 191091	Spain		AI
	119	PI 276015	Spain		AI
	Serbicum	UA0300183	Russian, UDM		AI
	-	UA0300013	Syrian		AI
	-	UA0300003	Germany		AI
	-	UA0300082	Germany		AI
	Aeruginosum	UA0300027	Russian		AI
	Pychurum	UA0300083	Germany		AI
	Unimiegei	UA0300212	Morocco		AI
	Atratum	UA0300214	USA	Hap-3	AII
<i>Triticum durum</i>	452	PI 94732	Italy		AI
	454	PI 94733	Ethiopia		AI
Desf.	409	PI 94710	FSU		AI
	434	PI 94722	Asia Minor		AI
	429	PI 94721	Portugal	Hap-12	AII
	427	PI 94720	Spain		AI
	Melanopus 69	PI 94729	Russian		AI

Вид	Название образца (сорта)	ID	Страна	Гаплотип	Гаплогруппа
	424	PI 94578	Egypt		AI
	359	PI 94692	Syria		AI
	394	PI 94705	Palestine		AI
	Khandwa	PI 8898	India		AI
	Marching No. 8	PI 81792	Japan		AI
	N-85	PI 79900	China		AI
	-	PI 88737	Greece		AI
	2912	PI 74830	China		AI
	Abd-el-Kader	PI 7653	Tunisia		AI
	OR2010539	PI 655432	USA	Hap-3	AII
	Mongolian	CItr 10024	USA		AI
	Vallega Zittelli	CItr 15100	Italy		AI
	486				
	Wascana	CItr 15280	Canada		AI
	Royal de Almena	CItr 15278	Argentina		AI
	Hazera 1203	CItr 15274	Israel		AI
<i>Triticum polonicum</i> L.	Martinari	PI 134945	Portugal	Hap-4	AI
	Mika	PI 167622	Turkey	Hap-4	AI
	Polonicum	PI 185309	Argentina	Hap-4	AI
	Sin El-Pheel	PI 208911	Iraq	Hap-4	AI
	7959	PI 210845	Iran	Hap-4	AI
	Tafeelih Riti	PI 223171	Jordan	Hap-4	AI
	3002	PI 245663	Afghanistan	Hap-4	AI
	2719	PI 254214	India	Hap-4	AI
	88	PI 266846	UK	Hap-4	AI
	I-1-3496	PI 272564	Hungary	Hap-4	AI
	Assyrian Rye	PI 29447	Ukraine	Hap-4	AI
	2939	PI 306548	Romania	Hap-4	AI
	WIR 42758	PI 349052	Azerbaijan	Hap-4	AI
	T-742	PI 352487	Germany	Hap-4	AI
	Mirabella	PI 352488	Italy	Hap-4	AI
	T-1515	PI 352489	Cyprus	Hap-4	AI
	42-1	PI 384265	Ethiopia	Hap-4	AI
	Maik	PI 585015	China	Hap-4	AI
	-	IU035200	Netherlands	Hap-4	AI
	Chrysosperhum	UA0300219	Syrian	Hap-4	AI
<i>Triticum turgidum</i> L.	Coles Selection	CItr 13712	USA	Hap-3	AII
	R70	CItr 14445	Ethiopia		AI
	CI 7688	CItr 7688	Russian	Hap-3	AII
	H 33 A 12729	PI 191579	Portugal		AI
	Zerdakia	PI 208912	Iraq		AI
	Seyed Zia	PI 210372	Iran		AI
	1024-1	PI 211705	Turkey	Hap-3	AII
	Halcon	PI 213571	Argentina		AI
	Gandum	PI 220356	Afghanistan	Hap-3	AII
	Centigramun	PI 221422	Serbia	Hap-3	AII
	Yellow Jarash	PI 223173	Jordan		AI
	Bufala Nera	PI 264954	Italy		AI
	504	PI 264991	Greece		AI
	94	PI 266851	UK		AI

Вид	Название образца (сорта)	ID	Страна	Гаплотип	Гаплогруппа
	I-1-2274	PI 272496	Hungary		AI
	Dalmatia 4	PI 278596	Croatia	Hap-3	AI
	Dziwo	PI 286075	Poland		AI
	CI 3119	PI 28655	Spain		AI
	Blagunzi	PI 295011	Bulgaria		AI
	2960	PI 306561	Romania		AI
	1584a	PI 32039	China		AI
	-	PI 323440	Austria		AI
	412-IV/65	PI 345413	BAG		AI
	Mauri	PI 347135	Afghanistan		AI
	778-VII/17	PI 350154	Macedonia		AI

PI, CIt – образцы из National Plant Germplasm System (NPGS, <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs>)

UA – образцы из National Centre for Plant Genetic Resources of Ukraine (yuriev1908@gmail.com)

**Приложение 7. Результаты ПЦР *in silico* с парой праймеров durum_Ag5del_F2 /
durum_Ag5del_R2**

Анализируемые образцы

Вид	Образец (NCBI ID)
<i>T. urartu</i>	AB745571, AB745570, AB745569, AB745568, AB745567, AB745566, AB745565, AB745564, AB745563, AB745562, AB745561, AB745560, AB745559, AB745558, AB745557, AB745556, AB745555, AB745554, AB745553, AB745552, AB745551, AB745550, AB745549, AB745548, AB745547, AB745546, AB745545, AB745544, AB745543, AB745542, AB745541, AB745540, AB745539, AB745538, AB745537, AB745536, AB745535
<i>T. monococcum</i>	AB745534, AB745533, AB745532, AB745531, AB745530, AB745529, AB745528, AB745527, AB745526
<i>T. dicoccoides</i>	AB746329, AB745581, AB745580, AB745579, AB745578, AB745577, AB745576, AB691807, AB691827, AB691828, AB691829, AB691830, AB691831, AB691824, AB691823, AB691821, AB691820, AB691818, AB691817, AB691816, AB691815, AB691813, AB691811, AB691812, AB691814, AB691819, AB691822, AB691825, AB691810, AB691809, AB691808, KF834263, KF834262, AB746330
<i>T. turgidum</i>	AB745587, AB745584, AB745583, AB745582, AB745574, AB691786, AB691869, AB691870, AB691868, AB691866, AB691867, AB745588, AB691865, AB691864, AB691859, AB691860, AB691861, AB691858, AB691862, AB691863, AB691857, AB691850, AB691851, AB691852, AB691853, AB691854, AB691855, AB691856, AB691849, AB691847, AB691848, AB691846, AB691845, AB691843, AB691844, AB745585, AB745586, AB691842, AB691841, AB691840, AB691839, AB691833, AB691834, AB691835, AB691836, AB691837, AB691832, AB691826, AB691805, AB691838, AB691785, AB691782, AB691783, AB691784, AB691801, AB691802, AB691803, AB691804, AB691806, EU117148, EU117147
<i>T. timopheevii</i>	AB745525, AB745524, AB745523, AB745522, AB745521, AB745520, AB745513, AB745510, AB745519, AB745518, AB745517, AB745516, AB745515, AB745514, AB745512, AB745511

Вид	Образец (NCBI ID)
<i>T. durum</i>	AB691934, AB691935, AB691924, AB691927, AB691929, AB691936, AB691937, AB691926, AB691923, AB691930, AB691925, AB691928, AB691931, AB691932, AB691933, AB691922, AB691919, AB691913, AB691914, AB691911, AB691904, AB691901, AB691896, AB691892, AB691893, AB691887, AB691877, AB691878, AB691881, AB691882, AB691897, AB691900, AB691876, AB691875, AB691874, AB691872, AB691871, AB691873, AB691915, AB691920, AB691879, AB691880, AB691883, AB691884, AB691885, AB691886, AB691888, AB691889, AB691890, AB691891, AB691894, AB691895, AB691898, AB691899, AB691902, AB691903, AB693038, AB691916, AB691918, AB691921, AB691917, AB691906, AB691905, AB691907, AB691908, AB691909, AB691910, AB691912, KF834264, KF758437
<i>T. carthlicum</i>	AB691791, AB691787, AB691788, AB691789, AB691790
<i>T. ispahanicum</i>	AB745572, AB745573
<i>T. polonicum</i>	AB691799, AB691800
<i>T. turanicum</i>	AB691795, AB691797, AB691798, AB691792, AB691793, AB691794, AB691796
<i>T. aestivum</i>	AB646972, DQ885753
<i>T. sphaerococcum</i>	KF834266
<i>T. spelta</i>	KF834265
<i>T. compactum</i>	KF834261

Частоты встречаемости фрагментов виртуальной ПЦР

1. 452 bp.(230) - 92.74% 
2. 453 bp.(9) - 3.63% 
3. 456 bp.(9) - 3.63% 

Идентификация *in silico* ампликонов в различных видах пшеницы

Вид (количество образцов)	Длина ампликона (количество)
<i>T. dicoccoides</i> (34)	452 (33) - 97.06%
	453 (1) - 2.94%
<i>T. turgidum</i> (61)	452 (61) - 100%
<i>T. urartu</i> (37)	452 (37) - 100%
<i>T. monococcum</i> (9)	456 (9) - 100%
<i>T. timopheevii</i> (16)	452 (8) - 50%
	453 (8) - 50%
<i>T. aestivum</i> (2)	452 (2) - 100%
<i>T. durum</i> (70)	452 (70) - 100%
<i>T. carthlicum</i> (5)	452 (5) - 100%
<i>T. ispahanicum</i> (2)	452 (2) - 100%
<i>T. polonicum</i> (2)	452 (2) - 100%
<i>T. turanicum</i> (7)	452 (7) - 100%
<i>T. sphaerococcum</i> (1)	452 (1) - 100%
<i>T. spelta</i> (1)	452 (1) - 100%

Вид (количество образцов)	Длина ампликона (количество)
<i>T. compactum</i> (1)	452 (1) - 100%

Гаплотипы *ppd-A1b*

Гаплотип	Комбинация аллелей
Нар-1	21T-54C-60T-130C-149C-172C-180G-254G-258C-315G-317C-329C-341C
Нар-2	21T-54C-60T-130T-149C-172C-180G-254G-258T-315G-317C-329C-341C
Нар-3	21T-54C-60T-130C-149C-172C-180G-254C-258C-315G-317T-329C-341C
Нар-4	21T-54C-60T-130C-149C-172G-180G-254G-258T-315G-317C-329C-341C
Нар-5	21T-54C-60T-130C-149C-172C-180G-254G-258T-315C-317C-329C-341C
Нар-6	21T-54C-60T-130C-149C-172C-180G-254G-258C-315G-317T-329C-341C
Нар-7	21T-54C-60T-130C-149C-172C-180G-254G-258T-315G-317C-329C-341C
Нар-8	21T-54C-60C-130C-149C-172C-180G-254G-258T-315G-317C-329C-341C
Нар-9	21T-54C-60C-130C-149T-172C-180G-254G-258T-315G-317C-329C-341C
Нар-10	21T-54T-60C-130C-149C-172C-180G-254G-258T-315G-317C-329C-341C
Нар-11	21C-54C-60T-130T-149C-172C-180G-254G-258T-315G-317C-329C-341C
Нар-12	21T-54C-60T-130C-149C-172C-180C-254G-258C-315G-317C-329C-341C
Нар-13	21T-54C-60T-130C-149C-172C-180G-254G-258C-315G-317C-329A-341T

Идентификация гаплотипов по данным *in silico* ПЦР (могут быть использованы в качестве референсных).

Гаплотип	Образец (NCBI ID)
Нар-1	AB746329, AB745581, AB745580, AB745576, AB646972, AB691841, AB691840, AB691839, AB691826, AB691818, DQ885753, KF834266, KF834265, KF834261
Нар-2	AB745587, AB745513, AB691846, AB691845, AB691843, AB691844, AB745572, AB745573, AB745585, AB745586, AB691842
Нар-3	AB745584, AB691807, AB691876, AB691857, AB691850, AB691851, AB691852, AB691853, AB691854, AB691855, AB691856, AB691849, AB691827, AB691828, AB691829, AB691830, AB691831, AB691833, AB691834, AB691835, AB691836, AB691837, AB691832, KF834262
Нар-4	AB745583, AB745582, AB745574, AB691934, AB691935, AB691924, AB691927, AB691929, AB691936, AB691937, AB691926, AB691923, AB691930, AB691925, AB691928, AB691931, AB691932, AB691933, AB691922, AB691919, AB691791, AB691913, AB691914, AB691911, AB691786, AB691904, AB691901, AB691896, AB691887, AB691877, AB691878, AB691881, AB691882, AB691897, AB691900, AB691875, AB691872, AB691871, AB691869, AB691870, AB691868, AB691866, AB691867, AB745588, AB691865, AB691864, AB691859, AB691860, AB691861, AB691873, AB691858, AB691862, AB691863, AB691847, AB691848, AB691824, AB691811, AB691812, AB691814, AB691819, AB691822, AB691825, AB691915, AB691920, AB691810, AB691809, AB691808, AB691805, AB691799, AB691795, AB691797, AB691798, AB691838, AB691879, AB691880, AB691883, AB691884, AB691885, AB691886, AB691888, AB691889, AB691890, AB691891, AB691894, AB691895, AB691898, AB691899, AB691902, AB691903, AB693038, AB691792, AB691793, AB691794, AB691796, AB691800, AB691916, AB691918, AB691921, AB691917, AB691787, AB691788, AB691789, AB691790, AB691906, AB691785, AB691782, AB691783, AB691784, AB691801, AB691802, AB691803, AB691804, AB691806, AB691905, AB691907, AB691908, AB691909, AB691910, AB691912, EU117148, EU117147, KF758437
Нар-5	AB745579, AB691815
Нар-6	AB745578, AB745520, AB745510, AB691823, AB691821, AB691820, AB691813

Гаплотип	Образец (NCBI ID)
Нар-7	AB745577, AB691816
Нар-8	AB745571, AB745570, AB745569, AB745568, AB745567, AB745566, AB745565, AB745564, AB745563, AB745562, AB745561, AB745560, AB745559, AB745558, AB745557, AB745556, AB745555, AB745554, AB745553, AB745552, AB745551, AB745550, AB745549, AB745548, AB745538, AB745537, AB745536, AB745535
Нар-9	AB745547, AB745546, AB745545
Нар-10	AB745544, AB745543, AB745542, AB745541, AB745540, AB745539
Нар-11	AB745525, AB745524, AB745523, AB745522, AB745521
Нар-12	AB691892, AB691893, AB691874, KF834264
Нар-13	AB691817, KF834263

Частоты встречаемости гаплотипов

Гаплотип	Частота (количество образцов)
Нар-1	6.09% (14)
Нар-2	4.78% (11)
Нар-3	10.43% (24)
Нар-4	53.04% (122)
Нар-5	0.87% (2)
Нар-6	3.04% (7)
Нар-7	0.87% (2)
Нар-8	12.17% (28)
Нар-9	1.3% (3)
Нар-10	2.61% (6)
Нар-11	2.17% (5)
Нар-12	1.74% (4)
Нар-13	0.87% (2)

Приложение 8. Распространение гаплогрупп *Ppd-A1b*

Географическое распространение гаплогрупп *Ppd-A1b* в образцах проанализированных в настоящем исследовании

Страна	Гаплогруппа AI	Гаплогруппа AII
Afghanistan	2	1
Argentina	3	-
Armenia	2	1
Asia Minor	1	1
Australia	1	-
Austria	4	-
Azerbaijan	1	-
BAG	1	-
Belgium	1	2
Bulgaria	1	2
Canada	2	-
Chile	-	1
China	5	3
Croatia	-	1
Cyprus	1	-
Denmark	2	-
Egypt	1	-
Ethiopia	3	-
France	-	1
FSU	2	1
Georgia	2	-
Germany	7	1
Greece	2	-
Hungary	5	2
India	2	5
Iran	4	1
Iraq	2	1
Israel	1	1
Italy	7	-
Japan	1	-
Jordan	3	-
Kazakhstan	1	-
Kyrgyzstan	1	-
Lebanon	1	-
Macedonia	1	-
Mexico	-	1
Morocco	1	-
Netherlands	1	-
Pakistan	-	4
Palestine	1	-
Poland	1	2
Portugal	6	2
Romania	4	-
Russian	5	1

Страна	Гаплогруппа AI	Гаплогруппа AII
SCG	2	-
Serbia	1	1
South Africa	-	1
Spain	6	-
Sweden	2	1
Switzerland	4	1
Syria	2	2
Tajikistan	-	1
Tunisia	1	-
Turkey	4	1
UK	5	2
Ukraine	13	13
USA	4	8

Распространение гаплогрупп *Ppd-A1b* в полиплоидной пшенице

Плоидность пшеницы	AI	AII
Гексаплоидная	47	51
Тетраплоидная	89	15

Географическое распространение гаплогрупп *Ppd-A1b* (обобщенные данные с результатами *in silico* ПЦР)

Страна	Гаплогруппа AI	Гаплогруппа AII
Afghanistan	3	2
Algeria	1	-
Argentina	3	-
Armenia	5	1
Asia Minor	1	1
Australia	1	-
Austria	4	-
Azerbaijan	3	-
BAG	1	1
Belarus	1	-
Belgium	1	2
Bulgaria	2	2
Canada	2	-
Chile	-	1
China	5	4
Croatia	-	1
Cyprus	3	-
Czech Republic	1	-
Denmark	3	1
Egypt	6	-
Eritrea	1	-
Ethiopia	24	3
Former Yugoslavia	1	1
France	1	2
FSU	2	3
Georgia	6	-
Germany	8	1
Greece	7	-
Hungary	7	2
India	6	8
Iran	19	1
Iraq	9	2
Israel	6	8
Italy	13	-
Japan	1	-
Jordan	6	-
Kazakhstan	1	-
Kyrgyzstan	1	-
Lebanon	6	-
Libya	1	-
Macedonia	1	2
Malta	1	-
Mexico	-	1
Moldova	1	-
Morocco	3	-
Netherlands	1	-
Oman	2	1
Pakistan	1	4

Страна	Гаплогруппа АІ	Гаплогруппа АІІ
Palestine	1	2
Poland	3	2
Portugal	8	3
Romania	5	1
Russian	8	1
Saudi Arabia	1	1
SCG	2	2
Serbia	1	2
South Africa	-	1
Spain	14	-
Sweden	2	1
Switzerland	5	1
Syria	2	4
Tajikistan	-	1
Tunisia	3	-
Turkey	18	8
UK	6	2
Ukraine	13	14
USA	4	8

Приложение 9. Частоты ампликонов участка промотора и экзона-1 гена *PPD-B1* в различных видах полиплоидной пшеницы, по результатам *in silico* ПЦР с парой праймеров TaPpd-B1proF1–TaPpd-B1int1R1

Вид	Частота ампликонов	Вид	Частота ампликонов
<i>T. aestivum</i> (10)	1292 п.н. (9) - 90% 1600 п.н. (1) - 10%	<i>T. polonicum</i> (2)	1292 п.н. (1) - 50% 1319 п.н. (1) - 50%
<i>T. carthlicum</i> (5)	1292 п.н. (4) - 80% 1319 п.н. (1) - 20%	<i>T. turanicum</i> (7)	1292 п.н. (2) - 28.57% 1295 п.н. (1) - 14.29% 1319 п.н. (4) - 57.14%
<i>T. dicoccoides</i> (19)	1101 п.н. (1) - 5.26% 1292 п.н. (13) - 68.42% 1295 п.н. (1) - 5.26% 1309 п.н. (1) - 5.26% 1316 п.н. (1) - 5.26% 1319 п.н. (2) - 10.53%	<i>T. turgidum</i> (9)	1292 п.н. (9) - 100%
<i>T. durum</i> (69)	0 (1) - 1.45% 1292 п.н. (35) - 50.72% 1295 п.н. (4) - 5.8% 1316 п.н. (5) - 7.25% 1319 п.н. (24) - 34.78%	<i>T. dicocum</i> (45)	1086 п.н. (4) - 8.89% 1282 п.н. (1) - 2.22% 1291 п.н. (1) - 2.22% 1292 п.н. (37) - 82.22% 1319 п.н. (2) - 4.44%

Приложение 10. Идентификация гаплотипов и гаплогруппы гена *PPD-B1* в тетраплоидной пшенице

ПЦР-анализ с парой праймеров TaPpd-B1proF1 и TaPpd-B1int1R1

Вид	ID	Длина ампликона (п.н.)	Гаплогруппа
<i>T. dicoccum</i>	PI 190920, PI 190921, PI 191091, PI 276015, UA0300183, UA0300013, UA0300003, UA0300082, UA0300027, UA0300083, UA0300212, UA0300214	1292	VI
<i>T. dicoccoides</i>	PI 233288, PI 352323, PI 352325, PI 428018	1292	VI
	PI 272582	1309	VI
	PI 256029, PI 266841, PI 352322, PI 362036, UA0300256	1319	VI
<i>T. durum</i>	PI 466941	1101	VI
	PI 94733, PI 94710, PI 94721, PI 94720, PI 94692, PI 8898, PI 81792, PI 88737, C1tr 10024, C1tr 15280, C1tr 15278	1292	VI
	PI 94732, PI 94722, PI 94729, PI 94578, PI 94705, PI 79900, PI 74830, PI 7653, PI 655432, C1tr 15100, C1tr 15274	1319	VI

PI, C1tr – образцы из National Plant Germplasm System (NPGS, <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs>)

UA – образцы из National Centre for Plant Genetic Resources of Ukraine (yuriev1908@gmail.com)

ПЦР-анализ с парой праймеров TaPpd-B1proinF1 и 206bp_del_25_R1

Вид	ID	Длина ампликона (п.н.)	Гаплогруппа
<i>T. carthlicum</i>	PI 115817, PI 168672, PI 182471, PI 190949, PI 272521, PI 283887, PI 286070, PI 341800, PI 349040, PI 352279, PI 532502, PI 532505, PI 532512	874	VI
<i>T. polonicum</i>	PI 134945, PI 167622, PI 185309, PI 208911, PI 223171, PI 306548, PI 352487, PI 352489, PI 384265, PI 585015, UA0300219	874	VI
	PI 210845, PI 245663, PI 254214, PI 266846, PI 272564, PI 29447, PI 349052, PI 352488, IU035200	898	VI

<i>T. turgidum</i>	Citr 13712, Citr 7688, PI 191579, PI 208912, PI 210372, PI 211705, PI 213571, PI 220356, PI 221422, PI 223173, PI 264954, PI 266851, PI 272496, PI 278596, PI 286075, PI 28655, PI 306561, PI 32039, PI 323440, PI 345413, PI 347135, PI 350154	874	BI
	Citr 14445, PI 264991, PI 295011	898	BII

Приложение 11. Аллельные варианты генов *VRN-A1* и *VRN-B1* идентифицированные в различных видах полиплоидной пшеницы

Аллели генов *VRN-A1* и *VRN-B1* идентифицированные в гексаплоидной пшенице

Вид	Название образца (сорта)	ID	Страна	<i>VRN-A1</i> аллель	<i>VRN-B1</i> аллель (вариант последовательности промотора)
<i>Triticum</i>	23824	PI 115818	India	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
<i>sphaerococcum</i>	52	CItr 8610	China	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
Percival.	S-49	PI 182118	Pakistan	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	2531	PI 190982	Belgium	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Sahari M.3	PI 191301	Portugal	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	I-1-3572	PI 272580	Hungary	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c (VRN-B1.f)</i>
	Acarp	PI 277142	India	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	971	PI 278650	UK	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	219	PI 70711	Iraq	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	I12	PI 83402	China	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	-	PI 324492	India	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Type No. 4	PI 40941	Pakistan	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	125	PI 42013	India	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	S 2130	PI 277141	Germany	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	CI 12212	PI 168685	USA	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	CI 17737	CItr 17737	USA	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Rubriglabrum	UA0300243	Pakistan	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Tumidum	UA0300244	India	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
<i>Triticum</i>	Gluclub	PI 114638	Australia	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>Vrn-B1a (VRN-B1.f)</i>
<i>compactum</i>	PS 1785-847	PI 186391	China	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
Host.	Velino	PI 157920	Italy	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>

	Ostka Skomoroska	PI 129523	Poland	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Spitskop	PI 159101	South Africa	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a (VRN-B1.f)</i>
	Kanak	PI 164160	India	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>Vrn-B1a (VRN-B1.f)</i>
	H 23 H 13385	PI 191542	Portugal	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	1413-1	PI 211701	Turkey	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Aleppo 23	PI 278541	Syria	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a (VRN-B1.f)</i>
	Kozha Bidai	PI 262666	Kazakhstan	<i>vrn-A1,</i> <i>Vrn-A1b.6</i>	<i>Vrn-B1a (VRN-B1.f)</i>
	Premier	PI 278581	UK	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Bivona	PI 294567	USA	<i>Vrn-A1a.1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Herrison Sans Barbe	PI 294892	Bulgaria	<i>Vrn-A1a.1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Rouge de la Gruyere	PI 352298	Switzerland	<i>Vrn-A1a.2</i>	<i>Vrn-B1a (VRN-B1.f)</i>
	Tiroler Fruhe Binkel	PI 352302	Austria	<i>Vrn-A1a.2</i>	<i>Vrn-B1a (VRN-B1.f)</i>
	Ble D'Avril	PI 352306	France	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	DN-2263	PI 361807	Denmark	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	W44A	PI 410652	Pakistan	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a (VRN-B1.f)</i>
	134	PI 436279	Chile	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Termok	PI 41023	Kyrgyzstan	<i>vrn-A1,</i> <i>Vrn-A1b.6</i>	<i>Vrn-B1a (VRN-B1.f)</i>
	Erinaccum	UA0300240	Armenia	<i>Vrn-A1a.2</i>	<i>Vrn-B1a (VRN-B1.f)</i>
	Grizeoicterinum	UA0300245	USA	<i>Vrn-A1a.1</i>	<i>Vrn-B1a (VRN-B1.f)</i>
<i>Triticum spelta</i> L.	Duhamelianum,	UA0300103	Australia	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Frankenkorn				
	Duhamelianum, NSS	UA0300259	Serbia	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	1/02				
	Album, NSS 1/01	UA0300246	Serbia	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c (VRN-B1.f)</i>
	Caeruleum, Tridentina	UA0300218	Italy	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Album	UA0300304	Australia	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>Vrn-B1c (VRN-B1.f)</i>
	Bearded Spelt	PI 168680	USA	<i>vrn-A1b.3</i>	<i>Vrn-B1c (VRN-B1.f)</i>
	Lignee 10	PI 190960	Belgium	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	2670	PI 190962	Italy	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>Vrn-B1c (VRN-B1.f)</i>

	Spelta Hohenheim	PI 190963	Portugal	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Album	PI 221419	Serbia	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>Vrn-B1c (VRN-B1.f)</i>
	85	PI 225271	Iran	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	I-1-599	PI 272573	Hungary	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>Vrn-B1c (VRN-B1.f)</i>
	Stauderers Markus	PI 286048	Germany	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Gruzia	PI 295056	Bulgaria	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	2943	PI 306550	Romania	<i>vrn-A1b.3</i>	<i>Vrn-B1c (VRN-B1.f)</i>
	-	PI 323438	Austria	<i>vrn-A1b.3</i>	<i>Vrn-B1c (VRN-B1.f)</i>
	Coeruleum	PI 330558	UK	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Altgold	PI 347850	Switzerland	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	69Z6.602	PI 348428	Spain	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	26867-302Y-300M-OY	PI 520066	Mexico	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	WIR 52470	PI 572914	Tajikistan	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (Vrn-B1f)</i>
	Altgold	PI 355629	Switzerland	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Babenhauser Rotvesen	PI 355633	Germany	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	69Z6.884	PI 348700	Spain	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
<i>Triticum</i>	I-1-2710	PI 272554	Hungary	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
<i>macha</i> Dekapr.	Letshchumicum	PI 352466	FSU	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	69Z5.190	PI 355511	Russia	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	69Z5.193	PI 355514	Switzerland	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	DN-2378	PI 361862	Denmark	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	G532	PI 428146	Sweden	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	G866	PI 428178	Italy	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>Vrn-B1c (VRN-B1.f)</i>
	G1569	PI 428179	Iran	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	H86-708	PI 542466	USA	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	WIR 29576	PI 572905	Georgia	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
<i>Triticum</i>	WIR 29533	PI 326319	Armenia	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
<i>vavilovii</i>	-	PI 428342	Sweden	<i>vrn-A1b.3</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
Jakubz.	-	PI 428343	Sweden	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>

Аллели генов *VRN1* идентифицированные в тетраплоидной пшенице

Вид	Название образца (сорта)	ID	Страна	<i>VRN-A1</i> аллель	<i>VRN-B1</i> аллель (вариант промотора)
<i>Triticum carthlicum</i> Nevski.	11891	PI 115817	Georgia	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1ins</i>
	-	PI 168672	China	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	3772	PI 190949	Portugal	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1ins</i>
	I-1-2715	PI 272521	Hungary	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1ins</i>
	CPI 2679	PI 283887	Iran	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1ins</i>
	-	PI 286070	Poland	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1ins</i>
	WIR 32510	PI 341800	Russia	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1ins</i>
	WIR 13810	PI 349040	Armenia	<i>Vrn-A1e</i>	<i>Vrn-B1ins</i>
	T-1513	PI 352279	FSU	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1ins</i>
	H83-1579	PI 532502	USA	<i>Vrn-A1e</i>	<i>Vrn-B1ins</i>
	H83-1538	PI 532505	Canada	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1ins</i>
	H84-558-3	PI 532512	UK	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1ins</i>
<i>Triticum dicoccoides</i> Körn.	-	PI 233288	Israel	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>vrn-B1, Vrn-B1c (VRN-B1.f, VRN-B1.s)</i>
	DS-9	PI 256029	Spain	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	84	PI 266841	UK	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	I-1-2708	PI 272582	Hungary	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>Vrn-B1c (VRN-B1.f)</i>
	Vavilovii	PI 352322	Lebanon	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>Vrn-B1c (VRN-B1.m)</i>
	Kotschyi	PI 352323	Asia Minor	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Spontaneo villosum	PI 352325	Switzerland	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Spontaneo villosum	PI 352326	Germany	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>Vrn-B1c (VRN-B1.f)</i>
	Pseudogord	PI 362036	Romania	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>Vrn-B1c (VRN-B1.f)</i>
	G2041	PI 428018	Turkey	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	A-54	PI 466941	Syria	<i>vrn-A1b.4</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.m)</i>
	Namuricum	UA0300256	Jordan	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
<i>Triticum dicoccum</i> Schrank.	2323A	PI 190920	Portugal	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	2467	PI 190921	Belgium	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Escanda de Malvedo	PI 191091	Spain	<i>Vrn-A1a.3</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>

Вид	Название образца (сорта)	ID	Страна	VRN-A1 аллель	VRN-B1 аллель (вариант промотора)
	119	PI 276015	Spain	<i>Vrn-A1a.3</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Serbicum	UA0300183	Russian	<i>Vrn-A1a.1</i>	<i>Vrn-B1c (VRN-B1.f)</i>
	-	UA0300013	Syrian	<i>Vrn-A1a.1</i>	<i>Vrn-B1c (VRN-B1.f)</i>
	-	UA0300003	Germany	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	-	UA0300082	Germany	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Aeruginosum	UA0300027	Russian	<i>Vrn-A1e</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Pychurum	UA0300083	Germany	<i>Vrn-A1b.2</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Unimiegei	UA0300212	Morocco	<i>Vrn-A1b.5</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Atratum	UA0300214	USA	<i>vrn-A1b.3</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
<i>Triticum</i>	452	PI 94732	Italy	<i>Vrn-A1b.1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
<i>durum</i> Desf.	454	PI 94733	Ethiopia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	409	PI 94710	FSU	<i>Vrn-A1c</i>	<i>Vrn-B1a (VRN-B1.f)</i>
	434	PI 94722	Asia Minor	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	429	PI 94721	Portugal	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	427	PI 94720	Spain	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Melanopus 69	PI 94729	Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	424	PI 94578	Egypt	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	394	PI 94705	Palestine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Khandwa	PI 8898	India	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Marching No. 8	PI 81792	Japan	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	N-85	PI 79900	China	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	-	PI 88737	Greece	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	2912	PI 74830	China	<i>Vrn-A1i</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Abd-el-Kader	PI 7653	Tunisia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	OR2010539	PI 655432	USA	<i>vrn-A1b.3</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Mongolian	CItr 10024	USA	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Vallega Zittelli 486	CItr 15100	Italy	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Wascana	CItr 15280	Canada	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Royal de Almena	CItr 15278	Argentina	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Hazera 1203	CItr 15274	Israel	<i>Vrn-A1b.1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
<i>Triticum</i>	Martinari	PI 134945	Portugal	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>

Вид	Название образца (сорта)	ID	Страна	VRN-A1 аллель	VRN-B1 аллель (вариант промотора)
<i>polonicum</i> L.	Mika	PI 167622	Turkey	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Polonicum	PI 185309	Argentina	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Sin El-Pheel	PI 208911	Iraq	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	7959	PI 210845	Iran	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Tafeelih Riti	PI 223171	Jordan	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	3002	PI 245663	Afghanistan	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	2719	PI 254214	India	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	88	PI 266846	UK	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	I-1-3496	PI 272564	Hungary	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Assyrian Rye	PI 29447	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	2939	PI 306548	Romania	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	WIR 42758	PI 349052	Azerbaijan	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	T-742	PI 352487	Germany	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Mirabella	PI 352488	Italy	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	T-1515	PI 352489	Cyprus	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	42-1	PI 384265	Ethiopia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	-	IU035200	Netherlands	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
Chrysosperhum	UA0300219	Syria	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 VRN-B1.f)</i>	
<i>Triticum turgidum</i> L.	Coles Selection	CItr 13712	USA	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	R70	CItr 14445	Ethiopia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	CI 7688	CItr 7688	Russia	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	H 33 A 12729	PI 191579	Portugal	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Zerdakia	PI 208912	Iraq	<i>Vrn-A1i</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Seyed Zia	PI 210372	Iran	<i>vrn-A1b.3</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	1024-1	PI 211705	Turkey	<i>Vrn-A1i</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Halcon	PI 213571	Argentina	<i>Vrn-A1b.1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Gandum	PI 220356	Afghanistan	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Centigramun	PI 221422	Serbia	<i>Vrn-A1i</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Yellow Jarash	PI 223173	Jordan	<i>vrn-A1b.3</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Bufala Nera	PI 264954	Italy	<i>Vrn-A1b.1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	504	PI 264991	Greece	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>

Вид	Название образца (сорта)	ID	Страна	VRN-A1 аллель	VRN-B1 аллель (вариант промотора)
	94	PI 266851	UK	<i>vrn-A1b.3</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	I-1-2274	PI 272496	Hungary	<i>vrn-A1b.3</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Dalmatia 4	PI 278596	Croatia	<i>vrn-A1b.3</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	Dziwo	PI 286075	Poland	<i>vrn-A1b.3</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	CI 3119	PI 28655	Spain	<i>Vrn-A1c</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Blagunzi	PI 295011	Bulgaria	<i>vrn-A1b.3</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	2960	PI 306561	Romania	<i>vrn-A1b.3</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	1584a	PI 32039	China	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	-	PI 323440	Austria	<i>Vrn-A1b.1</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	412-IV/65	PI 345413	BAG	<i>vrn-A1b.3</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.s)</i>
	Mauri	PI 347135	Afghanistan	<i>Vrn-A1i</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>
	778-VII/17	PI 350154	Macedonia	<i>vrn-A1b.3</i>	<i>vrn-B1 (VRN-B1.f)</i>

PI, CItr – образцы из National Plant Germplasm System (NPGS, <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs>)

UA – образцы из National Centre for Plant Genetic Resources of Ukraine (yuriev1908@gmail.com)

**Приложение 12. ДНК-маркерный анализ аллельного состояния гена *VRN-D1* в
пяти видах гексаплоидной пшеницы**

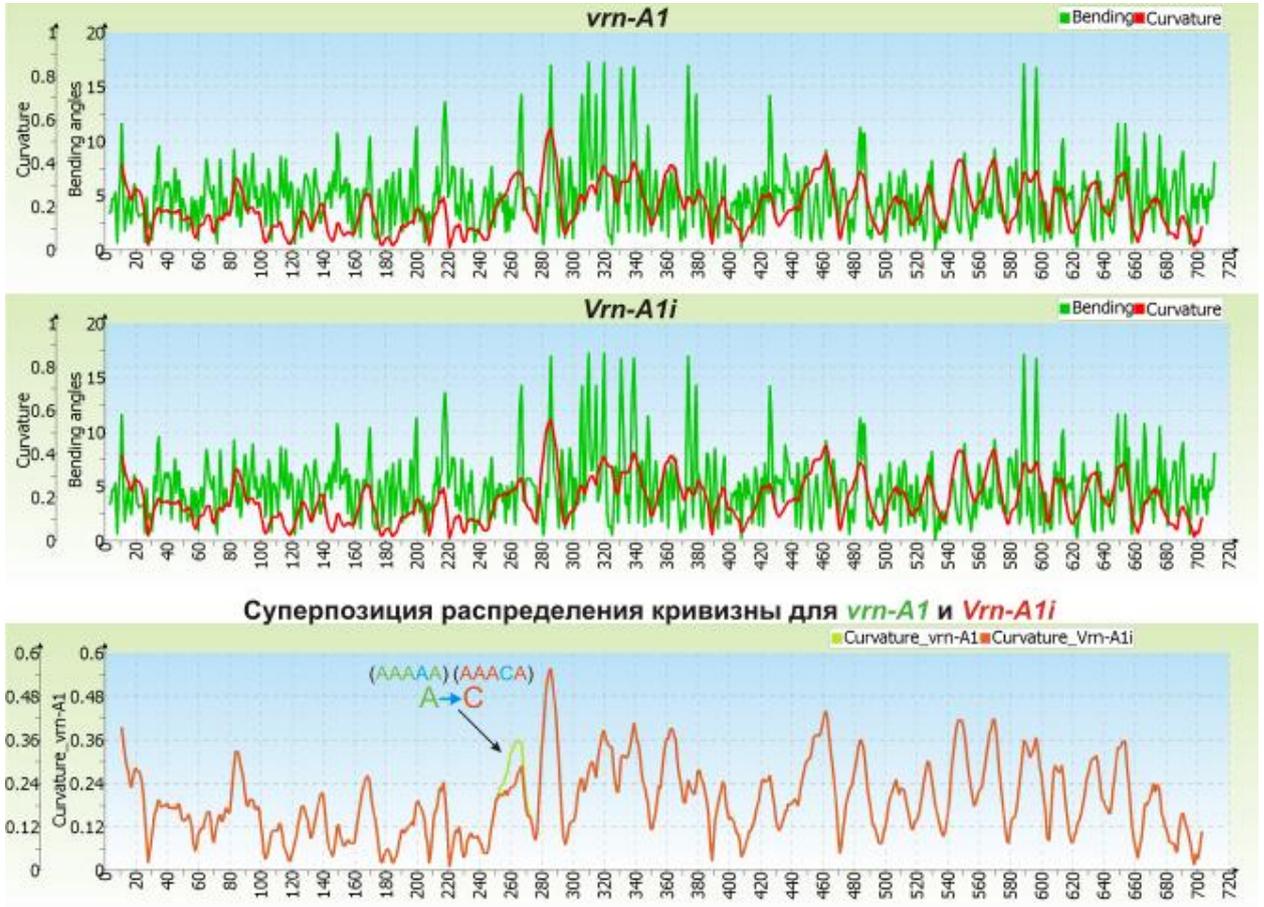
Вид	Название образца (сорта)	ID	Страна	Аллель <i>Vrn-D1</i>
<i>Triticum</i>	23824	PI 115818	India	<i>vrn-D1</i>
<i>sphaerococcum</i>	52	CItr 8610	China	<i>Vrn-D1a</i>
Percival	S-49	PI 182118	Pakistan	<i>vrn-D1</i>
	2531	PI 190982	Belgium	<i>vrn-D1</i>
	Sahari M.3	PI 191301	Portugal	<i>vrn-D1</i>
	I-1-3572	PI 272580	Hungary	<i>vrn-D1</i>
	Acarp	PI 277142	India	<i>vrn-D1</i>
	971	PI 278650	UK	<i>vrn-D1</i>
	219	PI 70711	Iraq	<i>vrn-D1</i>
	I12	PI 83402	China	<i>Vrn-D1a</i>
	-	PI 324492	India	<i>vrn-D1</i>
	Type No. 4	PI 40941	Pakistan	<i>vrn-D1</i>
	125	PI 42013	India	<i>vrn-D1</i>
	S 2130	PI 277141	Germany	<i>vrn-D1</i>
	CI 12212	PI 168685	USA	<i>vrn-D1</i>
	CI 17737	CItr 17737	USA	<i>vrn-D1</i>
		UA030024		<i>vrn-D1</i>
	Rubriglabrum	3	Pakistan	
		UA030024		<i>vrn-D1</i>
	Tumidum	4	India	
<i>Triticum</i>	Glclub	PI 114638	Australia	<i>vrn-D1</i>
<i>compactum</i>	PS 1785-847	PI 186391	China	<i>Vrn-D1a</i>
Host	Velino	PI 157920	Italy	<i>vrn-D1</i>
	Ostka Skomoroska	PI 129523	Poland	<i>vrn-D1</i>
			South	<i>vrn-D1</i>
	Spitskop	PI 159101	Africa	
	Kanak	PI 164160	India	<i>vrn-D1</i>
	H 23 H 13385	PI 191542	Portugal	<i>vrn-D1</i>
	1413-1	PI 211701	Turkey	<i>Vrn-D1s</i>
	Aleppo 23	PI 278541	Syria	<i>vrn-D1</i>
	Kozha Bidai	PI 262666	Kazakhstan	<i>Vrn-D1a</i>
	Premier	PI 278581	UK	<i>vrn-D1</i>
	Bivona	PI 294567	USA	<i>vrn-D1</i>
	Herrison Sans Barbe	PI 294892	Bulgaria	<i>vrn-D1</i>
	Rouge de la Gruyere	PI 352298	Switzerland	<i>vrn-D1</i>
	Tiroler Fruhe Binkel	PI 352302	Austria	<i>vrn-D1</i>
	Ble D'Avril	PI 352306	France	<i>vrn-D1</i>
	DN-2263	PI 361807	Denmark	<i>vrn-D1</i>
	W44A	PI 410652	Pakistan	<i>vrn-D1</i>
	134	PI 436279	Chile	<i>vrn-D1</i>
	Termok	PI 41023	Kyrgyzstan	<i>Vrn-D1a</i>
		UA030024		<i>vrn-D1</i>
	Erinaccum	0	Armenia	
		UA030024		<i>vrn-D1</i>
	Grizeoicterinum	5	USA	

Вид	Название образца (сорта)	ID	Страна	Аллель <i>Vrn-D1</i>	
<i>Triticum spelta</i> L	Duhamelianum, Frankenkorn	UA030010 3	Australia	<i>vrn-D1</i>	
	Duhamelianum, NSS 1/02	UA030025 9	Serbia	<i>vrn-D1</i>	
	Album, NSS 1/01	UA030024 6	Serbia	<i>vrn-D1</i>	
	Caeruleum, Tridentina	UA030021 8	Italy	<i>Vrn-D1a</i>	
	Album	UA030030 4	Australia	<i>vrn-D1</i>	
	Bearded Spelt	PI 168680	USA	<i>vrn-D1</i>	
	Lignee 10	PI 190960	Belgium	<i>vrn-D1</i>	
	2670	PI 190962	Italy	<i>vrn-D1</i>	
	Spelta Hohenheim	PI 190963	Portugal	<i>vrn-D1</i>	
	Album	PI 221419	Serbia	<i>vrn-D1</i>	
	85	PI 225271	Iran	<i>vrn-D1</i>	
	I-1-599	PI 272573	Hungary	<i>vrn-D1</i>	
	Stauderers Markus	PI 286048	Germany	<i>vrn-D1</i>	
	Gruzia	PI 295056	Bulgaria	<i>vrn-D1</i>	
	2943	PI 306550	Romania	<i>vrn-D1</i>	
	-	PI 323438	Austria	<i>vrn-D1</i>	
	Coeruleum	PI 330558	UK	<i>Vrn-D1s</i>	
	Altgold	PI 347850	Switzerland	<i>vrn-D1</i>	
	69Z6.602	PI 348428	Spain	<i>Vrn-D1s</i>	
	26867-302Y-300M-OY	PI 520066	Mexico	<i>Vrn-D1a</i>	
	WIR 52470	PI 572914	Tajikistan	<i>vrn-D1</i>	
	Altgold	PI 355629	Switzerland	<i>vrn-D1</i>	
	Babenhauser Rotvesen	PI 355633	Germany	<i>vrn-D1</i>	
	69Z6.884	PI 348700	Spain	<i>Vrn-D1s</i>	
	<i>Triticum macha</i> Dekapr	I-1-2710	PI 272554	Hungary	<i>vrn-D1</i>
		Letshchumicum	PI 352466	FSU	<i>vrn-D1</i>
		69Z5.190	PI 355511	Russian	<i>vrn-D1</i>
69Z5.193		PI 355514	Switzerland	<i>vrn-D1</i>	
DN-2378		PI 361862	Denmark	<i>vrn-D1</i>	
G532		PI 428146	Sweden	<i>vrn-D1</i>	
G866		PI 428178	Italy	<i>vrn-D1</i>	
G1569		PI 428179	Iran	<i>vrn-D1</i>	
H86-708		PI 542466	USA	<i>vrn-D1</i>	
WIR 29576		PI 572905	Georgia	<i>vrn-D1</i>	
<i>Triticum vavilovii</i> Jakubz	WIR 29533	PI 326319	Armenia	<i>vrn-D1</i>	
	-	PI 428342	Sweden	<i>vrn-D1</i>	
	-	PI 428343	Sweden	<i>vrn-D1</i>	

PI, CIt – образцы из National Plant Germplasm System (NPGS, <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs>)

UA – образцы из National Centre for Plant Genetic Resources of Ukraine (yuriev1908@gmail.com)

Приложение 13. Распределение кривизны и локальных углов изгиба в молекулах ДНК фрагментов ПЦР с парой праймеров VRN1AF/VRN1-INT1R аллелей *vrn-A1* и *Vrn-A1i*



Приложение 14. Распространение гаплотипов экзона-4 и экзона-7 гена *VRN-A1* в образцах полиплоидной пшеницы, несущих различные аллели этого гена

Вид	ID (сорт)	Аллель <i>VRN-A1</i>	Гаплотип экзона-4 <i>VRN-A1</i>	Гаплотип экзона-7 <i>VRN-A1</i>
<i>Triticum diccoides</i> Körn.	PI 352325, PI 428018	<i>vrn-A1</i>	Ex4C.s	Ex7C
	PI 352322, UA0300256	<i>vrn-A1</i>	Ex4C.f	Ex7C
	PI 233288, PI 256029, PI 266841, PI 272582, PI 362036	<i>Vrn-A1b.2</i>	Ex4C.s	Ex7C
	PI 466941	<i>vrn-A1b.4</i>	Ex4C.s	Ex7C
<i>Triticum dicoccum</i> Schrank.	UA0300183, UA0300013	<i>Vrn-A1a.1</i>	Ex4C.f	Ex7C
	PI 191091, PI 276015	<i>Vrn-A1k</i>	Ex4C.s	Ex7C
	PI 190920, PI 190921, UA0300003, UA0300082, UA0300083	<i>Vrn-A1b.2</i>	Ex4C.s	Ex7C
	UA0300214	<i>vrn-A1b.3</i>	Ex4C.s	Ex7C
	UA0300212	<i>Vrn-A1b.5</i>	Ex4C.s	Ex7C
	UA0300027	<i>Vrn-A1e</i>	Ex4C.f	Ex7C
<i>Triticum turgidum</i> L.	PI 264991	<i>vrn-A1</i>	Ex4C.s	Ex7C
	PI 213571, PI 264954	<i>Vrn-A1b.1</i>	Ex4C.s	Ex7C
	CItr 7688, PI 191579, PI 220356, PI 32039	<i>Vrn-A1b.6</i>	Ex4C.s	Ex7C
	PI 223173, PI 266851, PI 272496, PI 278596, PI 306561, PI 345413, PI 350154	<i>vrn-A1b.3</i>	Ex4C.s	Ex7C
	CItr 14445	<i>Vrn-A1c</i> (Langdon)	Ex4C.s	Ex7C
	PI 208912, PI 211705, PI 221422, PI 347135	<i>Vrn-A1i</i>	Ex4C.f	Ex7C
<i>Triticum polonicum</i> L.	PI 134945, PI 185309, PI 208911, PI 223171, PI 254214	<i>Vrn-A1b.6</i>	Ex4C.s	Ex7C
	PI 210845, PI 245663, PI 266846, PI 29447, PI 306548, PI 349052, PI 352487, PI 352488	<i>Vrn-A1c</i> (Langdon)	Ex4C.s	Ex7C
<i>Triticum carthlicum</i> Nevski.	PI 115817, PI 190949, PI 272521, PI 283887, PI 352279, PI 532505, PI 532512	<i>vrn-A1</i>	Ex4C.s	Ex7C
	PI 349040, PI 532502	<i>Vrn-A1e</i>	Ex4C.f	Ex7C
<i>Triticum durum</i> Desf.	PI 94732, CItr 15274	<i>Vrn-A1b.1</i>	Ex4C.s	Ex7C
	CItr 10024	<i>Vrn-A1b.6</i>	Ex4C.s	Ex7C
	PI 655432	<i>vrn-A1b.3</i>	Ex4C.s	Ex7C
	PI 94733, PI 94710, PI 94721, PI 94720, PI 94578, PI 81792, CItr 15280, CItr 15278	<i>Vrn-A1c</i> (Langdon)	Ex4C.s	Ex7C
	PI 74830	<i>Vrn-A1i</i>	Ex4C.f	Ex7C
<i>Triticum sphaerococcum</i> Percival	PI 191301, PI 40941, PI 42013, PI 277141, PI 168685, CItr 17737	<i>vrn-A1</i>	Ex4C.s	Ex7C
	PI 190982, PI 278650	<i>vrn-A1</i>	Ex4C.m	Ex7C/T
	PI 277142, PI 70711, PI 324492	<i>vrn-A1</i>	Ex4C.sph/4T	Ex7C/T

Вид	ID (сорт)	Аллель <i>VRN-A1</i>	Гаплотип экзона-4 <i>VRN-A1</i>	Гаплотип экзона-7 <i>VRN-A1</i>
<i>Triticum macha</i> Dekapr	PI 272554, PI 352466, PI 355511, PI 355514, PI 428146, PI 428179, PI 542466, PI 572905 PI 428178	<i>vrn-A1</i> <i>Vrn-A1b.2</i>	Ex4C.m/4T Ex4C.s	Ex7T Ex7C
<i>Triticum spelta</i> L.	UA0300246 UA0300103, UA0300259, PI 190960, PI 225271, PI 286048, PI 295056, PI 347850 PI 520066 UA0300218, UA0300304, PI 272573, PI 330558, PI 348428, PI 348700	<i>vrn-A1</i> <i>vrn-A1</i> <i>Vrn-A1b.6</i> <i>Vrn-A1b.2</i>	Ex4C.f Ex4C.m/4T Ex4C.s Ex4C.s	Ex7C Ex7T Ex7C Ex7C
<i>Triticum compactum</i> Host	PI 186391, PI 157920, PI 129523, PI 211701, PI 278541, PI 278581, PI 352306 PI 294567, PI 294892, UA0300245 PI 352298, PI 352302, UA0300240 PI 191542, PI 436279 PI 262666, PI 41023	<i>vrn-A1</i> <i>Vrn-A1a.1</i> <i>Vrn-A1a.2</i> <i>Vrn-A1b.6</i> <i>Vrn-A1j</i>	Ex4C.m/4T Ex4C.f Ex4C.f Ex4C.s Ex4C.m/4T	Ex7T Ex7C Ex7C Ex7C Ex7T
<i>Triticum aestivum</i> L.	TRI 867, TRI 4560 TRI 834, TRI 1948 TRI 3088 TRI 290 TRI 1712, TRI 3534, TRI 4078, TRI 4739, TRI 5395, TRI 950, TRI 2979, TRI 3891, TRI 5310, TRI 5394, TRI 5423, TRI 7120, TRI 8459, TRI 11031, Filatovka, Biiskaya, Bagrationovka, Kulundinka, Novosibirskaya 51, Novosibirskaya 32, Novosibirskaya 9, Grom, Novosibirskaya 3, Novosibirskaya 40 TRI 3838	<i>vrn-A1</i> <i>vrn-A1</i> <i>vrn-A1</i> <i>vrn-A1</i> <i>vrn-A1</i> <i>Vrn-A1b.6</i>	Ex4C.s Ex4C.m Ex4C.f Ex4T Ex4C.m/4T Ex4C.s	Ex7C Ex7T Ex7C Ex7T Ex7T Ex7C

PI, CIt – образцы из National Plant Germplasm System (NPGS, <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs>)

TRI – образцы из ИПК Gatersleben (https://gbis.ipk-gatersleben.de/GBIS_I/home.jsf)

UA – образцы из National Centre for Plant Genetic Resources of Ukraine
(yuriev1908@gmail.com)

Приложение 15. Аллельные варианты генов *VRN-A1*, *VRN-B1* и *VRN-B3* в сортах твердой пшеницы *Triticum durum*

№	Сорт	ID	Страна	Аллель <i>VRN-A1</i>	Гаплотип <i>VRN-B1</i>	Аллель <i>VRN-B1</i>	Аллель <i>VRN-B3</i>
1	Kharkovskaya 13	UA0200660	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
2	Kharkovskaya 15	UA0200661	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
3	Kharkovskaya 17	UA0200662	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
4	Kollektivnaya 1	UA0200663	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
5	Kollektivnaya 2	UA0200664	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
6	Kharkovskaya 21	UA0200888	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
7	Kharkovskaya 32	UA0201233	Ukraine	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
8	Kharkovskaya 23	UA0201041	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
9	Kharkovskaya 25	UA0201222	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-B3a</i>
10	Kharkovskaya 27	UA0201223	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
11	Kharkovskaya 29	UA0201224	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
12	Kharkovskaya 31	UA0201227	Ukraine	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
13	Kharkovskaya 33	UA0201210	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
14	Kharkovskaya 39	UA0201032	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
15	Kharkovskaya 41	UA0201033	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
16	Kharkivska 43	UA0201034	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-B3a</i>
17	Pributkova	UA0201343	Ukraine	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
18	Chornokoloska 46	UA0201344	Ukraine	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
19	Tur	UA0201339	Ukraine	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
20	Kharkivska 45	UA0201029	Ukraine	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
21	Spadshina	UA0201075	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
22	Kuchumovka	UA0200781	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
23	Nashadok	UA0201214	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
24	Afina	UA0201363	Ukraine	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
25	Makar	UA0201362	Ukraine	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
26	Dinastiya	UA0201436	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
27	Narodnaya	UA0200018	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
28	Kharkovskaya 46	UA0200047	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
29	Kharkovskaya 51	UA0200063	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
30	Kharkovskaya 1	UA0201239	Ukraine	<i>vrn-A1b.3</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
31	Kharkovchanka 1	UA0200154	Ukraine	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-B3a</i>
32	Kharkovskaya 3	UA0200269	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
33	Kharkovskaya 9	UA0200471	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
34	Kharkovskaya 37	UA0200522	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
35	Kharkovskaya 5	UA0200523	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
36	Gordeiforme 3	UA0201232	Ukraine	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
37	Gordeiforme 802	UA0200534	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
38	Gumillo	UA0200243	Italy	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
39	Trems	UA0200646	Portugal	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.s</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
40	Tbilisuri 9	UA0200677	Georgia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
41	Shirvan 3	UA0201316	Azerbaijan	<i>Vrn-A1i</i>	<i>VRN-B1.s</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
42	Arnautka	UA0200528	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
43	Mourisco Ruivo	UA0200026	Portugal	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
44	Preto De Tavira	UA0200121	Portugal	<i>Vrn-A1b.1</i>	<i>VRN-B1.s</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
45	Marzaga	UA0200492	Portugal	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>

№	Сорт	ID	Страна	Аллель <i>VRN-A1</i>	Гаплотип <i>VRN-B1</i>	Аллель <i>VRN-B1</i>	Аллель <i>VRN-B3</i>
46	Langdon Des 3B	UA0201160	USA	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
47	Langdon Des 3A	UA0201177	USA	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
48	Mestnaya	UA0200793	Yemen	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
49	Kharkovskaya 19	UA0200764	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
50	Novodonskaya	UA0200831	Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.s</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
51	Voronezhskaya 7	UA0200887	Russia	<i>Vrn-A1a.1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-B3a</i>
52	Metiska	UA0201386	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
53	Donskaya Elegiya	UA0201408	Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
54	Neodur	UA0201208	France	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
55	Linkor	UA0201389	Ukraine	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1.s</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
56	Kreiser	UA0201390	Ukraine	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
57	Aisberg Odesski	UA0201247	Ukraine	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1.s</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
58	Zenati 368	UA0200079	Algeria	<i>Vrn-A1b.1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
59	Maliani 2A	UA0200096	Italy	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
60	Wells	UA0200058	USA	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
61	Jizel	UA0200361	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
62	Izolda	UA0200943	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
63	Prikrasa	UA0201424	Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
64	Beloturka	UA0200136	Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.s</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
65	Maliani 1	UA0200091	Italy	<i>Vrn-A1b.1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
66	Gerardo 2106	UA0200100	Italy	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
67	Ardor	UA0200975	France	<i>Vrn-A1b.1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
68	Brindur	UA0200974	France	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
69	Megadur	UA0200964	France	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
70	Pandur	UA0201251	Romania	<i>vrn-A1</i>	<i>VRN-B1.s</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
71	Merliuli	UA0200701	Georgia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
72	Berekesh	UA0200694	Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.s</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
73	Shirvan 5	UA0200668	Azerbaijan	<i>Vrn-A1i</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
74	GK Basa	UA0200579	Hungary	<i>Vrn-A1i</i>	<i>VRN-B1.s</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
75	Saodat	UA0200578	Tajikistan	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.s</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
76	Altaika		Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
77	Hordeiforme 53		Russia	<i>Vrn-A1a.1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
78	Altaiski yantar		Russia	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
79	Altaiskaya niva		Russia	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
80	Zarnica Altaiskaya		Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
81	Salut Altaya		Russia	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
82	Aleiskaya		Russia	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
83	Hordeiforme 10		Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
84	Omskaya yantarnaya		Russia	<i>Vrn-A1a.1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
85	Angel		Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
86	Omski korund		Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
87	Omski kristall		Russia	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
88	Omskaya stepnaya Orenburgskaya		Russia	<i>Vrn-A1a.1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
89	celinnaya		Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
90	Orenburgskaya 21		Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
91	Orenburgskaya 10		Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
92	Bezenchukskaya 200		Russia	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
93	Bezenchukskaya 202		Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>

№	Сорт	ID	Страна	Аллель <i>VRN-A1</i>	Гаплотип <i>VRN-B1</i>	Аллель <i>VRN-B1</i>	Аллель <i>VRN-B3</i>
94	Bezenchukskaya 205		Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
95	Pamyati Chehovicha		Russia	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
96	Marina		Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.s</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
97	Elizavetinskaya		Russia	<i>Vrn-A1a.1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-B3a</i>
98	Zolotaya volna		Russia	<i>Vrn-A1a.1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
99	Nikolasha		Russia	<i>Vrn-A1a.1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
100	Hordeiforme 553		Russia	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
101	Hordeiforme 561		Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
102	Bashkirskaya 27		Russia	<i>Vrn-A1a.1</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
103	Voronejskaya 9		Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-B3a</i>
104	Voronejskaya 11		Russia	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>Vrn-B3a</i>
105	Donskaya Elegiya		Ukraine	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
106	Kargala 28		Kazakhstan	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
107	Kargala 24		Kazakhstan	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
108	Kargala 303		Kazakhstan	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
109	Kustanaiskaya 1		Kazakhstan	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
110	Kustanaiskaya 28		Kazakhstan	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
111	Radur		Germany	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
112	Firat 1	K 59378	Turkey	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
113	Medora	K 61095	Canada	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
114	Stewart		Canada	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
115	Stewart 63		Canada	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
116	Alrabo		USA	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
117	Avonlea		USA	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-B3</i>
118	Dilse		USA	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
119	Grand d'oro		USA	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
120	Zebsock		USA	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
121	Montran		USA	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
122	Pierce		USA	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
123	Prima d'oro		USA	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
124	M-16219		Russia	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
125	Kargala 66		Kazakhstan	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
126	Kargala 1412		Kazakhstan	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
127	Kargala 1514		Kazakhstan	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
128	Sharifa		Kazakhstan	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>
129	Hordeiforme 950/99		Kazakhstan	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.s</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
130	Lavina		Kazakhstan	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
131	Damsinskaya ubileinaya		Kazakhstan	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-B3a</i>
132	Shortandinskaya 256		Kazakhstan	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-B3</i>
133	Hordeiforme 18567-6		Kazakhstan	<i>Vrn-A1b.6</i>	<i>VRN-B1.m</i>	<i>vrn-B1*</i>	<i>vrn-B3</i>
134	Hordeiforme 18585-2		Kazakhstan	<i>Vrn-A1c</i>	<i>VRN-B1.f</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-B3</i>

UA – образцы из National Centre for Plant Genetic Resources of Ukraine
(yuriev1908@gmail.com)