

*На правах рукописи*

**Щербань  
Андрей Борисович**

**ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ  
АЛЛОПОЛИПЛОИДНЫХ ГЕНОМОВ ЗЛАКОВ**

03.02.07 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Новосибирск – 2017

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

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор  
**Салина Елена Артемовна**

Официальные  
оппоненты:

**Потокина Елена Кирилловна**

доктор биологических наук, главный научный сотрудник, зав. лабораторией мониторинга генетической эрозии растительных ресурсов, ФГБНУ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И.Вавилова», г. Санкт-Петербург

**Константинов Юрий Михайлович**

доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, зав. лабораторией генетической инженерии растений ФГБНУ «Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН», г. Иркутск

**Карлов Геннадий Ильич**

член-корреспондент РАН, профессор, доктор биологических наук, Врио директора ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», г. Москва

Ведущая  
организация:

ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, г. Москва

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, ученой степени доктора наук в ИЦиГ СО РАН в конференц-зале по адресу: 630090 г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 10, тел. (383) 363-49-06, факс: (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

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

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Семейство злаки (Poaceae) включает в себя большинство хозяйственно-ценных видов растений, относящихся к хлебным зерновым культурам, таким как пшеница, рожь, рис, кукуруза, овес, сорго и другие (Цвелев, 1976). Подавляющее большинство этих культур- аллополиплоиды, возникшие в результате объединения двух и более различных геномов в одном ядре. Первой зерновой культурой, геном которой был полностью расшифрован, является рис, *Oryza sativa* L.,- палеополлиплоид, имеющий сравнительно небольшой геном -  $0.38 \times 10^9$  пн (Goff et al., 2002). Геном другой важнейшей зерновой культуры - гексаплоидной, или мягкой пшеницы, *Triticum aestivum* L. (BBAADD,  $2n=6x=42$ ) составляет  $17.3 \times 10^9$  пн, что ~в 43 раза превышает размер генома риса (Brenchley et al., 2012). Международный консорциум по секвенированию генома пшеницы (IWGSC) к 2017 году практически завершил расшифровку генома *T. aestivum* (<http://www.wheatgenome.org/>).

В природе образование аллополиплоида чаще всего происходит в результате слияния нередуцированных гамет диплоидных видов (Chen and Ni, 2006). После этого в процессе формирования аллополиплоидного вида можно выделить две стадии эволюционного развития (Feldman and Levi, 2009). На ранней стадии, в течение нескольких поколений после скрещивания, преимущественным направлением является предотвращение спаривания гомеологичных хромосом (парных хромосом родительских видов) в ходе мейоза, которое приводит к разного рода хромосомным аномалиям, значительно снижающим фертильность аллополиплоида (Griffiths et al., 2006; Ozkan and Feldman, 2009). На последующей стадии диплоидизации происходит постепенный переход от полиплоидного состояния к диплоидному, связанный с редукцией избыточного генетического материала и структурно-функциональной дивергенцией генов- гомеологов в сторону их суб- или неофункционализации (Chaudhary et al., 2009).

Выяснение механизмов реорганизации аллополиплоидного генома связано с изучением эволюции его отдельных структурно-функциональных компонентов. В ранних работах использовался метод оценки скорости реассоциации ДНК для выделения различных классов геномной ДНК, различающихся по степени повторности (Britten and Kohne, 1968):

1) Повторяющиеся последовательности ДНК (ПП ДНК) составляют у растений до 90–95 % ядерной ДНК (Flavell et al., 1974; Paux et al., 2006). Преобладающая часть ПП ДНК не кодирует каких-либо продуктов, значимых для клетки или организма. Эта часть включает многочисленные семейства рассеянных по геному мобильных элементов (МЭ), в первую очередь, ретротранспозонов, содержащих LTR- длинные концевые повторы (Flavell et al., 1992; Kumar and Bennetzen, 1999; Sabot and Schulman, 2006). МЭ могут кодировать белки, необходимые для их собственного размножения в геноме. Другой тип ПП ДНК представлен некодирующими tandemными повторами различной длины (сателлитная ДНК), которые образуют гетерохроматиновые блоки хромосом (Heslop-Harrison, 2000). Наиболее важное функциональное значение имеют tandemные повторы, кодирующие компоненты белок- синтезирующего аппарата: рибосомальную РНК (рРНК), транспортную РНК (тРНК) и др. Изменения ПП ДНК под действием аллополиплоидизации включают активацию ограниченного числа МЭ (Charles et al., 2008; Petit et al., 2010), количественные изменения сателлитных повторов (Salina et al., 2004), супрессию части генов рРНК (Chen et al., 1998), однако, до настоящей работы все эти изменения были слабо изучены.

2) Уникальные или низкокопийные кодирующие последовательности ДНК составляют наименьшую часть растительного генома- 1-5% (Schmidt, Heslop-Harrison, 1998). Среди них можно выделить гены «домашнего хозяйства», включающие также предыдущие кодирующие ПП ДНК. Другая обширная группа- специализированные гены, контролирующие специфические функции клеток тех или иных тканей. Особый теоретический и практический интерес представляют регуляторные гены, вносящие существенный вклад в адаптацию аллополиплоидов. Одним из таких генов у злаков является ген *VRN-1*, контролирующий переход в стадию колошения в ответ на предварительное воздействие низкой температурой- яровизацию (Murai et al., 2003; Yan et al., 2003). Все три гомеологичные копии *VRN-1* у мягкой пшеницы являются функциональными и каждая из них может определять чувствительные и нечувствительные к яровизации формы (озимые и яровые, соответственно) (Yan et al., 2004; Fu et al., 2005). Однако, до настоящей работы были не ясны особенности регуляции и дивергенции гомеологичных локусов *VRN-1* на

различных стадиях эволюции: от диплоидных до аллополиплоидных видов пшеницы.

**Цель и задачи исследования.** Цель настоящего исследования заключалась в установлении особенностей реорганизации трех компонентов генома в процессе образования и эволюции аллополиплоидных форм злаков: 1) МЭ класса LTR ретротранспозонов; 2) тандемных ПП ДНК, включая гены «домашнего хозяйства», кодирующие рРНК; 3) значимых для адаптации специализированных генов на примере гена *VRN-1*.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ структурной организации отдельных семейств LTR-ретротранспозонов в составе геномов различных естественных аллополиплоидов сем. Злаки и их диплоидных предшественников:
  - у аллотетраплоидных и диплоидных видов комплекса *Oryza officinalis* риса;.
  - у мягкой пшеницы, *T. aestivum*.
2. С помощью модели синтетических аллополиплоидов (амфиплоидов) пшеницы изучить возможные структурные и количественные изменения сателлитных ПП ДНК, а также генов рРНК, характеризующихся специфическими особенностями экспрессии на ранних стадиях аллополиплоидизации.
3. Провести анализ структурно-функциональной дивергенции гомеологичных генов *VRN-1* в ходе эволюции аллополиплоидных форм пшеницы.
  - изучить изменения в структуре регуляторных районов *VRN-1*, влияющие на экспрессию этого гена и его фенотипическое проявление;
  - разработать систему ПЦР- маркеров, позволяющую провести комплексную оценку структурно- функциональной дивергенции *VRN-1* локусов в ходе эволюции видов пшеницы различного уровня плоидности.
4. Изучить происхождение различных гомеоаллелей *VRN-1* в ходе эволюции первых тетраплоидных видов пшеницы и их диплоидных предшественников. Оценить роль аллополиплоидизации в формировании этих аллелей и их комбинаций, определяющих разнообразие яровых форм мягкой пшеницы, адаптированных к различным климатическим условиям.

**Научная новизна работы.** В настоящей работе получен ряд новых приоритетных результатов. Изучено участие различных по типу организации и функциональной

роли последовательностей геномной ДНК в процессе преобразования аллополиплоидного генома злаков.

Впервые показано сохранение специфической структурной организации отдельных семейств LTR- ретротранспозонов в составе субгеномов полиплоидных видов риса, а также мягкой пшеницы на протяжении прошедшего периода эволюции указанных полиплоидных видов.

Впервые установлено, что уже на ранних стадиях аллополиплоидизации происходят делеции неактивной части генов рРНК в одном из родительских геномов; при этом впервые показано, что эти изменения неслучайны и приводят к формированию той организации этих генов, которая сохраняется на протяжении длительного периода эволюции у аналогичных по геномному составу естественных аллополиплоидов.

С помощью почти-изогенных линий мягкой пшеницы, содержащих аллели *VRN-B1* гена с различающейся структурой первого интрона, впервые установлено влияние этого регуляторного района на транскрипцию *VRN-1* и, как следствие, срок колошения.

Впервые показано, что процесс аллополиплоидизации, сопровождаемый искусственным отбором яровых форм значительно ускорил формирование и распространение новых доминантных аллелей локусов *VRN-1* и их комбинаций (гаплотипов), оптимальных для тех или иных климатических условий и, во многом, обеспечивших широкое распространение полиплоидной пшеницы, в том числе, первых тетраплоидных ее форм и особенно гексаплоидной пшеницы *T. aestivum*.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные в данной работе результаты могут быть использованы: 1) в исследованиях, направленных на выяснение механизмов реорганизации аллополиплоидного генома с участием различных ПП ДНК, включая высоко-копийные МЭ, гены, кодирующие рРНК и др.; 2) для исследования молекулярных механизмов взаимодействия гомеологичных генов в составе аллополиплоидного генома; 3) для изучения влияния генов *VRN-1* на формирование типа развития растения и детерминацию срока колошения у аллополиплоидных форм злаков.

Помимо описанной теоретической значимости результаты работы имеют и большую практическую ценность для отбора форм пшеницы с заданными

комбинациями аллелей генов *VRN-1* с помощью разработанного соискателем комплекса аллель-специфичных ДНК-маркеров. Полученные результаты могут быть использованы как в селекционных программах, так и в образовательном процессе, а именно в лекциях курса «Теория селекции», читаемого бакалаврам 4-го курса ФЕН НГУ.

**Методология исследования.** Анализ структурной организации LTR-содержащего ретроэлемента в геномах риса комплекса *Officinalis* проводился с помощью выделения коротких фрагментов этого элемента из состава домена, кодирующего белок интегразу (INT). Эти фрагменты использовались для анализа первичной структуры, а также в качестве зонда для RFLP-анализа видов указанного комплекса. Анализ ВАС-клона мягкой пшеницы, содержащего специфичный для D-субгенома ретроэлемент проводился с помощью клонирования, секвенирования и последующего объединения фрагментов этого клона. Для изучения реорганизации последовательностей геномной ДНК, включая гены рРНК, у синтетических амфиплоидов пшеницы использовались методы ПЦР-анализа, флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), гибридизации по Саузерну. Анализ гомеологичных генов *VRN-1* в геномах различных видов пшеницы выполнялся с помощью ПЦР со специфическими праймерами, с последующим выделением ПЦР-фрагментов и их секвенированием.

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

- 1) Геном- специфичные особенности структурной организации семейств LTR ретротранспозонов, характерные для диплоидных видов злаков, в целом сохраняются при переходе на полиплоидный уровень организации генома.
- 2) На ранних стадиях аллополиплоидизации у злаков в одном из родительских геномов происходят количественные изменения локусов генов рРНК, отражающие особенности эволюции этих генов у аналогичных по геномному составу естественных аллополиплоидов.
- 3) Структурно- функциональная дивергенция гомеологичных генов *VRN-1* в ходе эволюции аллополиплоидов пшеницы сопровождалась изменениями в структуре основных регуляторных районов, в том числе, в 1-м интроне - изменениями, оказывающими влияние на уровень транскрипции гена *VRN-1* и его фенотипическое проявление (срок колошения).

4) Аллели и гаплотипы *VRN-1*, ассоциированные с яровыми формами полиплоидных видов пшеницы возникли независимо от диплоидных предшественников, начиная с первых тетраплоидных видов, и, в дальнейшем, распространились в ходе селекции в различных эколого-географических регионах.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены более чем на 30 различных российских и международных конференциях, в том числе, на Международной конференции «Современные проблемы генетики, радиобиологии, радиоэкологии и эволюции» (2005, Ереван), Международной конференции «Полиплоидия, Гетерозис и Эпигенетика» (2007, Пекин), Международной конференции "Хромосома 2009" (2009, Новосибирск), 19-м международном симпозиуме по картированию Triticeae (International Triticeae Mapping Initiative) (2009, Клермонт-Ферран), Международной конференции «Современная биотехнология сельско-хозяйственных растений и биобезопасность» (2010, Одесса), 15-й Международной конференции Европейского сообщества по анеуплоидам пшеницы (EWAC) (2011, Нови Сад), Международной конференции «Генетические ресурсы и геномика пшеницы» (2011, Новосибирск), 2-й Международной конференции «Генетика, геномика и биотехнология растений» (2012, Иркутск; 2015, Новосибирск), Международных конференциях «Полиплоидия, гибридизация и биоразнообразие» (2012, Пругонице; 2016, Ровинь), 12-м Международном симпозиуме по генетике пшеницы (2013, Йокогама), VI Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (2014, Ростов на Дону), Конгрессе Европейской ассоциации по исследованиям в области селекции растений (EUCARPIA, секция злаковых) (Вернигероде, 2014), 3-й Международной конференции «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (2015, Новосибирск), 10-й Международной конференции по биоинформатике, регуляции генома и структурной биологии (BGRS) (2016, Новосибирск).

**Личный вклад автора.** Автору принадлежат постановка цели и задач исследования, обработка, интерпретация и обобщение результатов. Молекулярно-генетическая часть выполнена автором самостоятельно, за исключением микроскопического анализа препаратов метафазных хромосом (выполнила И.Г. Адонина, ИЦиГ СО РАН) и анализа экспрессии генов 45S рРНК с помощью окрашивания хромосом серебром (выполнила Е. Д. Бадаева, ИОГен РАН).



**Публикации.** По результатам исследования опубликовано 26 статей в отечественных и зарубежных рецензируемых журналах и 19 статей в сборниках научных трудов.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Материал диссертации изложен на 335 страницах печатного текста, включая 14 таблиц и 58 рисунков. Список цитированной литературы содержит 593 работы.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Глава 1** является обзором литературы, в котором представлены данные о механизмах формирования и основных характеристиках аллополиплоидных растений, об основных компонентах растительного генома и особенностях их реорганизации в ходе аллополиплоидизации. Отдельный раздел посвящен системе генов, контролирующей время цветения у растений, в частности, у злаков и роли генов *VRN-1* в этой системе.

### Глава 2. Материалы и методы исследования

В работе использован следующий растительный материал: 1). Коллекция диплоидных ( $2n=2x=24$ , геномы BB\* и CC) и аллотетраплоидных ( $2n=4x=48$ , геномы BBCC и CCDD\*) видов риса комплекса *Oryza officinalis* из Национального института агробиологических ресурсов (Цукуба, Япония).

\*- геномы BB и DD риса не соответствуют аналогичным по обозначению геномам пшеницы.

2). Синтетические амфиплоиды *Triticum* x *Aegilops* поколений F<sub>1</sub> (S<sub>0</sub>), S<sub>1-4</sub> любезно предоставил Проф. M.Feldman (Институт Вейцмана, Израиль).

3). Изогенные линии мягкой пшеницы *T. aestivum*, созданные в лаборатории хромосомной инженерии ИЦиГ СО РАН на основе сорта «Безостая 1» и содержащие различные аллели *VRN-B1* гена (Efremova et al., 2011).

4). 245 европейских яровых сортов мягкой пшеницы из коллекции Федерального генбанка Института генетики и исследования культурных растений (IPK, Гатерслебен) и 90 Российских сортов из коллекции ИЦиГ СО РАН.

5). 129 образцов тетраплоидных видов пшеницы *T. dicoccoides* (BBAA), *T. araraticum* (GGAA) и *T. timopheevii* (GGAA) и 183 образца их диплоидных предшественников:

*T. monococcum* (AA), *T. boeoticum* (AA), *T. urartu* (AA) и *Ae. speltooides* (BB/GG) из коллекций ИПК (Гатерслебен, Германия), генбанка ICARDA (Сирия) и Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Вавилова (ВИР, Санкт-Петербург).

Геномную ДНК выделяли из 5-7 дневных проростков, или зеленых листьев растений, согласно методу Plaschke с соавт. (1995). Выделение ДНК ВАС-клонов и плазмид, обработку геномной ДНК эндонуклеазами рестрикции, электрофоретическое разделение фрагментов ДНК, гибридизацию по Саузерну, клонирование ДНК осуществляли в соответствии со стандартными методиками (Maniatis et al., 1982). Фрагментирование ДНК ВАС-клона с последующим субклонированием фрагментов ВАС-клона проводили с помощью неполного гидролиза ДНК эндонуклеазой рестрикции *Sau3A* и методов случайного фрагментирования (Sambrook et al., 1989; Surzycki, 2000).

Конструирование специфических праймеров, а также подбор условий для ПЦР проводили с помощью программы OLIGO (Rychlik and Rhoads, 1989). ПЦР осуществляли с использованием приборов: T-100™ Thermo cycler (BioRad, USA) и БИС-амплификатора (ИП Чалдин, Новосибирск). ПЦР- продукты, используемые в дальнейшем для клонирования или секвенирования, вырезали из геля и выделяли с помощью набора реагентов «БиоСилика» (Санкт-Петербург) или «MinElute gel extraction kit» (Qiagen, Германия). Секвенирующие реакции проводили с помощью набора для секвенирования «ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing ready reaction kit» (Perkin Elmer) с помощью универсальных pUC18/M13 прямого и обратного праймеров (в случае клонированных фрагментов ДНК), либо специфических праймеров (ПЦР-продукты). Продукты секвенирующих реакций анализировали в ЦКП СО РАН «Межинститутский центр секвенирования» на приборе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer). Нуклеотидные последовательности размещали в базах данных NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Database/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Database/)). Поиск гомологичных последовательностей проводили с использованием алгоритмов FASTA и BLAST в базах данных NCBI, GRAINGENE, TREP (<http://wheat.pw.usda.gov>) и REPBASE ([www.girinst.org](http://www.girinst.org)). Множественное выравнивание последовательностей и их кластерный анализ выполнялись с

помощью программ Clustal W и MEGA 3.1. при использовании алгоритмов UPGMA и Neighbor-Joining (NJ).

Получение препаратов метафазных хромосом, флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) и детекцию зондов на хромосомах осуществляли согласно ранее опубликованным методам (Salina et al., 2006).

Суммарную растительную РНК выделяли из листьев растений с использованием набора реагентов «Plant Rneasy Kit» (Qiagen) согласно методике производителя. кДНК синтезировали из 1 мкг суммарной РНК с помощью обратной транскрипции, используя олигонуклеотидную затравку (dT)<sub>15</sub> и набор реагентов «Omniscrypt Reverse Transcription kit» (Qiagen). Количественная ПЦР в реальном времени для каждого образца кДНК проводилась в трех повторностях. Реакцию проводили с помощью набора реагентов «QuantiTect SYBR Green Kit» (Qiagen) и системы «Applied Biosystems 7000 HT» согласно инструкции производителя. Анализ данных ПЦР в реальном времени проводился с использованием программы SDS 1.3. Для стандартизации количества кДНК матрицы проводилась количественная ПЦР с праймерами к референсному гену *Ubc*.

Время колошения различных образцов пшеницы определялось по 2-3-м повторным экспериментам. Семена растений высаживали в теплице ИЦиГ СО РАН, без яровизации, в условиях длинного светового дня (12 часов). Спустя три месяца после посадки, растительный материал оценивался как яровой (есть выколашивание), или озимый (колошение отсутствует). Для оценки статистической значимости различий по сроку колошения между образцами (генотипами) использовали критерий Стьюдента.

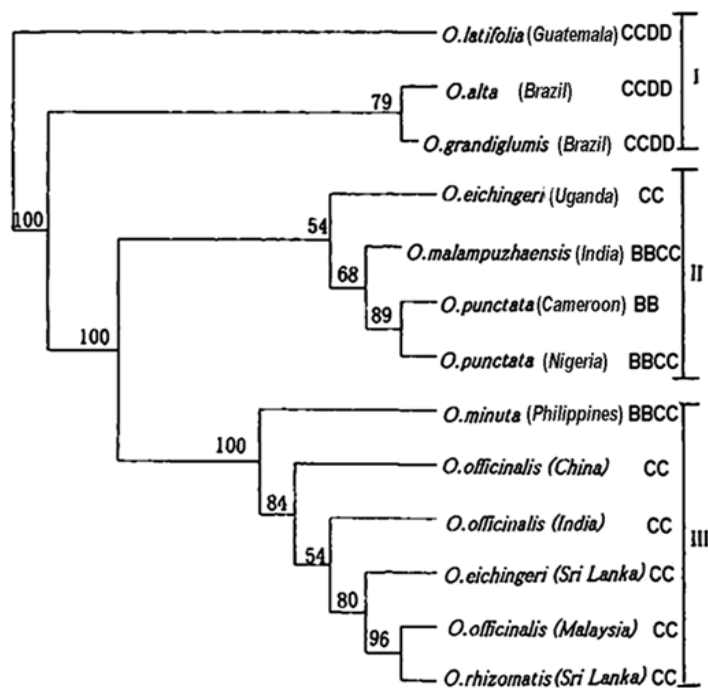
### **Глава 3. Результаты исследования**

#### **Глава 3.1. Сравнительный анализ организации LTR-ретротранспозонов в геномах полиплоидных видов злаков и их диплоидных предшественников**

##### **3.1.1. Анализ структурной организации ретроэлемента *gypsy* у полиплоидных и диплоидных видов риса комплекса *Oryza officinalis***

Из геномной ДНК вида *Oryza eichingeri* нами была выделена и клонирована ПП ДНК рOe49, которая, как показал RFLP-анализ, распространена среди всех диплоидных и полиплоидных видов комплекса *O. officinalis* (Shcherban et al., 2000). Число копий этой последовательности на гаплоидный геном варьирует в пределах  $10^4$ - $10^5$ . Анализ первичной структуры выявил ее гомологию к INT-домени *gypsy*-подобного ретроэлемента. Сконструированные специфические праймеры позволили амплифицировать и, в дальнейшем, клонировать данную последовательность из геномов всех видов комплекса (Shcherban et al., 2001). Наборы клонированных INT-последовательностей, полученные для каждого вида были секвенированы и проведен их сравнительный анализ с помощью алгоритма CLUSTAL. На основе этого анализа была построена NJ-дендрограмма комплекса, на которой можно выделить три больших кластера, соответствующих основным географическим районам распространения видов *O. officinalis*: Азия (III), Африка (II) и Южная Америка (I) (Рис. 1). Тетраплоидный *O. punctata* (BBCC; Африка) кластеризуется с

**Рис. 1** NJ- дендрограмма комплекса *O. officinalis* на основе анализа нуклеотидных последовательностей INT- домена *gypsy*-ретроэлемента. Указаны регионы происхождения видов (подвидов) и соответствующие геномы.



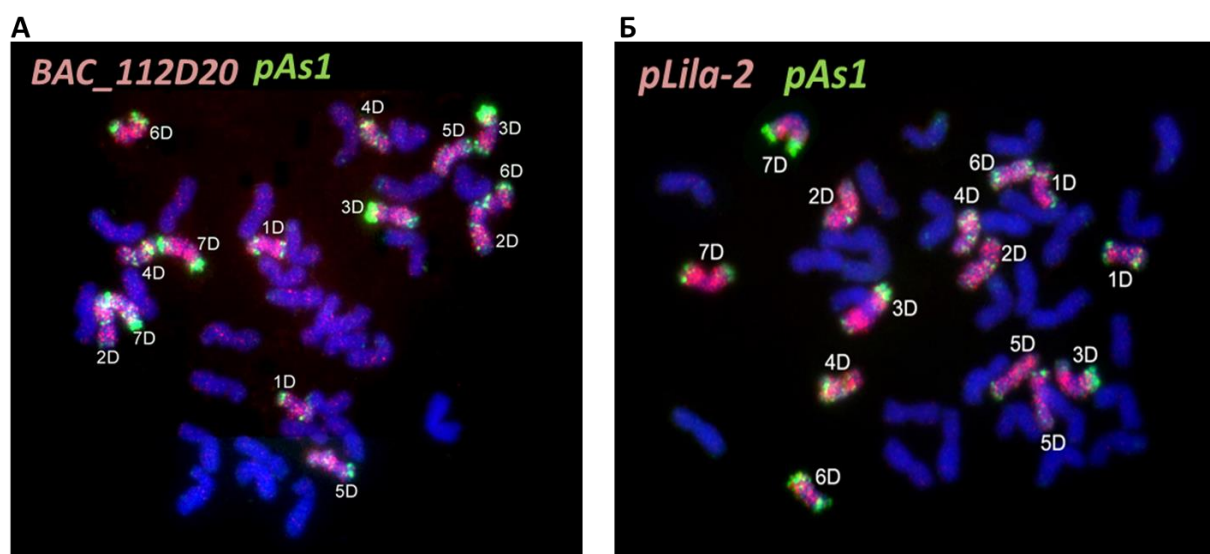
*officinalis* из Китая, с которой он также близок географически. Что касается южно-американской группы CCDD-аллотетраплоидов, то эта группа изолирована от

диплоидными видами *O. eichingeri* (CC) и *O. punctata* (BB) из того же региона, а также с тетраплоидным видом *O. malampuzhaensis* (BBCC) из Индии. С-геном последнего может иметь не азиатское (от диплоидного *O. officinalis*), а африканское происхождение - от соответствующей формы *O. eichingeri*. BBCC-тетраплоид *O. minuta* из Юго-Восточной Азии (Филиппины) объединяется в одном кластере с азиатскими диплоидными видами С-генома и наиболее близок к форме *O.*

остальных видов комплекса. В настоящее время возможные диплоидные предшественники этой группы не обнаружены. Наряду с представленной, была построена сходная дендрограмма на основе данных RFLP-анализа видов с использованием клонированной последовательности *pOe49* в качестве зонда (Shcherban et al., 2000). В целом, полученные результаты хорошо согласуются с эколого-географической (Vaughan et al., 1994) и генетической дифференциацией видов указанного комплекса (Zou et al. 2015).

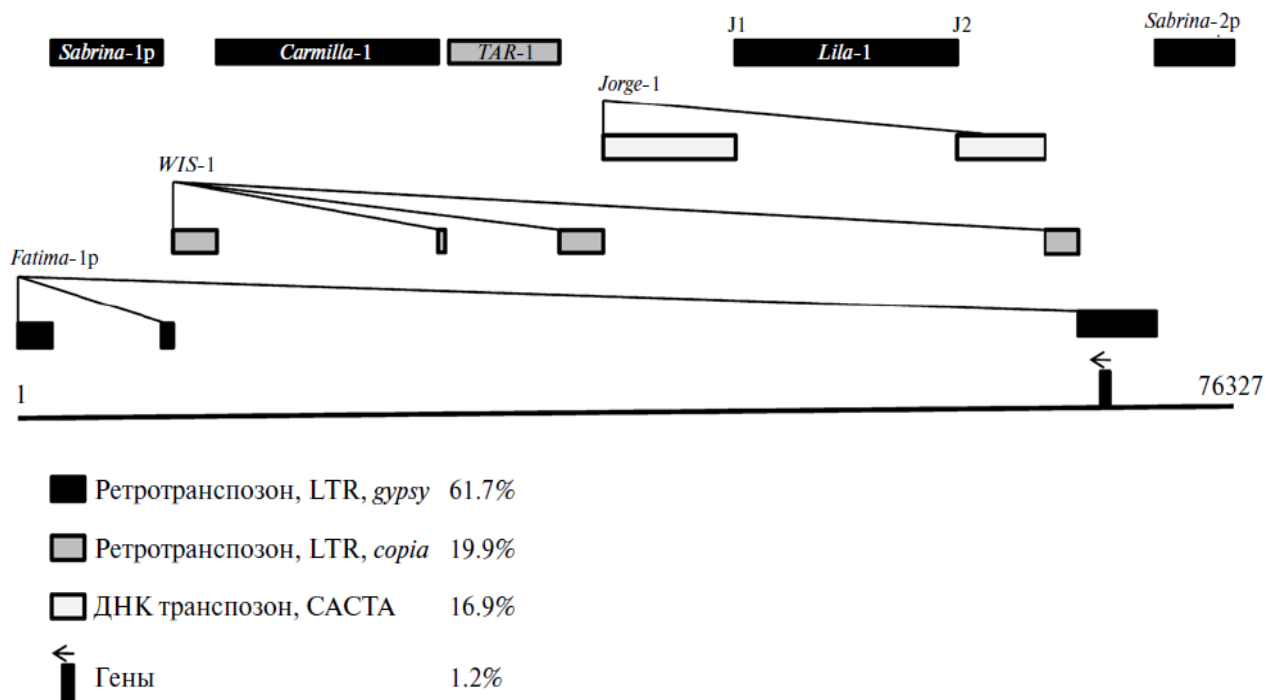
### 3.1.2. Анализ ретроэлемента *gypsy*, специфичного для D-генома мягкой пшеницы

В составе геномной библиотеки мягкой пшеницы *T. aestivum* сорта «Renan» ранее были выявлены клоны: ВАС\_ 2383А24 и ВАС\_112D20, имеющие диспергированный характер распределения в В- и D-субгеномах данного вида, соответственно (Salina et al., 2009; Salina et al. 2011). В настоящей работе был проведен анализ ВАС\_112D20 (Рис. 2А).



**Рис. 2** FISH метафазных хромосом *T. aestivum* (сорт “Renan”) с D-геном-специфичными зондами: А- ВАС\_112D20; Б- *pLila2* (красный сигнал). Для идентификации хромосом D-генома использован маркер *pAs1* (Schneider et al., 2003) (зеленый сигнал) (Щербань и др., 2012).

Полный анализ первичной структуры ВАС\_112D20 (76 327 пн) показал, что для него характерно высокое содержание LTR- ретротранспозонов *gypsy* (61.7%) и низкое содержание генов (1.2%) (Рис. 3).



**Рис. 3** Структурная организация геномного фрагмента *T. aestivum* в составе ВАС\_112D20. Данный фрагмент содержит D-геном-специфичный ретротранспозон *Lila* (Щербань и др., 2012).

Анализ распространения в геномах Triticeae последовательностей ДНК из баз данных, гомологичных выявленным внутри ВАС\_112D20 транспозонам, с последующей FISH отдельного субклона р*Lila2* (Рис.2Б) позволили установить, что *gypsy*-ретротранспозон *Lila* обуславливает D-геном-специфичную идентификацию клона ВАС\_112D20. Эти данные, а также ПЦР-анализ различных видов Triticeae с помощью праймеров, фланкирующих инсерцию *Lila*, указывают на то, что данная инсерция возникла в составе диплоидного вида *Ae. tauschii*, донора D-генома. С использованием формулы расчета времени инсерции ретротранспозона по уровню гомологии его LTR (SanMiguel et al 1998), мы определили ориентировочное время инсерции *Lila* - 1.7 млн лет назад, что примерно соответствует времени инсерции другого *gypsy*-ретротранспозона *Fatima* в ВАС-клоне 2383A24В, специфичном для В-субгенома (Salina et al., 2011). Учитывая установленное ранее время появления дикой тетраплоидной пшеницы *T. dicoccoides* (ВВАА) - ок. 2 млн лет назад (Blake et al., 1999; Huang et al., 2002), можно предполагать, что амплификация субгеном-специфичных вариантов *gypsy*-ретротранспозонов происходила до формирования тетраплоидной пшеницы, в составе диплоидных видов-предшественников субгеномов, и в ходе эволюции аллополиплоидных видов данные ретроэлементы

сохранили свою геном-специфичную организацию. Эти результаты согласуются с данными, полученными на комплексе *O. officinalis* риса (см. гл. 3.1.1).

## **Глава 3.2. Ранние геномные изменения у синтетических амфиплоидов *Triticum* x *Aegilops***

### **3.2.1. Анализ фракций макро- и микросателлитных последовательностей у амфиплоида *Ae. longissima* x *T. urartu***

Нами был проведен анализ синтетического амфиплоида *Ae. longissima* TL05 x *T. urartu* TMU06 (TL05 x TMU06; 2n=28) поколения S<sub>1</sub> (Щербань и др., 2007). Были отобраны 11 праймеров, позволяющие амплифицировать различные изученные ранее теломерные и субтеломерные повторы (Salina et al., 2004). ПЦР анализ с использованием 66 парных комбинаций этих праймеров не выявил изменения в составе указанных повторов, а также промежуточных последовательностей между ними у амфиплоида, по сравнению с родительскими видами.

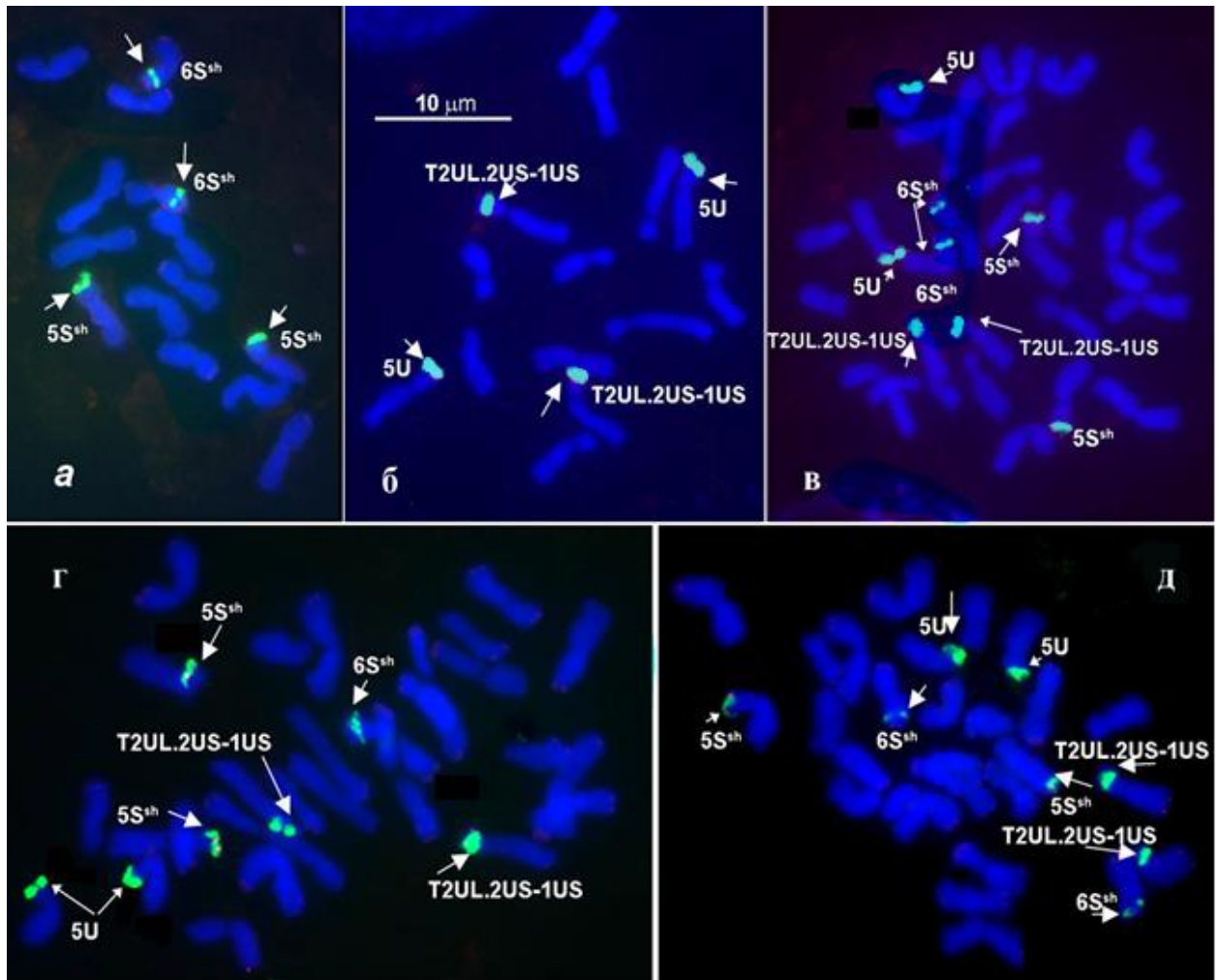
Для анализа микросателлитных (SSR) локусов у амфиплоида TL05 x TMU06 и его родителей нами были использованы комбинации праймеров, ранее разработанные для анализа аналогичных локусов у *T. aestivum* (Roeder et al., 1998). Всего было проанализировано 23 локуса. Как и в предыдущем случае не были обнаружены никакие изменения.

В целом, полученные результаты указывают на консервацию в составе амфиплоида TL05 x TMU06 тандемных некодирующих ПП ДНК различной длины, а также участков, лежащих на границах этих повторов.

### **3.2.2. Анализ реорганизации генов 45S рРНК у амфиплоида *Ae. sharonensis* x *Ae. umbellulata***

Для анализа локусов, содержащих гены 45S рРНК (ядрышковые организаторы; NOR) был взят синтетический амфиплоид *Ae. sharonensis* TH01 x *Ae. umbellulata* TU04 (TH01 x TU04; 2n=28). Предварительно, Бадаева Е.Д. (ИОГен РАН) с помощью методики окрашивания серебром обнаружила полную супрессию NOR S<sup>sh</sup> субгенома у данного амфиплоида. Для изучения возможной реорганизации генов 45S рРНК у амфиплоида в настоящей работе проведена FISH с использованием зонда *pTa71*, ранее клонированной повторяющейся единицы 45S рДНК (Gerlach and Bedbrook, 1979) (Рис. 4).



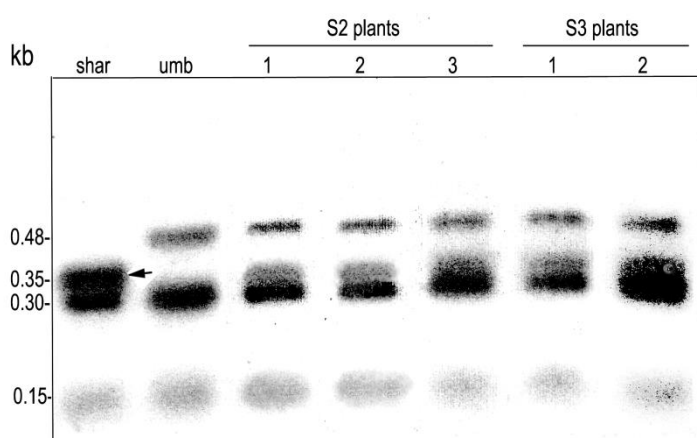


**Рис. 4** FISH с зондом *pTa 71* на метафазные хромосомы: (а) *Ae. sharonensis* (TH01), (б) *Ae. umbellulata* (TU04), (в) TH01xTU04 ( $S_1$ ) без изменений, (г) TH01xTU04 ( $S_3$ ) с одним  $6S^{sh}$  локусом и (д) TH01xTU04 ( $S_{2-3}$ ) с двумя редуцированными  $6S^{sh}$  локусами. Идентификацию хромосом проводили с помощью маркера *pSc119.2* (Schneider et al., 2003) (сигнал удален). Геном *Ae. umbellulata* содержит транслокацию T2UL.2US-1US. Локусы NOR отмечены стрелками (Shcherban et al., 2008).

Большинство изученных амфиплоидов TH01 x TU04 поколений  $S_2$ - $S_4$  имеют сумму локусов рДНК, наблюдаемых у родителей. Локусы рДНК на хромосомах 1U:2U и 5U выглядят без изменений по сравнению с соответствующими локусами родительского вида. Однако, у некоторых растений амфиплоида поколений  $S_2$ - $S_3$  наблюдается редукция интенсивности сигнала NOR на хромосоме  $6S^{sh}$ , затрагивающая обе гомологичные хромосомы (Рис. 4д), а у двух растений  $S_3$  локус NOR на одном из гомологов полностью отсутствовал (Рис. 4г). Более низкая степень редукции сигнала *pTa 71* отмечалась для хромосомы  $5S^{sh}$ , начиная с  $S_2$  поколения. Эти результаты свидетельствуют о том, что у амфиплоида TH01 x TU04 супрессия генов 45S рДНК в субгеноме *Ae. sharonensis* связана с их частичной элиминацией в

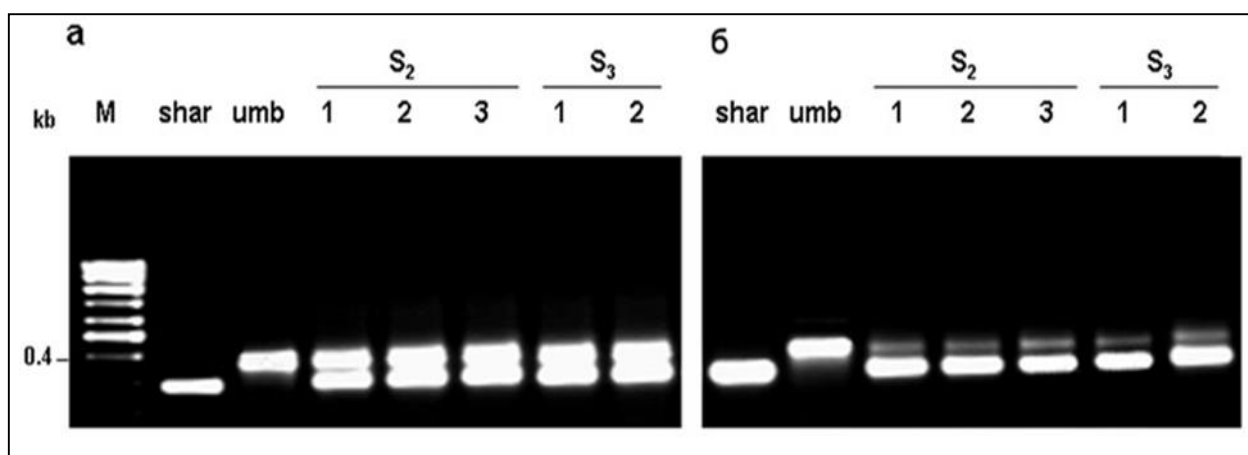


хромосомных локусах указанного субгенома. Данный результат был подтвержден Саузерн-гибридизацией, показавшей редукцию рестрикционных фрагментов от *Ae. sharonensis* у амфиплоида ТН01 x TU04 (Рис. 5).



**Рис. 5** Саузерн-гибридизация рТa 71 с геномной ДНК амфиплоидных растений и диплоидных родителей, обработанной эндонуклеазой *Hae*III. shar- *Ae. sharonensis* (ТН01), umb- *Ae. umbellulata* (TU04). Исследованы индивидуальные растения S<sub>2</sub>-поколения (1-3) и S<sub>3</sub>-поколения (1-2). Стрелкой обозначен фрагмент *Ae. sharonensis*, интенсивность которого уменьшается в составе амфиплоида (Shcherban et al., 2008).

Для обнаружения возможного полиморфизма сайтов метилирования в спейсерном районе генов 45S рРНК проводилась обработка геномной ДНК эндонуклеазой *Hpa* II, чувствительной к метилированию внутреннего цитозина в сайте рестрикции CCGG, с последующей ПЦР-амплификацией участка, находящегося вблизи сайта инициации транскрипции (данный участок имеет разную длину у родительских видов за счет вставки 130 пн у *Ae. umbellulata* и содержит 3 сайта CCGG). ПЦР с использованием необработанной геномной ДНК (контроль) выявила ярко-выраженные фрагменты от обоих родителей у всех исследованных амфиплоидных растений (Рис. 6а). В отличие от этой картины, ДНК, обработанная *Hpa* II давала ПЦР-продукт от *Ae. sharonensis* значительно более высокой интенсивности, по сравнению с продуктом *Ae. umbellulata* (Рис. 6б).



**Рис. 6** ПЦР- анализ геномной ДНК, обработанной эндонуклеазой *Hpa* II. (а) ПЦР с необработанной ДНК, (б) ПЦР с *Hpa* II- обработанной ДНК (Shcherban et al., 2008).

Этот результат позволяет предположить, что в субгеноме *Ae. sharonensis* присутствует относительно большее количество вариантов гена, у которых метилированы все 3 сайта узнавания *Hpa* II, что может быть связано с супрессией NOR этого субгенома на ранних стадиях аллополиплоидизации. Этот результат был подтвержден с использованием и других чувствительных к метилированию эндонуклеаз.

Проведено сравнение картин распределения локусов 45S рДНК у амфиплоида ТН01 х ТУ04 и у изученных в других работах естественных аллополиплоидов, имеющих сходный геномный состав UUSS: *Ae. variabilis* и *Ae. kotschyi*. Анализ *Ae. variabilis* с использованием методики окрашивания серебром обнаружил супрессию ядрышковой активности хромосом S<sup>v</sup> генома (Cermeno et al., 1984). FISH с зондом *pTa 71* выявил частичную потерю генов рРНК на хромосомах S-генома как у *Ae. variabilis*, так и у *Ae. kotschyi*, причем у первого вида эта потеря была более заметна на хромосоме 5S<sup>v</sup>, тогда как у последнего - на хромосоме 6S<sup>k</sup> (Badaeva et al., 2004). Следовательно, изменения локусов 45S рДНК, наблюдаемые у амфиплоида ТН01 х ТУ04 неслучайны и приводят к организации этих локусов, характерной для соответствующих естественных аллополиплоидов.

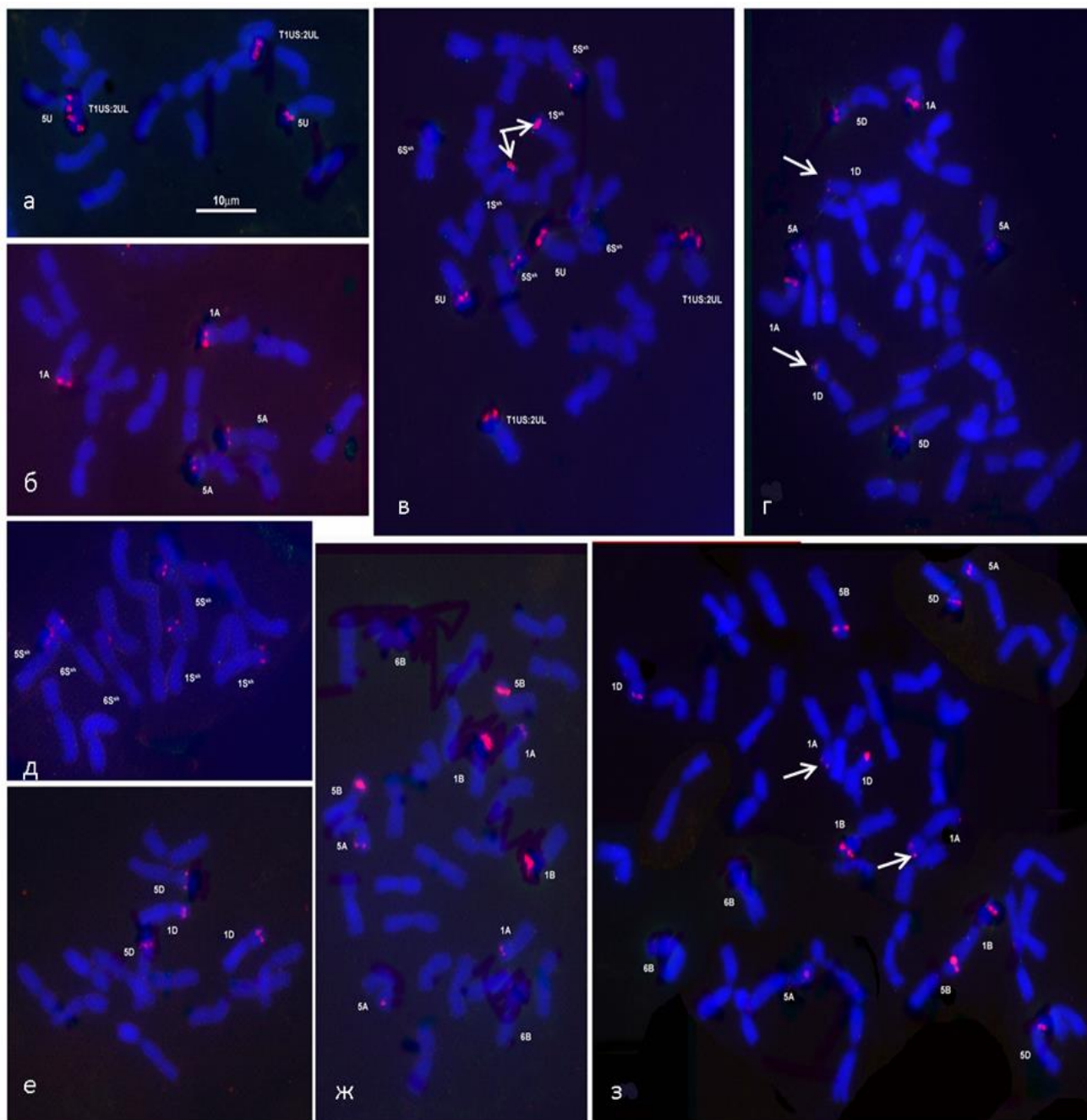
### 3.2.3 Анализ реорганизации генов 5S рРНК

Организация локусов 5S рДНК была проанализирована в составе 3-х синтетических амфиплоидов с помощью FISH (Щербань и др., 2008). В качестве зонда использована ранее клонированная повторяющаяся единица 5S рДНК- *pTa794* (Gerlach and Dyer, 1980). В результате были выявлены следующие изменения (Рис. 7):

1) У амфиплоида *T. urartu* ТМУ38 х *Ae. tauschii* ТQ27 (2n=28) обнаружено уменьшение сигнала на хромосоме 1D *Ae. tauschii* (Рис. 7г) в сравнении с родительскими видами (Рис. 7б,е). Этот результат FISH был подтвержден Саузерн-гибридизацией. ПЦР-анализ и анализ первичной структуры отдельных клонированных единиц 5S рДНК не выявил структурных изменений у гибрида ТМУ38 х ТQ27 по сравнению с его родителями.

2) Локус 5S рДНК на хромосоме 1S<sup>sh</sup> в составе амфиплоида ТУ04 х ТН01 имел более интенсивный сигнал (Рис. 7в), чем на соответствующей хромосоме родительского вида *Ae. sharonensis* (Рис. 7д). В тоже время, хромосомы U-генома не

проявляли выраженных изменений относительно родительского вида *Ae. umbellulata* (Рис. 7а).



**Рис. 7** FISH с зондом *pTa794* на метафазные хромосомы: а - *Ae. umbellulata* TU04; б - *T. urartu* TMU38; в - амфиплоид TU04 x TH01; г - амфиплоид TMU38 x TQ27; д - *Ae. sharonensis* TH01; е - *Ae. tauschii* TQ27; ж - *T. dicoccoides* TTD20; з - амфиплоид TTD20 x TQ27. Стрелками обозначены сайты в составе амфиплоидов, отличающиеся по интенсивности от соответствующих сайтов родительских видов (Щербань и др., 2008).

3) У амфиплоида *T. dicoccoides* TTD20 x *Ae. tauschii* TQ27 ( $2n=42$ ) было обнаружено уменьшение сигнала на хромосоме 1A (Рис. 7з). Геномный состав данного амфиплоида соответствует геномному составу мягкой пшеницы. У

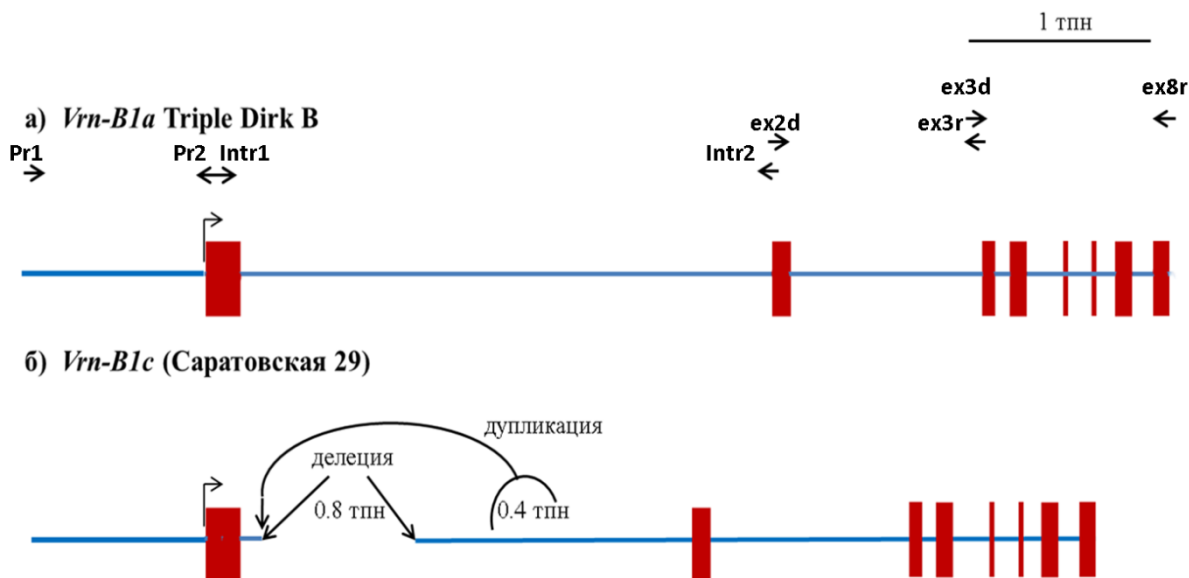
последней сайты на хромосомах 1В и 5В наиболее интенсивные; менее интенсивные сайты расположены на хромосомах 1D и 5D, самую низкую интенсивность имеет сайт на хромосоме 1А, выявляемый только при большом разрешении (Mukai et al., 1990). Таким образом, как и в случае генов 45S рРНК, гены 5S рРНК подвергаются на ранних стадиях аллополиплоидизации количественным изменениям, которые приводят к формированию специфической для каждого конкретного аллополиплоида организации этих генов.

### **Глава 3.3. Структурно-функциональная дивергенция генов *VRN-1* пшеницы как модель эволюционных изменений гомеологичных генов в ходе аллополиплоидизации**

#### **3.3.1. Анализ первичной структуры и экспрессии различных аллелей *VRN-B1* в составе изогенных линий мягкой пшеницы**

Проведенный ранее анализ полиморфизма генов *VRN-1* показал наличие в них двух переменных регуляторных районов: промотора и 1-го интрона, которые могут влиять на чувствительность к яровизации (Yan et al., 2004; Fu et al., 2005). Однако, прямая связь между структурой указанных районов гена *VRN-1* и его экспрессией не была установлена. Для подтверждения такой связи нами был проведен анализ структуры и уровня транскрипции различных аллелей *VRN-B1* локуса (*VRN-B1<sup>Dm</sup>* и *VRN-B1<sup>S</sup>* от сортов «Диамант 2» и «Саратовская 29», соответственно) в составе почти-изогенных линий мягкой пшеницы, имеющих достоверные отличия по сроку колошения (Shcherban et al., 2011; 2013).

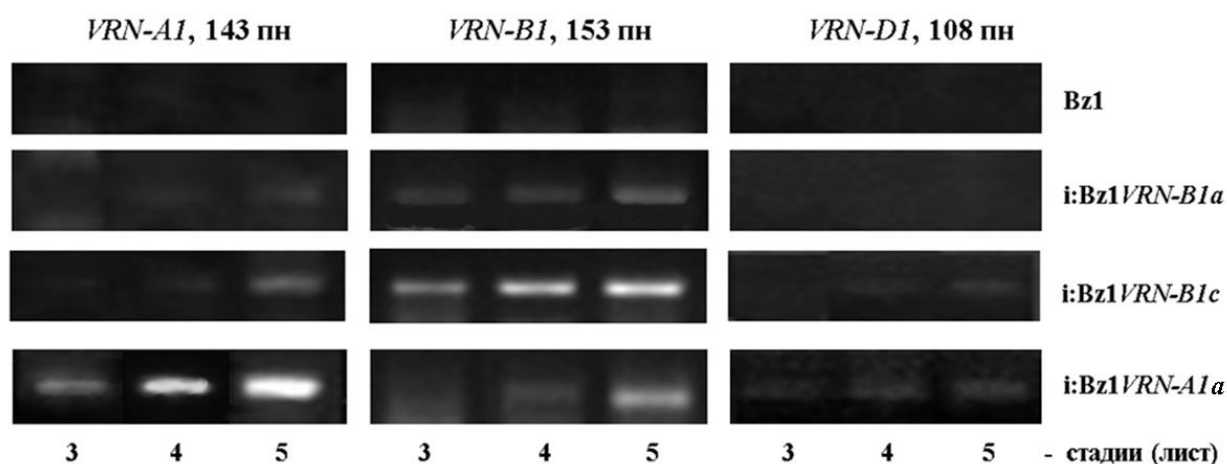
Общая длина аллелей *VRN-B1<sup>Dm</sup>* и *VRN-B1<sup>S</sup>* составляет 6 488 и 6 101 пн, соответственно. Кодировующие последовательности (727 пн), промоторные районы (на расстоянии 968 пн от старта транскрипции), а также интроны 2-7 у обоих аллелей были полностью идентичны. Полная последовательность аллеля *VRN-B1<sup>Dm</sup>* за исключением одной замены была идентична ранее изученной последовательности аллеля *VRN-B1a* из изогенной линии Triple Dirk В *T. aestivum* (AY747603). Аллель *VRN-B1<sup>S</sup>*, благодаря уникальным структурным особенностям в составе интрона 1: делеции 0.8 тпн и дупликации 0.4 тпн был обозначен нами как *VRN-B1c* (Рис. 8). Таким образом, структурные отличия между изученными аллелями *VRN-B1* находятся в составе 1-го интрона.



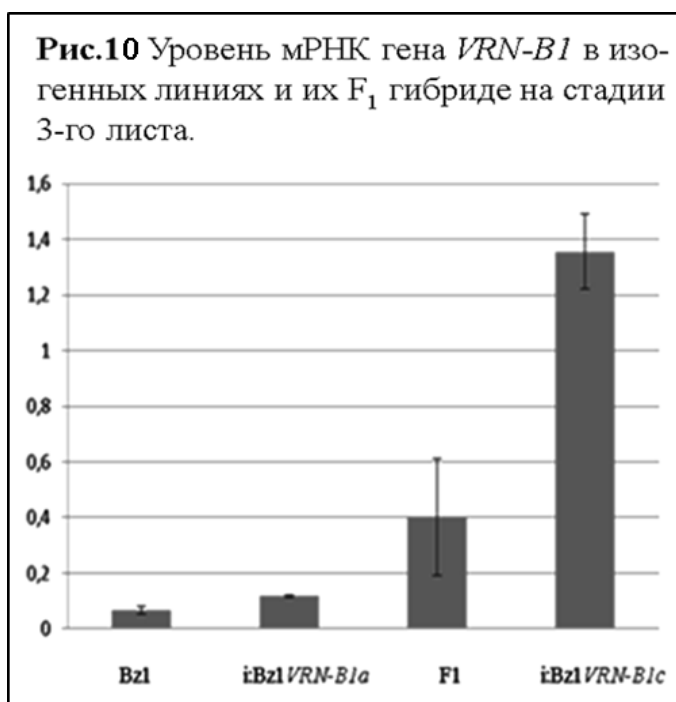
**Рис. 8** Схема структуры изученных аллелей *VRN-B1*. Стрелки над схемой показывают позиции специфических праймеров, использованных для выделения отдельных участков и их секвенирования. Сайт инициации транскрипции обозначен г-образной стрелкой. Красные вертикальные прямоугольники обозначают экзоны (Shcherban et al., 2013).

Для исследования уровней транскрипции доминантных аллелей локусов *VRN-1*, определяющих различные сроки колошения у изогенных линий, нами проведена ПЦР с кДНК, полученной из образцов РНК неярвизированных растений на стадиях 3-5 листа до колошения (Shcherban et al., 2013). У озимого сорта «Безостая 1» транскрипция ни одного из локусов не наблюдалась (Рис. 9). В линиях, несущих доминантные аллели *VRN-A1a* (этот аллель содержит инсерцию в промоторе и впервые изучен в работе Yan и сотр., 2004), *VRN-B1a* и *VRN-B1c* уровень транскрипции этих аллелей линейно возрастал от стадии 3-го листа до стадии 5-го листа. При этом, транскрипционная активность аллелей *Vrn-A1a>Vrn-B1c>Vrn-B1a* коррелировала с установленным ранее порядком выколашивания соответствующих изогенных линий: *i:Bz1Vrn-A1*, *i:Bz1Vrn-B1c* и *i:Bz1Vrn-B1a*.

В присутствии доминантных аллелей *VRN-1* происходила индукция рецессивных гомеоаллелей. По индуцирующему эффекту доминантные аллели *VRN-1* могут быть распределены в соответствии с их собственной транскрипционной активностью: *Vrn-A1a>Vrn-B1c>Vrn-B1a* (Рис. 9).



**Рис. 9** Транскрипция гомеоаллелей *VRN-1* в линиях *i:Bz1VRN-A1*, *i:Bz1VRN-B1c* и *i:Bz1VRN-B1a*. *Bz1* – Безостая 1. Продукты ПЦР (сверху указана длина) были амплифицированы с помощью специфических для каждого аллеля праймеров (Shcherban et al., 2013).



**Рис.10** Уровень мРНК гена *VRN-B1* в изогенных линиях и их  $F_1$  гибриде на стадии 3-го листа.

Для более точной оценки уровней транскрипции в составе локуса *VRN-B1* была проведена ОТ-ПЦР в реальном времени на стадии 3-го листа (Shcherban et al., 2013). Были использованы образцы кДНК изогенных линий *i:Bz1VRN-B1a*, *i:Bz1VRN-B1c*, гибридов  $F_1$  между этими линиями и сорта «Безостая 1» в качестве контроля. Статистически значимое различие ( $t = 9.2$ ,  $p < 0.05$ ) по уровню транскрипции *VRN-B1*

было зафиксировано между двумя линиями: у линии *i:Bz1VRN-B1c* количество *VRN-B1* транскриптов примерно в 10 раз превышало таковое у *i:Bz1VRN-B1a* (Рис. 10). Средний уровень транскрипции *VRN-B1* у гибридов  $F_1$  был более сходным с соответствующим уровнем у линии *i:Bz1VRN-B1a*.

Таким образом, доминантные гомеоаллели *VRN-1*, несущие мутации в различных регуляторных районах (промоторе и 1-м интроне), а также аллели внутри одного гомеологического локуса могут значительно отличаться по уровню экспрессии и оказывать влияние на срок колошения в соответствии с этим уровнем.

### 3.3.2. Ассоциированные с геном *VRN-1* предпосылки ярового образа жизни у первых тетраплоидных пшениц и их диплоидных предков

Предыдущее исследование послужило основой для разработки системы маркеров к обоим регуляторным районам гена *VRN-1*. С использованием этой системы было впервые проведено систематическое исследование генов *VRN-1* у дикорастущих видов *Triticum* (Shcherban et al., 2015b; 2016b). Для этой цели была отобрана большая коллекция образцов тетраплоидных видов и их диплоидных предшественников (см. Глава 2).

#### *Диплоидные виды- предшественники A- и B/G- геномов*

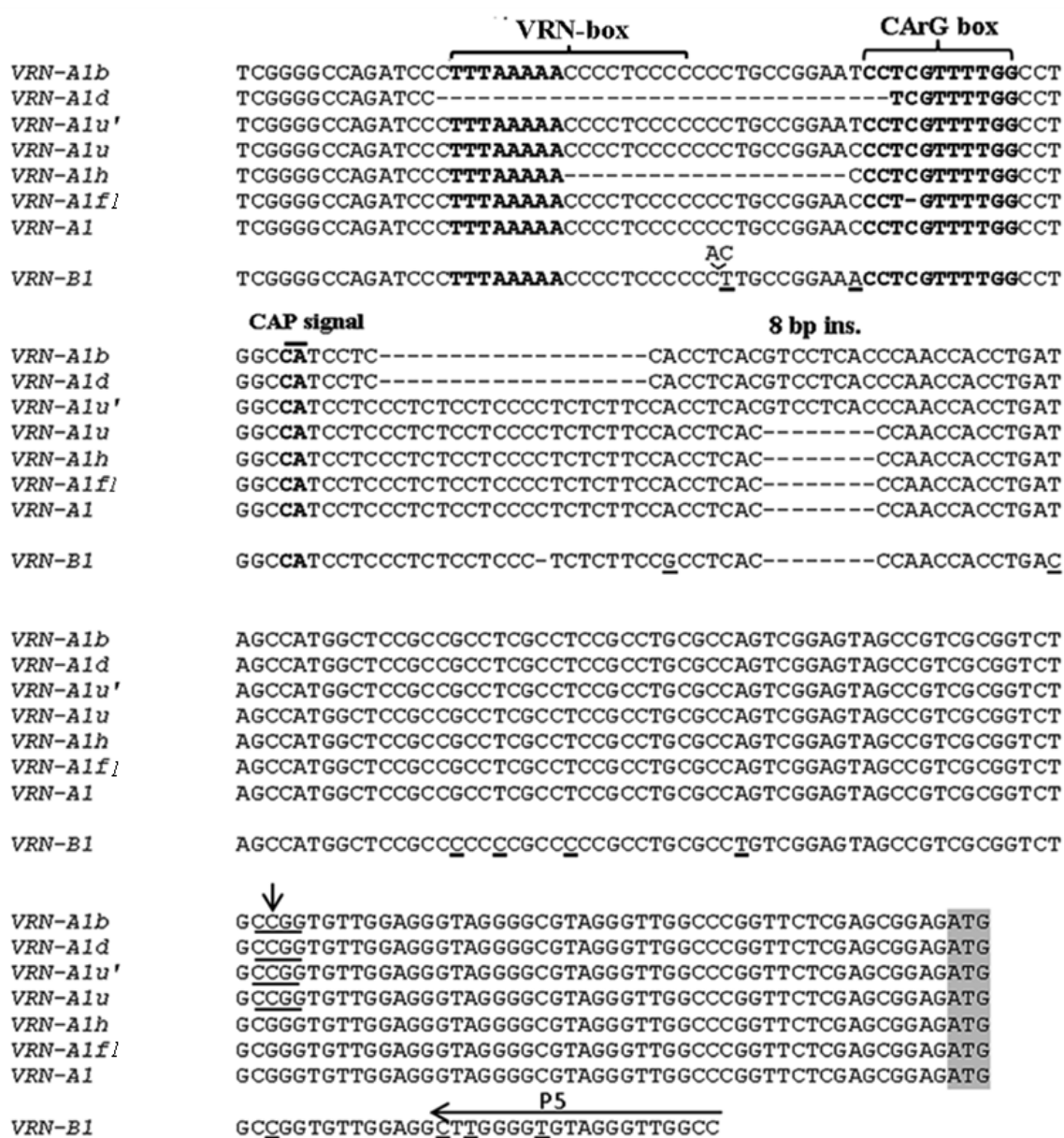
Маркеры, разработанные нами к промоторному району *VRN-1* позволили обнаружить 3 наиболее распространенных аллеля у диплоидов. Рецессивный аллель *VRN-A1* был преобладающим среди образцов *T. monosocum* и *T. boeoticum*. Двадцать из 59 образцов *T. boeoticum* содержали аллель *VRN-A1h*, который отсутствовал у *T. monosocum*. Мы обнаружили ранее охарактеризованный (Dubcovsky et al., 2006) аллель *VRN-A1f1* в четырех из 61 образца *T. monosocum*. Структура аллелей *VRN-A1h* и *VRN-A1f1* представлена на Рис. 11.

Все 40 изученных образцов *T. urartu* имели аллель *VRN-A1u*, имеющий высокую гомологию к известным рецессивным аллелям *VRN-A1* полиплоидных видов пшеницы. Последние аллели содержат инсерцию 8 пн, которая отсутствует у диплоидов (Рис. 11). Мы обозначили рецессивный аллель полиплоидов как *VRN-A1u'*, предполагая его происхождение от аллеля *VRN-A1u* *T. urartu* (Shcherban et al., 2015b).

У диплоидных видов A-генома нами были выявлены две крупные мутации в составе 1-го интрона *VRN-A1*. Ранее обнаруженная у двух яровых образцов *T. monosocum* инсерция 0.5 тпн вблизи начала интрона (Dubcovsky et al., 2006), была выявлена нами у 19 образцов этого вида (аллель *VRN-A1ins*). Делеция 1.4 тпн, локализованная на расстоянии примерно 4 тпн от старта интрона является специфичной для *VRN-A1u* аллеля *T. urartu*, а также для всех известных аллелей *VRN-A1* полиплоидных видов пшеницы.

У предполагаемого предшественника B- и G-геномов полиплоидных пшениц - *Ae. speltoides* нами был установлен относительно высокий уровень дивергенции промоторного района *VRN-1* относительно аналогичных последовательностей полиплоидных видов (Shcherban et al., 2016b). Однако, основные регуляторные

сайты промоторного района (Рис. 11), а также размер фрагмента 1-го интрона, служащего в качестве маркера, оказались без существенных изменений, по сравнению с соответствующими рецессивными генами полиплоидных видов.



**Рис. 11** Сравнение участка промотора у различных аллелей *VRN-A1* и *VRN-B1* (рецессивный аллель *T. dicoccoides*). Указана локализация предполагаемых сайтов регуляции транскрипции (согласно Yan et al., 2004). ATG стартовый кодон обозначен серым цветом. Стрелкой обозначена замена, генерирующая дополнительный сайт узнавания *Msp* 1 (подчеркнут). В составе *VRN-B1* подчеркнуты полиморфные нуклеотиды относительно *VRN-A1* (Shcherban et al., 2015b).

Таким образом, анализ как промоторного района, так и первого интрона гена *VRN-1* у диплоидных видов позволил нам обнаружить видо-специфичные аллели, включая *VRN-A1f1* и *VRN-A1ins* для *T. monococcum*, *VRN-A1h* для *T. boeoticum* и *VRN-A1u* для *T. urartu*. Аллели *VRN-A1f1*, *VRN-A1ins*, *VRN-A1h* (частично) были



ассоциированы с яровыми формами, тогда как аллель *VRN-A1u* и аллели *VRN-1 Ae. speltooides* были связаны только с озимыми формами.

*Возникновение нового набора доминантных аллелей VRN-1 у первых тетраплоидных видов пшеницы*

Дикая пшеница *T. dicoccoides* принадлежит к первым злаковым растениям, одомашненным человеком и именно этот вид дал начало всем распространенным видам культурной полиплоидной пшеницы (Ozkan et al., 2011). У *T. dicoccoides* мы выявили два ранее описанных аллеля *VRN-A1b* и *VRN-A1d* с мутациями в промоторном районе (Рис. 11). Аллель *VRN-A1b* не всегда связан с яровым образом жизни (Pidal et al., 2009); в нашем исследовании он выявлен у трех озимых образцов *T. dicoccoides* (Shcherban et al., 2015b). Аллель *VRN-A1d* влияет на тип развития более существенно, возможно, благодаря дополнительной делеции, затрагивающей CArG-бокс. Этот аллель обуславливает яровой тип развития у образцов *T. dicoccoides*, изученных в настоящей работе, а также у образцов тетраплоидных видов пшеницы, проанализированных в других исследованиях (Yan et al., 2004; Golovnina et al., 2010).

У трех образцов *T. dicoccoides* нами обнаружен аллель *VRN-A1L* с крупной делецией в интроне 1 (Shcherban et al., 2015b). Этот аллель весьма распространен среди культурных яровых образцов тетраплоидного вида *T. durum* (Fu et al., 2005; Oliveira et al., 2012) и также как предыдущие аллели не был найден у диплоидных видов-предшественников.

В отличие от *VRN-A1*, в составе локуса *VRN-B1* *T. dicoccoides* не были выявлены какие-либо значительные мутации типа инсерций или делеций (Shcherban et al., 2015b). В целом, появление яровых форм у *T. dicoccoides* было связано с мутациями, главным образом, внутри промотора и 1-го интрона *VRN-A1* локуса (делеции разной длины).

Для того чтобы установить: какие мутации *VRN-1* способствовали появлению яровых форм среди тетраплоидных пшениц группы *Timopheevii*, мы провели сравнительный анализ этих генов у дикорастущего *T. araraticum* и его доместичированной яровой формы - *T. timopheevii*. Промоторный район *VRN-A1* у обоих видов был высоко-консервативен и содержал делецию 50 пн вблизи стартового кодона. В тоже время, мы выявили крупные перестройки в 1-м интроне *VRN-A1*: инсерцию миниатюрного транспозона (MITE) 0.4 тпн и делецию 2.7 тпн на

расстоянии ~ 0.4 тпн и 3 тпн от начала интрона 1, соответственно (Shcherban et al., 2016b). Одновременно с нашей публикацией эти же мутации были обнаружены у еще одного представителя группы *Timopheevii* - *T. militinae* (GGAA; 2n=28) в составе аллеля *VRN-A1f-like* (Ivanicova et al., 2016). Нами впервые было показано, что указанные инсерция и делеция имеют независимое происхождение и оказывают разное влияние на тип развития. Делеция 2.7 тпн, по-видимому, возникла до дивергенции *T. timopheevii* и *T. araraticum*, поскольку она выявлена у 4-х озимых образцов последнего вида. Наряду с этим, ни один из изученных образцов *T. araraticum* не содержит инсерцию MITE, которая присутствует во всех яровых образцах *T. timopheevii*: либо в комбинации с первой мутацией (*VRN-A1f-del/ins*), либо независимо (*VRN-A1f-ins*).

Ген *VRN-G1* в составе *T. timopheevii* и *T. araraticum* варьирует несущественно. Единственный модифицированный аллель *VRN-G1a*, содержащий инсерцию MITE 0.2 тпн в промоторе, является общим для обоих видов и встречается у незначительного числа образцов. У образцов *T. araraticum* этот аллель связан с озимым образом жизни (Shcherban et al., 2016b).

Таким образом, вид *T. timopheevii* мог появиться в результате доместикировки яровой формы *T. araraticum*, возникшей благодаря инсерции MITE в 1-м интроне *VRN-A1*.

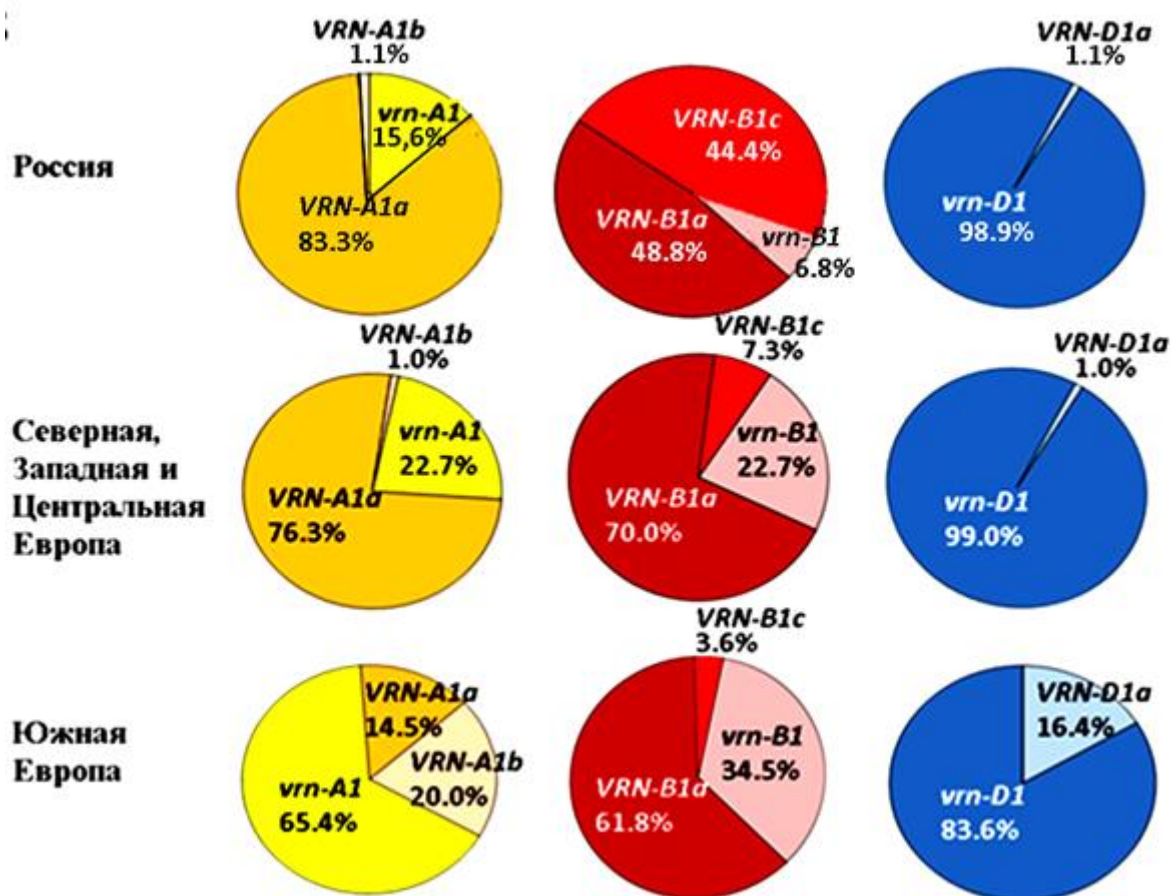
### **3.3.3. Разнообразие гаплотипов *VRN-1* мягкой пшеницы, определяющих различия по сроку колошения у яровых образцов**

Преыдущий анализ показал, что на первой стадии аллополиплоидизации как в линии Emmer, так и в линии *Timopheevii* изменчивость локусов *VRN-1*, связанная с яровыми формами затрагивает преимущественно locus *VRN-A1*. У мягкой пшеницы реакцию на яровизацию и срок колошения контролируют комбинации гомеоаллелей по трем локусам *VRN-1*. Наряду с последними, большое влияние на эти признаки оказывает ген *PPD-D1* - основной ген чувствительности к фотопериоду (Beales et al., 2007). Нами был проведен анализ аллельного полиморфизма генов *VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN-D1* и *PPD-D1* в выборке яровых сортов мягкой пшеницы из различных географических районов Европы и России. У Европейских сортов дополнительно проведена оценка срока колошения.

Нами установлено, что 91% и 98.7% Европейских и Российских сортов, соответственно, содержат аллель *PPD-D1b*, обуславливающий чувствительность к

фотопериоду. Аллель нечувствительности к фотопериоду- *PPD-D1a* был обнаружен у 32% сортов из южного региона Европы.

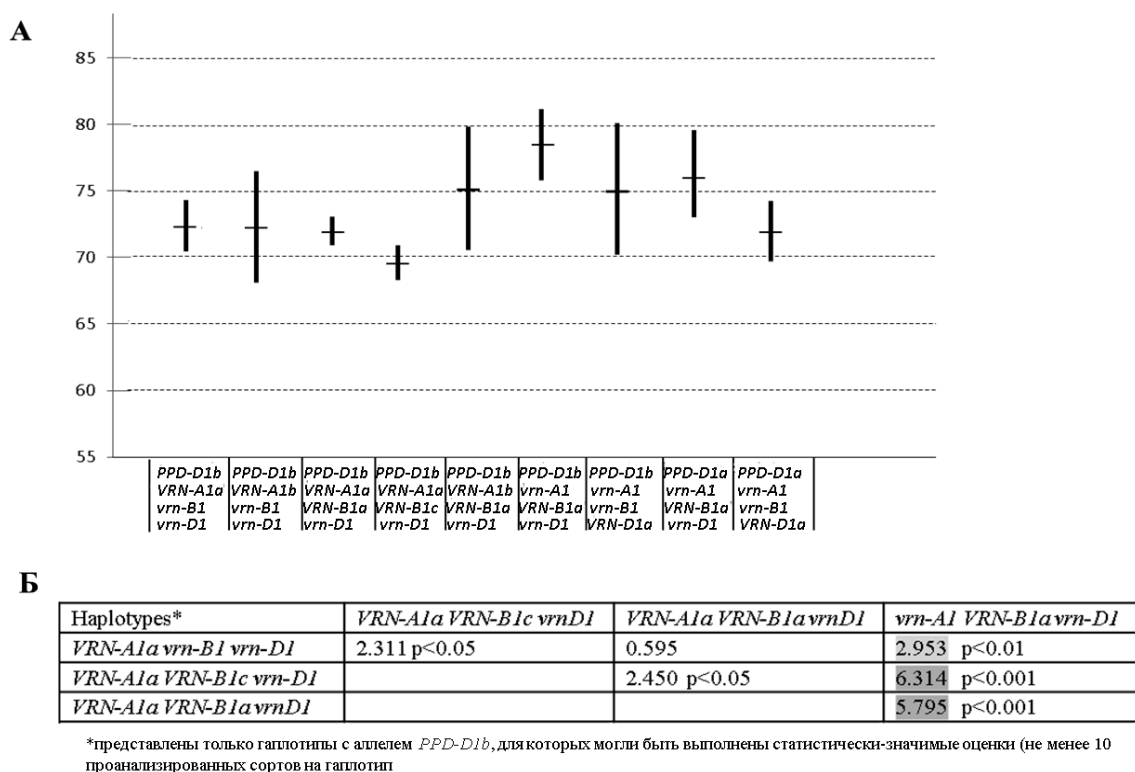
Самым распространенным аллелем *VRN-1* на всей изученной территории является аллель *VRN-A1a*, наиболее характерный для зоны умеренного климата (Рис. 12). На втором месте по частоте распространения находится аллель *VRN-B1a*. В Европе он значительно преобладает над аллелем *VRN-B1c*, тогда как в России и странах восточной Европы, граничащих с Россией, частоты этих аллелей примерно одинаковы. Наиболее редкие аллели как для Европы, так и для России: *VRN-A1b* и *VRN-D1a* (делеция 4.2 тпн в 1-м интроне; Fu et al., 2005). Только в южной Европе их частоты возрастали до 20% и 16.4%, соответственно (Рис. 12).



**Рис. 12** Диаграммы распространения аллелей *VRN-1* генов среди изученных сортов яровой мягкой пшеницы из различных географических регионов (Shcherban et al., 2012; Shcherban et al., 2015a).

В целом, для большей части территории Европы с умеренным климатом и всей территории России характерен дигенно-доминантный контроль реакции на яровизацию, а именно: сочетание доминантного аллеля *VRN-A1a* с доминантным аллелем по *VRN-B1* локусу (*VRN-B1a* или *VRN-B1c*), тогда как южный,

субтропический регион Европы характеризуется преимущественно моногенным контролем данного признака с участием доминантных аллелей *VRN-B1a* или *VRN-D1a*. Южно-европейские сорта имеют, в среднем, на 5 дней более позднее выколашивание, по сравнению с сортами оставшейся части Европы (Shcherban et al., 2015a). Это различие может быть обусловлено указанным географическим распределением гаплотипов *VRN-I*. В качестве подтверждения, мы обнаружили у гаплотипа *vrn-A1 VRN-Ba vrn-D1*, распространенного в южной Европе, статистически значимое ( $p < 0.001$ ) увеличение срока колошения на 5-8 дней, по сравнению с доминантными по генам *VRN-A1* и *VRN-B1* гаплотипами (Рис. 13). Такое увеличение могло иметь селекционное преимущество, обеспечивая более длительный вегетационный период, оптимальный для условий данного региона, тогда как для регионов умеренного климата укороченный период вегетации более предпочтителен из-за высокого риска ранних осенних заморозков.



**Рис. 13** А- эффект различных комбинаций *PPD-D1 / VRN-I* на время колошения. Вертикальные линии с чертой в середине обозначают 95% доверительный интервал и среднее значение срока колошения для соответствующей группы аллелей. Б- Значения коэффициента Стьюдента (Т) и соответствующего уровня значимости (p), показывающие различия по сроку колошения между наиболее распространенными *VRN-I* гаплотипами. Наиболее значимые различия выделены серым цветом (Shcherban et al., 2015a).

Таким образом, широкая адаптивная радиация мягкой пшеницы в различных климатических условиях во многом обусловлена специфическим географическим распределением различных гаплотипов *VRN-1/PPD-1* генов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Большинство высших растений являются аллополиплоидами, возникшими в результате одного и более раундов аллополиплоидизации. До настоящей работы исследования процессов геномной реорганизации под действием аллополиплоидизации были направлены, в основном, на изучение хромосомных перестроек, генетических изменений и последствий этих изменений на уровне транскриптома. В то же время оставались практически неизученными реорганизации, связанные с некодирующими ПП ДНК, генами «домашнего хозяйства» и специализированными генами, играющими ключевую роль в расширении адаптивного потенциала аллополиплоидов. В настоящей работе были исследованы особенности реорганизации вышеуказанных компонентов генома, а именно: LTR ретротранспозонов, генов рРНК и гомеологичных генов *VRN-1* в процессе образования и эволюции аллополиплоидных видов злаков.

При изучении дивергенции короткой последовательности ретротранспозона *gypsy* в геномах комплекса *O. officinalis* риса было показано, что у аллотетраплоидных видов комплекса сохраняются видо-специфичные паттерны организации данного ретроэлемента, характерные для диплоидных предшественников. В дальнейшем, эта особенность эволюции LTR ретроэлементов была подтверждена при анализе отдельного семейства этих элементов, специфичного для D-субгенома мягкой пшеницы, *T. aestivum*. Следующим этапом был анализ ранних геномных изменений в составе искусственных амфилоидов *Triticum* x *Aegilops* и их сопоставление с геномными изменениями у природных аллополиплоидов. Мишенью исследования являлись тандемные макро- и микросателлитные повторы, а также кодирующие умеренно-повторяющиеся последовательности генов 45S и 5S рРНК. В составе первых 2-х компонентов не были обнаружены какие-либо существенные изменения. Было впервые показано, что супрессия генов рРНК в одном из родительских субгеномов сопровождается элиминацией супрессированных генов в отдельных хромосомных локусах. Указанные изменения генов рРНК в составе синтетических амфилоидов отражают

аналогичные процессы, происходящие у сходных по геномному составу природных аллополиплоидов.

Анализ гомеологичных локусов *VRN-1* у мягкой пшеницы показал различный уровень экспрессии этих локусов, в зависимости от структуры регуляторных районов и впервые продемонстрировал важную роль 1-го интрона *VRN-1* в определении уровня транскрипции и срока колошения яровых форм данного вида. В результате этого анализа была разработана система молекулярных маркеров, позволяющая проводить скрининг гомеологичных локусов *VRN-1* в материале пшениц различного происхождения и уровня пloidности. С использованием этой системы было впервые установлено, что формирование всего разнообразия аллелей этих локусов и их комбинаций, определяющих широкую адаптивную радиацию полиплоидных пшениц происходило на полиплоидном уровне, в результате отбора человеком *VRN-1*-гаплотипов, оптимальных для тех или иных климатических условий.

Таким образом, результаты, представленные в настоящей работе позволяют комплексно оценить роль различных компонентов генома в процессе реорганизации генома под действием стрессового фактора аллополиплоидизации. Результаты данного исследования открывают перспективу для дальнейшего анализа выявленных геномных реорганизаций и их адаптивного значения, а также для использования этих реорганизаций в селекции новых форм хозяйственно-ценных видов злаковых растений, таких как мягкая пшеница, рис и др.

## ВЫВОДЫ

- 1) Показано, что у аллополиплоидных видов комплекса *O. officinalis* риса сохраняются паттерны организации *gypsy*-подобного LTR ретроэлемента, специфичные для диплоидных видов-предшественников.
- 2) Показано, что пролиферация высоко-представленного семейства LTR ретроэлементов в составе D-субгенома мягкой пшеницы происходила у диплоидных предшественников этого субгенома, и в ходе эволюции алло-полиплоидных форм это семейство сохранило свою геном-специфичную организацию и локализацию на хромосомах.
- 3) На модели синтетических амфиплоидов *Triticum* x *Aegilops* показано, что уже в первых поколениях после скрещивания происходит супрессия и элиминация

отдельных блоков 45S и 5S рРНК- генов в одном из родительских геномов, приводящая к формированию специфической для каждого аллополиплоида организации этих локусов.

4) Проведен молекулярный анализ гена *VRN-1*, определяющего важные физиологические признаки- реакцию на яровизацию и срок колошения. Установлено, что в основе структурно- функциональной дивергенции гомеологичных генов *VRN-1* в ходе эволюции аллополиплоидных форм пшеницы лежат изменения в структуре основных регуляторных районов: промотора и 1-го интрона, при этом:

- продемонстрирована роль 1-го интрона в определении уровня транскрипции *VRN-1* гена и связанного с этим уровнем срока колошения у яровых форм.

- разработана система ПЦР-маркеров, позволяющая провести комплексную оценку структурно-функциональной дивергенции *VRN-1* локусов в ходе эволюции видов пшеницы различного уровня плоидности.

5) Установлено, что происхождение яровых форм у полиплоидных видов пшеницы, начиная с первых дикорастущих тетраплоидных видов (ВВАА/ГГАА) обусловлено возникновением и распространением в результате селекции новых доминантных аллелей *VRN-1* локусов, не связанных по происхождению с аллелями диплоидных видов- предполагаемых доноров А- и В(Г)- субгеномов.

6) Показано, что широкое распространение мягкой пшеницы в различных климатических зонах обусловлено определенными сочетаниями гомеоаллелей *VRN-1*, определяющими оптимальное время колошения для того или иного региона.

## **СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Публикации в печатных изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ**

1. **Shcherban A.B.**, Vaughan D.A., Tomooka N. (2000) Isolation of a new retrotransposon-like DNA sequence and its use in analysis of diversity within the *Oryza officinalis* complex. *Genetica*, V.108, P.145-154.
2. **Shcherban A.B.**, Vaughan D.A., Tomooka N., Kaga A. (2001) Diversity in the integrase coding domain of a *gypsy*-like retrotransposon among wild relatives of rice in the *Oryza officinalis* complex. *Genetica*, V.110, P.43-53.
3. **Щербань А.Б.**, Хлесткина Е.К., Салина Е.А. (2004) Анализ ДНК-маркера специфичного для G-генома пшеницы. *Генетика*, Т.40, N.3, С.372-379.
4. Salina E.A., Lim Y.K., Badaeva E.D., **Shcherban A.B.**, Adonina I.G., Amosova A.V., et al (2006) Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section Sitopsis and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids. *Genome*. V.49: P. 1023-1035.

5. **Щербань А.Б.**, Хлесткина Е.К., Сергеева Е.М., Салина Е.А. (2007) Геномные изменения на ранних стадиях формирования аллополиплоида *Aegilops longissima* x *Triticum urartu*. Генетика. Т.43. N. 7, С.963-970.
6. Зошук С.А., Бадаева Е.Д., Зошук Н.В., Адонина И.Г., **Щербань А.Б.**, Салина Е.А. (2007) Исследование внутривидовой дивергенции пшениц группы *Timopheevi* методом гибридизации *in situ* с семействами тандемных повторов *Spelt1* и *Spelt52*. Генетика. Т.43. N. 6, С.771-781.
7. **Shcherban A.B.**, E.D. Badaeva, A.V. Amosova, I.G. Adonina & E.A. Salina. (2008) Genetic and epigenetic changes of rDNA in a synthetic allotetraploid *Aegilops sharonensis* x *Ae. umbellulata*. Genome. V.51(4), P. 261-271.
8. **Щербань А.Б.**, Е.М. Сергеева, Е.Д.Бадаева, Е.А.Салина. (2008) Анализ изменений 5S рДНК у синтетических аллополиплоидов *Triticum* x *Aegilops*. Молекулярная биология. Т.42. N.4, С.604-611.
9. Salina E.A., Sergeeva E.M., Adonina I.G., **Shcherban A.B.**, Afonnikov D.A., Belcram H., Huneau C., Chalhoub B. (2009) Isolation and sequence analysis of the wheat B genome subtelomeric DNA. BMC Genomics. 10: 414.
10. Salina E.A., Sergeeva E.M., Adonina I.G., **Shcherban A.B.**, Belcram H., Huneau C., Chalhoub B. (2011) The impact of Ty3-gypsy group LTR retrotransposons Fatima on B-genome specificity of polyploid wheats. BMC Genomics. 11: 99.
11. **Shcherban A.B.**, Efremova T.T., Salina E.A. (2011) Identification of a new *Vrn-B1* allele using two near-isogenic wheat lines with difference in heading time. Mol. Breeding. 29(3), P. 675–685.
12. **Щербань А.Б.**, И.Г.Адонина, Е.А.Салина. (2012) Вклад Ty3-gypsy-ретротранспозона *Lila* в специфичность D-генома мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. Молекулярная биология. том 46, N2, с.1-10.
13. **Shcherban A.B.**, Emtseva M.V., Efremova T.T. (2012) 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. V.40, N3, P. 425-435.
14. **Щербань А.Б.**, Салина Е.А. (2013) Эпигенетическая регуляция экспрессии генов яровизации. Цитология. 55(4). 234-237.
15. **Shcherban A.B.**, Khlestkina E.K., Efremova T.T., Salina E.A. 2013. The effect of two differentially expressed wheat *VRN-B1* alleles on the heading time is associated with structural variation in the first intron. Genetica. 141: 133-141.
16. **Щербань А.Б.** (2013) Реорганизация генома растений в ходе аллополиплоидизации. Вавиловский журнал генетики и селекции. том 17, N2, С.277-285.
17. Лихенко И.Е., Стасюк А.И., **Щербань А.Б.**, Зырянова А.Ф., Лихенко Н.И., Салина Е.А. (2014) Изучение аллельного состава генов *Vrn-1* и *Ppd-1* у раннеспелых и среднеранних сортов яровой мягкой пшеницы Сибири. Вавиловский журнал генетики и селекции. Том 18, № 4/1, С.691-703.
18. **Щербань А.Б.** (2014) Повторяющиеся последовательности ДНК в геномах растений. Вавиловский журнал генетики и селекции. Том 18, № 4/1, С. 618-629.
19. **Shcherban A.B.**, Borner A., Salina E.A. (2015a) Effect of *VRN-1* and *PPD-D1* genes on heading time in European bread wheat cultivars. Plant Breeding. V.134: 49-55.
20. **Shcherban AB**, Strygina KV, Salina EA (2015b) *VRN-1* gene- associated prerequisites of spring growth habit in wild tetraploid wheat *T. dicoccoides* and the diploid A genome species. BMC Plant Biology, 15:94, DOI 10.1186/s12870-015-0473-x
21. **Shcherban A.B.**, Kochieva E.Z., Salina E.A. (2016a) Diversification of the homoeologous *Lr34* sequences in polyploid wheat species and their diploid progenitors. Journal of Molecular Evolution. 82(6), pp 291–302.
22. Kiseleva A. A., **Shcherban A.B.**, Leonova I.N., Frenkel Z., Salina E.A. (2016) Identification of new heading date determinants in wheat 5B chromosome. BMC Plant Biology 16 (Suppl 1):8, pp 35-81.



23. **Shcherban A.B.**, Schichkina A.A., Salina E.A. (2016b) The occurrence of spring forms in tetraploid Timopheevi wheat is associated with variation in the first intron of the *VRN-A1* gene. *BMC Plant Biology* 16 (Suppl 3):236.

#### Статьи в других изданиях

24. **Shcherban A.B.**, Vaughan D.A., Tomooka N. (1999) Isolation and characterization of TrsC family of tandem repeats from species in the *O. officinalis* complex. *Rice Genetics Newsletter*, V.16, P.17-19.
25. Federici M.T., **Shcherban A.B.**, Capdevielle F., Francis M., Vaughan D. (2002) Analysis of genetic diversity in the *Oryza officinalis* complex. *Electronic Journal of Biotechnology*, V.5., N.2. Available from <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue2/full/9/>
26. Чеботарь Г.О., Чеботарь С.В., Бабенко Д.О., Мощный И.И., **Щербань А.Б.**, Сиволап Ю.М. (2012) Аллели гена *Ppd-D1* у зразках колекції *Aegilops tauschii* і м'якої пшениці. *Biopolymers and Cell (Ukraine)*. Vol. 28, № 2., P. 149–155.

#### Статьи в сборниках научных трудов

27. Sergeeva E.M., **Shcherban A.B.** & Salina E.A. (2005) Alterations of 5S rRNA genes in *Triticum* x *Aegilops* allopolyploids. // *Современные проблемы генетики, радиобиологии, радиоэкологии и эволюции/под ред.В.Л. Корогодиной и др., Т.1, С.74-79.*
28. **Shcherban A.B.**, Badaeva E.D., Adonina I.G., Salina E.A. (2007) 45S rDNA changes in a synthetic amphiploid *Aegilops sharonensis* × *Ae. umbellulata* // *Proc. Conf. "Polyploidy, Heterosis and Epigenetics"*, Beijing, China, P. 66.
29. Salina E.A., Adonina I.G., **Shcherban A.B.**, Badaeva E.D., Leonova I.N., Roder M.S. (2007) Genome reorganization during evolution of diploid and polyploidy species *Triticum* and *Aegilops*: the study by using micro- and macrosatellites // *Proc. the Aaronsohn\_ITMI International Conference, Tiberias, Israel, Lecture G5.*
30. Salina E.A., Sergeeva E.M., Adonina I.G., **Shcherban A.B.**, et al., (2009) Structural analysis of subtelomeric chromosomal region of *Triticum* and *Aegilops* species // *Joint workshop 19th International Triticeae Mapping Initiative / 3rd COST Tritigen, Clermont-Ferrand, France, p.59.*
31. **Shcherban A.B.**, Efremova T.T., Salina E.A. (2010) Molecular analysis of vernalization response genes in near-isogenic spring wheat lines with different time of ear emergence // *Proc. International conference "Modern Biotechnology of Agricultural Plants and Bio-safety"*, Odessa, Ukraine, p.69.
32. **Щербань А.Б.**, Хлесткина Е.К., Ефремова Т.Т., Салина Е.А. (2011) Структурная организация и транскрипция нового *Vrn-B1* аллеля пшеницы *T.aestivum* L. // *Материалы международной конференции «Генетические ресурсы пшеницы и геномика»*, Новосибирск, Россия, С. 39.
33. **Shcherban A.B.**, Khlestkina E.K., Efremova T.T., Salina E.A. (2011) A new *Vrn-B1* allele of wheat, *T.aestivum*: gene structure, transcription and geographical distribution // *EWAC Newsletters*, P. 70-72.
34. Чеботарь Г.А., Чеботарь С.В., **Щербань А.Б.**, Файт В.И., Салина Е.А. (2011) Аллельное разнообразие в локусах, контролирующих габитус, рост и чувствительность к фотопериоду у Украинских и Российских сортов мягкой пшеницы // *Материалы международной конференции «Генетические ресурсы пшеницы и геномика»*, Новосибирск, Россия, С. 52.
35. Сергеева Е.М., **Щербань А.Б.**, Адонина И.Г., Шалуб Б., Салина Е.А. (2011) Вклад мобильных элементов в геномную дифференциацию у пшеницы // *Материалы международной конференции «Генетические ресурсы пшеницы и геномика»*, Новосибирск, Россия, С.22.
36. **Щербань А.Б.**, Чеботарь С., Чеботарь Г., Ефремова Т.Т., Салина Е.А. (2012) Широкое распространение нового аллеля *VRN-B1c* пшеницы *Triticum aestivum* L. в России, Украине и соседних регионах: связь со сроком колошения и адаптивным потенциалом

- // Труды 2-й международной конференции «Растение, генетика, геномика и биотехнология», Иркутск, Россия, С.64.
37. **Shcherban A.B.**, Sergeeva E.M., Adonina I.G., Chalhoub B., Salina E.A. (2012) The impact of transposable elements on wheat genomic differentiation // Proc. of the International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity, Pruhonice, Czech, S4A-4.
  38. **Shcherban A.B.**, Efremova T.T., Khlestkina E.K., Salina E.A. (2013) The structure, expression and geographical distribution of different *VRN-B1* alleles of common wheat, *T. aestivum* // Proc. 12th International Wheat Genetics Symposium, Yokohama, Japan, P. 133.
  39. **Щербань А.Б.**, Стрыгина К.В., Салина Е.А. (2014) Анализ аллельного разнообразия гена *VRN-1* в составе полиплоидных видов пшениц и их диплоидных предков // Материалы VI Съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров, Ростов-на-Дону, С. 146.
  40. **Shcherban A.B.**, Börner A., Salina E.A. (2014) The characterization of *VRN-1* and *PPD-D1* genes associated with heading time variation in hexaploid spring wheat germplasm from Europe and Russia // Proc. of Joint EUCARPIA Cereal Section & ITMI Conference, Wernigerode, Germany, P. 182.
  41. Лихенко И.Е., Стасюк А.И., **Щербань А.Б.**, Зырянова А.Ф., Лихенко Н.И., Салина Е.А. (2015) Особенности детерминации продолжительности вегетационного периода сибирских раннеспелых и среднеранних сортов яровой мягкой пшеницы // Мат. Межд. науч.-практ. конф. «Селекция сельскохозяйственных растений в аридных территориях Сибири и Дальнего Востока», С. 165-177.
  42. Stasyuk A., Likhenko I.E., **Shcherban A.B.**, Zyryanova A.F., Likhenko N.I., Salina E.A. (2015) Analysis of the *Vrn-1* and *Ppd-1* genes in Siberian early and medium early varieties of spring common wheat // Proc. of the 3rd International Conference «Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology» Novosibirsk, Russia, P. 54-55.
  43. **Shcherban A.B.**, Schischkina A.A., Salina E.A. (2016) The Occurrence of Spring Forms in Tetraploid Timopheevi Wheats is Associated with Variation in the First Intron of *VRN-A1* Gene // Proc. of the 10-th International Conference on the Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology (BGRS\SB-2016), Novosibirsk, Russia, P. 277.
  44. Kiseleva A.A., **Shcherban A.B.**, Leonova I.N., Salina E.A. (2016) Novel candidate genes on wheat 5B chromosome for flowering time regulation // Abstracts of the Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress, Prague, Czech Republic, ID921.
  45. **Shcherban A.B.**, Efremova T.T., Salina E.A. (2016) Coevolution of homoeologous vernalization genes *VRN-1* in polyploid wheats: a new possibilities for wheat adaptation // Abstracts of the International Conference “Polyploidy, Hybridization and Biodiversity” (ICPHB2016), Rovinj, Croatia, PS1-1.

**Благодарности.** Приношу глубокую благодарность научному консультанту д.б.н., профессору Салиной Елене Артемовне за помощь в подготовке диссертации, лаборантам М.В.Баклановой, Н.Н.Мильхиной за помощь в выделении образцов геномной ДНК и проведении полевых экспериментов. Благодарю за предоставленный растительный материал изогенных линий и сортов мягкой пшеницы сотрудников лаборатории хромосомной инженерии ИЦиГ СО РАН к.б.н. Ефремову Т.Т., д.б.н. Першину Л.А.